

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**UTILIZAÇÃO DO EXTRATO ENRIQUECIDO EM ISOFLAVONAS DO TREVO-VERMELHO
(*Trifolium pratense* L.) COMO NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA ARTRITE
REUMATOIDE**

PRISCILA SCHMIDT LORA

Porto Alegre, Maio de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**UTILIZAÇÃO DO EXTRATO ENRIQUECIDO EM ISOFLAVONAS DO TREVO-VERMELHO
(*Trifolium pratense* L.) COMO NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA ARTRITE
REUMATOIDE**

PRISCILA SCHMIDT LORA

Orientador: Ricardo Machado Xavier

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Doutor

Porto Alegre, Maio de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Schmidt Lora, Priscila
UTILIZAÇÃO DO EXTRATO ENRIQUECIDO EM ISOFLAVONAS
DO TREVO-VERMELHO (*Trifolium pratense* L.) COMO NOVA
ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA ARTRITE REUMATOIDE /
Priscila Schmidt Lora. -- 2013.
62 f.

Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. anti-inflamatório . 2. antinociceptivo. 3.
fitoterápico. I. Machado Xavier, Ricardo , orient.
II. Título.

Dedicatória

Dedico essa tese aos meus pais que nunca duvidaram do meu potencial, ao meu adorado esposo Ruter sempre paciente e generoso nos meus momentos de desânimo.

Essa dedicatória se estende também ao meu professor e orientador Dr. Ricardo Machado Xavier a quem devo grande parte do aprendizado que tive como pós graduanda e pesquisadora.

Agradecimentos

Agradeço principalmente a todos os momentos difíceis que tive durante estes seis anos de pós-graduação. Pois sem eles com certeza hoje eu não seria uma pessoa mais forte e mais determinada.

Agradeço a minha irmã Daniela, meu cunhado Roberto, minhas tias Janine e Berenice e meus primos Felipe e Meduza que de perto acompanharam as ausências justificadas por esse objetivo.

Agradeço também a minha família como um todo que mesmo de longe esteve presente torcendo e vibrando por mim.

Agradeço a família do meu esposo, meus sogros, Juscelino e Melania, meus cunhados e cunhadas Robson e Janaína, Regis e Alessandra pelo apoio incondicional.

Um agradecimento muito carinhoso a todas as colegas de Laboratório de Doenças Autoimunes e Infecciosas Patrícia, Vívian, Mírian, Paula e Laura (e Paulo) e ainda mais especial para o presente de aluna que recebi “Maria” Eduarda.

Aos colegas do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A grande amiga Sandra Helena Machado pelo seu apoio sempre presente e pelas portas que me abriu.

Aos colegas pesquisadores que auxiliaram de alguma forma nesta tese, especial agradecimentos às colegas do Laboratório de Embriologia – Ana Helena, Unidade de Experimentação Animal – Marta, Fabi, Rosa, Eduardo e inúmeros outros que não caberiam neste documento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao

Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) pelos incentivos financeiros dados a este projeto.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas pela oportunidade

“Ninguém é tão grande que não possa
aprender, nem tão pequeno que não possa
ensinar.”

Píndaro, poeta romano

Resumo

Introdução: O trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) é uma importante leguminosa que contém as isoflavonas genisteína, dadizeína, formononetina e biochanina A em maiores concentrações. Diversos benefícios à saúde humana já foram demonstrados pelo uso destas isoflavonas isoladamente ou pelo extrato do trevo-vermelho em aspectos como terapia de reposição hormonal, terapia anticâncer, agente antioxidante e regulador do metabolismo. Alguns trabalhos também apontam o papel destes compostos como anti-inflamatórios. Entretanto seu uso como anti-inflamatório administrado via oral em modelos animais de inflamação ainda não foi demonstrado. Ainda, sabe-se que as isoflavonas bioativas encontradas no trevo-vermelho são altamente polares, dificultando assim sua absorção. Por isso, modificações na apresentação farmacêutica dessas moléculas como complexação a ciclodextrinas, incorporações em óleos ou emulsões pode auxiliar na absorção. E por fim, essa melhora na farmacocinética da droga pode aumentar a sua eficácia.

Objetivos: Nosso objetivo neste trabalho foi explorar o uso do extrato enriquecido do trevo vermelho complexado com ciclodextrinas como terapia anti-inflamatória em um modelo animal de artrite e em modelo inflamatório e imunomodulador *in vivo* e *in vitro*.

Métodos: A preparação do extrato seco de trevo-vermelho utilizado neste estudo é resultado de um trabalho prévio realizado pelo laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia (UFRGS). O modelo *in vivo* de inflamação utilizado foi o modelo de monoartrite foi induzido por proteína bovina metilada (mBSA). Resumidamente, administrações semanais do antígeno foram feitas subcutâneamente por três semanas com adjuvante e por fim o desafio intra-articular foi feito com a proteína. Os animais foram tratados dois dias antes do desafio intra-articular com o extrato total do trevo-vermelho complexado ou não a ciclodextrinas a cada 12h. A avaliação da inflamação deste modelo foi feita pela migração de neutrófilos para a articulação 24h após o desafio intra-articular e a nocicepção (representando a percepção de dor) medida entre o período do desafio intra-articular e a morte dos animais nos tempo (0h – desafio, 1h, 3h, 6h e 24h). Ainda, *in vitro* o

modelo utilizado foi proliferação de linfócitos. Nesses experimentos, o extrato foi administrado tanto com um tratamento direto sobre os linfócitos em cultura (experimentos *in vitro*) quanto com linfócitos retirados dos animais tratados com o extrato via oral (experimentos *ex vivo*). Por fim, ensaios de citotoxicidade foram realizados para verificar a viabilidade celular do extrato sobre linfócitos.

Resultados: O extrato do trevo-vermelho demonstrou efeito anti-inflamatório quando administrado via oral em modelo animal de artrite (*in vivo*). Isso foi demonstrado por redução de migração de células inflamatórias pela redução da dor. Ou em modelo inflamatório de cultura de células (*in vitro* e *ex vivo*). Demonstrado pela redução da proliferação de linfócitos. Complementarmente comprovamos por ensaios de citotoxicidade que o extrato utilizado não apresenta danos às células. Por fim, utilizando processos de tecnologia farmacêutica, demonstramos que a quando complexado a ciclodextrina o extrato do trevo vermelho apresenta maior eficácia.

Conclusão: O extrato total do trevo-vermelho demonstrou ser uma possível alternativa terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias. Ainda, a complexação com ciclodextrina demonstrou maior eficácia do extrato. Esse achado foi capaz de gerar uma patente sobre o uso deste extrato do trevo-vermelho complexado com ciclodextrinas em processos inflamatórios.

Palavras-chave: Trevo-vermelho, *Trifolium pratense*, anti-inflamatório e antinociceptivo.

Abstract

Background: Red clover (*Trifolium pratense* L.) is an important herbaceous which contains isoflavones genistein, daidzein, formononetin and biochanin A in higher concentration. Those isoflavones isolated or together as a role extract have been demonstrated to have a variety of beneficial effects to human health such as hormone therapy replacement, anti-cancer therapy, anti-oxidative therapy or metabolism regulator. Some authors also demonstrated those compounds as anti-inflammatory agents; however their use as oral anti-inflammatory agent in animal model has not yet been related. Yet, bioactive isoflavones found in red clover are extremely polar and by so hardly absorbed. For this reason, pharmaceutical changes in this molecules such as cyclodextrins complexions may improve absorption. Finally this pharmacokinetic improvement may increase drug efficiency.

Objective: Our aim whit this study was to explore the use of enriched extract of red clover complexed with cyclodextrins as anti-inflammatory and immunomodulatory therapy in an animal model of arthritis and in and in experimental inflammatory model *in vitro*.

Methods: The preparation of dry extract of clover used in this study is the result of a previous study carried out by the laboratory of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy (UFRGS). In vivo model of inflammation used was monoarthritis was induced by methylated bovine protein (mBSA). Shortly, weekly administrations of antigen were made for three weeks subcutaneously with adjuvant and finally intra-articular challenge was done with the protein. The animals were treated two days before the challenge intra-articular with total extract of red clover complexed or not to cyclodextrins every 12 hours. The evaluation of this model of inflammation was made by the migration of neutrophils to the joint 24 hours after intra-articular challenge and nociception (representing the perception of pain), measured from the time of challenge intra-articular to the death of the animals in time (0h - challenge, 1h, 3h, 6h and 24h - death). In addition, *in vitro* experiments on lymphocyte proliferation were both made from this extract with a direct treatment of the lymphocytes in culture (*in vitro* experiments) or with lymphocytes taken from animals treated orally with the

extract (*ex vivo* experiments). Finally, cytotoxicity tests were conducted to measure the viability of the cell extract on lymphocytes.

Results: The red clover extract has shown anti-inflammatory effect when administered orally to an animal model of arthritis or inflammation in a model cell culture. This was demonstrated by reducing inflammatory neutrophil migration and by reduction of pain. Additionally all concentrations used did not demonstrated cytotoxicity. Finally, using pharmaceutical technology processes, we demonstrated that when complexes with cyclodextrin the extract shows the same effects at lower doses, this attributed to a better solubility of the drug.

Conclusion: Red clover total extract has proved to have to be a potential therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. Further, complexion with cyclodextrin showed the same efficacy of the extract even at lower doses. This finding has been able to generate a patent on the use of this red clover extract complexes with cyclodextrins in inflammatory processes.

Keywords: Red clover, *Trifolium pratense*, Anti-inflammatory and Analgesic.

Lista de Tabelas

Tabela do artigo de revisão.....	37
----------------------------------	----

Lista de Figuras

Figura 1: Experimento migração de neutrófilos em modelo de monoartrite	57
Figura 2: Experimento nocicepção em modelo de monoartrite	58
Figura 3: Experimento de viabilidade celular de linfócitos	59
Figura 4: Experimento de linfoproliferação in vitro	59
Figura 5: Experimento de linfoproliferação ex vivo	60

Lista de Abreviaturas

SIGLA	Significado
AIM2	receptor de melanoma
AR	artrite reumatoide
CLR	receptor de lecitina tipo C
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
ConA	conavalina A
COX	Ciclooxigenase
DAMPs	moléculas associadas a dano celulares
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECM	matriz extracelular
ELISA	ensaio enzimático ligado a enzima
ER	receptor de estrógeno
FAK	Focal adhesion kinase
FAPERGS	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IL	interleucinas
INF	interferon
iNOS	óxido nítrico sintase
LPS	lipopolissacarídeo
LTB4	leucotrieno B4
MAPK	proteínas quinases ativadas por mitógenos
mBSA	proteína metilada bovina
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
NFkB	fator nuclear kappa B
NLR	receptor do tipo NOD
NO	óxido nítrico
OD	densidade óptica
PAF	fator de ativação plaquetário
PAMPs	padrões moleculares associados aos patógenos
PGE2	prostaglandina E2
PPAR	receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
RENISUS	relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS
RLR	receptor do tipo RIG
RRP	receptores de reconhecimento de padrão
SUS	sistema única de saúde
TLR	receptor do tipo toll-like
TNF	fator de necrose tumoral

Sumário

1. Introdução	14
2. Justificativa.....	17
3. Objetivos.....	18
3.1 Objetivo Principal.....	18
3.2 Objetivo Secundários.....	18
4. Marco Teórico.....	19
5. Referências da Introdução.....	20
6. Anexos	21
6.1 Artigo de Revisão.....	22
6.2 Patente gerada pela tese.....	38
7. Considerações finais.....	60
7.1 Conclusão.....	60
7.2 Perspectivas.....	60

1 Introdução

A inflamação é um processo essencial para a manutenção dos organismos vivos. Como via de regra este processo responsável pela defesa do nosso organismo contra os agentes microbianos infectantes e os processos de dano às células assim como a morte celular por necrose ou o desenvolvimento de células cancerígenas Chen; Nuñez (2010).

Esse processo é classificado conforme determinadas características em um processo crônico ou agudo. Neste contexto, descrevem-se como inflamação aguda processos iniciais decorrentes do estímulo inflamatório. Isso inclui alterações vasculares, migração de células inflamatórias ao local da inflamação e liberação de mediadores inflamatórios. Estes terão objetivos de aumentar o recrutamento de células inflamatórias e também de ativar a liberação de mediadores sistêmicos.

Os mediadores sistêmicos são responsáveis por sinalizar órgãos e sistemas. Ainda, quando o agente causador da inflamação não é eliminado esse quadro passa a ser chamado de inflamação crônica.

Com relação à inflamação crônica a liberação de mediadores inflamatórios sistêmicos se intensifica e as tentativas do organismo no reparo tecidual também. Nesses casos observam-se os processos de angiogênese – formação de novos vasos sanguíneos. Estes objetivam irrigar os tecidos com injúria e evitar a fibrose caracterizada pela incapacidade do organismo em regenerar um tecido Lefkowitz; Lefkowitz (2001 e Ley et al. (2007 e Soehnlein; Lindbom (2010).

A ativação das células inflamatórias apresenta um sistema de moléculas e receptores incorporados ao sistema imune inato. Os receptores presentes nas células do sistema imune inato conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (RRP) e as moléculas dos agentes infectantes – padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou moléculas associadas aos danos celulares (DAMPs). A ligação dessas moléculas aos receptores desencadeia uma série de cascatas de sinalização celular como a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B),

ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), ativação da cascata do interferon dentre outras.

Como consequência da ativação dessas cascatas, moléculas de adesão no endotélio capilar e nos leucócitos intravasculares terão sua expressão aumentada. Auxiliando assim a migração das células inflamatórias. Esse processo na inflamação aguda leva a um acúmulo de neutrófilos no tecido inflamado. Medzhitov (2008 e Takeuchi; Akira (2010).

Além da migração de neutrófilos essa sinalização celular leva a liberação de mediadores inflamatórios como quimiocinas, citocinas, e proteínas de fase aguda. Contudo, existem outros mediadores inflamatórios têm grande importância nesse mecanismo, como por exemplo, os produtos do metabolismo do ácido araquidônico. Destes podemos destacar tais prostaglandinas e tromboxanos.

Ainda, o bloqueio da liberação ou inativação de mediadores inflamatórios é o alvo dos da maior parte dos fármacos anti-inflamatórios. Assim, inibidores desta cascata (ácido araquidônico) como as moléculas inibidoras das enzimas cicloxigenases tanto nas formas constitutiva (tipo 1) quanto na forma induzida pelos processos inflamatórios (tipo 2) são importantes alvos farmacológicos uma vez que inibem a liberação de uma série de mediadores inflamatórios Nathan (2002).

Além dos inibidores da cicloxigenase outros alvos da inflamação também já foram descritos serem inibidos por algumas moléculas. Por exemplo, os glicocorticoides poderosos anti-inflamatórios utilizados largamente por pacientes com patologias inflamatórias crônicas. Em seu mecanismo de ação a imunossupressão causada pelo bloqueio da sinalização da produção de citocinas é um dos principais mecanismos, juntamente com a redução global das ações do sistema imune. A falta de seletividade da ação dos glicocorticoides e as alterações metabólicas que eles são capazes de gerar ressaltam o cuidado no uso dessas medicações Dinarello (2010).

Considerando os novos fármacos anti-inflamatórios disponíveis podemos ressaltar o uso das terapias biológicas como o anticorpo anti-TNF- α ou o anticorpos

anti-IL-6 que vêm demonstrando excelentes efeitos por ter uma ação com maior seletividade sobre pontos da inflamação e não causar uma imunossupressão generalizada a contrário dos glicocorticoides Dinarello (2010).

Assim, sendo a artrite reumatoide (AR) uma doença autoimune inflamatória sistêmica, o uso de anti-inflamatórios é parte do cotidiano dos pacientes acometidos com essa patologia. Sendo assim, o desenvolvimento de novas terapias anti-inflamatórias eficazes e com uma menor incidência de efeitos adversos trazem um benefício imediato a estes pacientes.

O uso de modelos animais de artrite tem provado ser uma importante ferramenta diagnóstica no estudo dos mecanismos envolvidos nessa patologia e também para a busca de novas terapias Brand et al. (2007). Pois mimetizam inúmeros disfunções do sistema imune encontrados na AR.

Terapias alternativas, tais como o uso de plantas medicinais para o tratamento da AR são descritas pela literatura. Como exemplo de medicamento fitoterápico testados para AR pode-se citar o *Cannabis spp.* com comprovados efeitos sobre a diminuição da dor e melhoria da qualidade do sono (8).

Algumas razões são destacadas para esse fato: a não eficácia das terapias convencionais; o efeito adverso dos medicamentos alopáticos; a ampla promoção das terapias não convencionais (imprensa, sites de Internet, livros populares e celebridades); a ampla distribuição dessas terapias – muitas vezes consumidas como complemento nutricional; a tendência a ver essas terapias como “naturais” e assim livres de riscos relacionados ao consumo e o custo das terapias convencionais Ernst (2011).

Entretanto, é importante ressaltar alguns aspectos sobre o uso de drogas fitoterápicas: (i) seu uso pode estar associado a sérios efeitos adversos; (ii) existe uma dificuldade no controle de qualidade em produzir constantemente uma droga de alta qualidade e (iii) seu uso pode causar interação com outras drogas alopáticas Ernst (2011).

2 Justificativa

Devido à inflamação ser um complexo mecanismo que envolve uma série de mediadores e células, e ser um processo envolvido em diversas patologias como a AR. Ressalta-se a importância de fármacos que sejam capazes de bloquear os mecanismos inflamatórios.

Não obstante, devido à alta incidência de efeitos adversos e a não responsividade de alguns pacientes aos medicamentos anti-inflamatórios existentes hoje para prática clínica, novas terapias têm sido recentemente desenvolvidas ou submetidas a ensaios clínicos para AR, como os medicamentos que bloqueiam a ação de citocinas pró-inflamatórias, exemplo TNF (etanercept, adalimumab e infliximab), IL-1 (anakinra) e IL-6 (MRA).

Ainda, devido ao extrato do trevo-vermelho ter demonstrado ação anti-inflamatória em modelos *in vitro* de inflamação e seu uso não apresentar (até o momento) efeitos adversos, o estudo trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) em modelos experimentais de artrite poderá fornecer informações relevantes sobre o desenvolvimento da doença e ampliar o conhecimento de novos tratamentos para AR, incluindo fitomedicamentos.

Sendo assim, o estabelecimento do extrato de trevo-vermelho como nova terapia farmacológica na AR seria de grande interesse científico e econômico, respondendo a interesses nacionais, uma vez que esse estudo contribuiria para o desenvolvimento da indústria farmoquímica brasileira.

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal

Avaliar a eficácia do extrato total de trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.), uma leguminosa forrageira, como terapia anti-inflamatória e imunomoduladora.

3.2 Objetivos secundários

- Avaliar o processo inflamatório em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos tratados via oral com extrato total de trevo-vermelho através da migração de neutrófilos para cavidade articular e pela nocicepção articular. Ainda neste modelo, determinar a curva dose-resposta, para escolha da melhor dose.
- Avaliar o efeito anti-inflamatório em modelo in vitro de inflamação sobre linfócitos estimulados pela Concavalina A e tratados com extrato total do trevo-vermelho.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato total do trevo-vermelho em linfócitos.

4 Marco Teórico

A partir desta base teórica, observa-se que o processo de inflamação é complexo e envolve diferentes mecanismos e mediadores. E também observamos que o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos pode apresentar um ganho às pessoas acometidas com patologias inflamatórias seja pela busca de novas rotas mais específicas e eficazes de bloquear o processo inflamatório, ou seja, pela menor incidência de efeitos adversos.

5 Referências da Introdução

BRAND, D. D.; LATHAM, K. A; ROSLONIEC, E. F. Collagen-induced arthritis. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1269–75, 2007.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation : sensing and reacting to damage. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 12, p. 826–837, 2010. Nature Publishing Group.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935–50, 2010. Elsevier Inc.

ERNST, E. Herbal medicine in the treatment of rheumatic diseases. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 95–102, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220089>>. Acesso em: 20/3/2011.

LEFKOWITZ, D. L.; LEFKOWITZ, S. S. Macrophage-neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. **Immunology and cell biology**, v. 79, n. 5, p. 502–6, 2001.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–89, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. , v. 454, n. July, 2008.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–52, 2002.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427–439, 2010. Nature Publishing Group.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010. Elsevier Inc.

6 Anexos

6.1. Artigo Revisão da literatura

Certificado de submissão:

The European Journal of Pharmacology <ejp-office@pharm.uu.nl>
Para: priscilaslora@gmail.com, plora@unisinis.br

21 de maio de 2013 15:11

Dear Priscila,

Your submission entitled "Isoflavones present in Trifolium pretense modulating inflammatory mediators in acute inflammation" has been received by journal European Journal of Pharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ejp/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

European Journal of Pharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Isoflavones present in *Trifolium pratense* modulating inflammatory mediators in acute inflammation

Isoflavones present in *Trifolium pratense* modulating inflammatory mediators in acute inflammation

Priscila Schmidt Lora^{1,2,3}, Eduarda Correa Freitas^{1,2}, Ricardo Machado Xavier^{1,2,4}

Post-graduate Program in Medical Science, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)1; Laboratory of Autoimmune Disease, Experimental Clinical Research, Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre 2; Assistant Professor, Universidade Federal do Vale dos Sinos (UNISINOS) 3; Associated Professor, Rheumatology Division, Internal Medicine, UFRGS 4.

Correspondence and reprints should be addressed to:

Ricardo Machado Xavier MD, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rheumatology Division

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-003

Bairro Rio Branco – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Phone (55-51) 3359.8340

Email: rmaxavier@hcpaufrgs.br

Key words: *Trifolium pratense*, Red Clover, Inflammation, Inflammation Mediators, Isoflavones

INTRODUCTION

Trifolium pratense L. (Red clover) is a forage legume from the *Fabacea* family that contains isoflavones formononetin and biochanin A in high concentrations and contains low concentrations of isoflavones daidzein and genistein. In addition, *Trifolium* species has been shown to have medical uses like treating menopausal hot flashes, being used as an anticancer therapy, improving lipid metabolism and also antioxidative and anti-inflammatory properties. Indeed, biological actions of red clover have been attributed so far to isoflavones present in the plant (Kolodziejczyk-czepas, 2012).

Inflammation is a clinical condition present in many diseases. For instance, conditions such as diabetes type 2, atherosclerosis, Alzheimer disease, cancer and the focus of our research: the autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (Couzin-Frankel, 2010). Inflammation begins as an acute process in response to an infectious organism or to cell damage and the regular course is its resolution. However, when inflammation is not finished (usually when the inflammatory agent is not removed) there is a turn in biological response and the process is then called chronic inflammation (Nathan & Ding, 2010).

Nowadays, many medications target inflammation processes, for instance, classic anti-inflammatory agents such as cyclooxygenase inhibitors (COX), glucocorticoids or the new biological anti-cytokines therapy. Yet, those drugs are associated with many adverse effects. From this point of view, new compounds targeting inflammation still are the focus of some researchers.

Overall, this review will focus on isoflavones found in *Trifolium pratense* L. (Red clover) as anti-inflammatory agents.

1. MATERIAL AND METHODS

2.1 SEARCH STRATEGY

For this review PubMed database were accessed from the dates of inception until 01/05/2013. Search terms were: ("Trifolium"[Mesh]) AND ("Inflammation"[Mesh])

OR "Inflammation Mediators"[Mesh]) for uses of total plant extract or ("Genistein"[Mesh] OR "daidzein"[Supplementary Concept]) OR "formononetin"[Supplementary Concept]) OR "biochanin A"[Supplementary Concept]) AND ("Inflammation"[Mesh] OR "Inflammation Mediators"[Mesh]) for uses of isolated isoflavones.

2. FLAVONOID

Flavonoids are described as a group of phenolic compounds found in a variety of plants which have some biological activity. They are also synthesized by plants as secondary metabolites and have special relation to plant defenses against microorganisms. Structurally, they share a carbon framework of two aromatic rings linked by a three-carbon chain (C₆-C₃-C₆). Besides, different classes of flavonoids are defined by the differences in their generic structure; for example, flavonols, flavones, flavonones and isoflavones. Furthermore, many factors will contribute to the levels of flavonoids present in plants. For instance: the genotype of the plant, the agronomic practices, the climatic and regional conditions, the maturity at harvest, the post-harvest handling and the storage conditions. (Erdman et al., 2007)

3.1 ISOFLAVONOIDS

Isoflavones are one of the most studied classes of flavonoids. Regarding their chemical characteristics, isoflavones can be found in glucose-conjugated forms that are highly polar and thus water-soluble. As a consequence, these forms of isoflavones are hardly absorbed by the intestinal epithelium. On the other hand, aglycone forms are easily absorbed and those have been the most studied compounds. Even so, the intestinal microflora has the ability to transform the glycosylated form in aglycones. Finally, in order to improve absorption of glycosylated forms, pharmaceutical strategies as lipid-based formulations, or complexation with cyclodextrin, have been used (Vitale, Piazza, Melilli, Drago, & Salomone, 2012).

Isoflavones are usually found in soybeans, soy food and legume. Moreover, daidzein, genistein and glycitein among with biochanin A, formononetin and equol are the aglycone isoflavones that had their biological functions in human physiology

and disease processes most explored so far. (Erdman et al., 2007) Similarly to other flavonoids, isoflavones are known as antioxidant agents. In addition to that, isoflavonoids have been found to have additional functions such as anticancer therapy and anti-inflammatory therapy.

Isoflavones can bind with some affinity to the estrogen receptor (ER) 17 β -estradiol and by so, they are considered phytoestrogens. On the other hand, isoflavones bind to ER with a significant reduced affinity than 17 β -estradiol. In addition, this binding ability is totally reduced when analyzing the compounds with more hydroxyl substituents as daidzein, biochanin A and formononetin (Kuiper et al., 1998). Nonetheless, it has been demonstrated that isoflavones can modulate cell functions through genomic actions (by upregulating or downregulating protein expression) or no-genomic functions such as inhibiting tyrosine kinase, Akt proteins, NF κ B, iNOS or activating PPAR receptors.

Regarding isoflavones present in red clover, formononetin, biochanin A, genistein and daidzein are the most studied so far. The role of those isoflavones in controlling inflammation will be the focus of our review.

3. INFLAMMATION

Inflammation is an essential process to maintain organisms alive. As a rule, it is the host immune response against microbes, toxins, and other cell injuries like necrosis. Consequently, there would be no response against infection or tissue healing without inflammation (Chen & Nuñez, 2010). The process of inflammation can be acute or chronic. In a few words, what defines if the process will evolve from acute inflammation to a chronic course is the resolution of the inflammation target. While the acute process occurs in a few hours (maximum of few days) and is rapidly resolved, chronic inflammation lasts longer and usually is more difficult to resolve.

Concerning inflammation targets, foreign organism and damage cells can release danger signals know as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs), respectively. DAMPs and PAMPs will activate host cells through pattern recognition receptors (PRR). Further,

DAMPs and PAMPs may be classified into five classes: Toll-like receptors (TLR), NOD-like receptors (NLR), RIG-like receptors (RLR), C-type lectin receptors (CLR) and absence in melanoma 2 (AIM-2) receptors.

As a consequence of PRRs activation by DAMPs or PAMPs, downstream pathways such as nuclear factor- κ B (NF κ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and type I interferon will be activated resulting in increased pro-inflammatory cytokine production (Chen & Nuñez, 2010). Meanwhile, PRRs are expressed in macrophages, dendritic cells and some other nonprofessional immune cells (Medzhitov, 2008; Takeuchi & Akira, 2010).

3.1 ACUTE INFLAMMATION

Acute inflammation begins with hemodynamic changes and white blood cells (leukocytes) migration. Since microbes and necrotic cells (inflammation targets) are usually outside blood vessels, it is important that those cells and mediators migrate from the blood vessels to the tissue (Rock & Kono, 2011). First actions in inflammation are the hemodynamic changes, due to changes in the artery, such as arteriolar vasodilation, induced by histamine, prostaglandins, bradykinin, leukotriene and nitric oxide resulting in increased microvascular permeability.

In particular, prostaglandin production is a major point controlled by the anti-inflammatory drugs known as cyclooxygenases (COX) inhibitors. In fact, those drugs can inhibit prostaglandin production and thus inhibiting many inflammatory mediators. Additionally, two types of COX inhibitor are available: COX 1 inhibitors, those that inhibit the constitutive enzyme and COX 2 inhibitors, more selective drugs because its inhibition occurs only on the inducible enzyme produced during inflammation. Finally, many adverse effects have been attributed to COX inhibitors, some of which are gastrointestinal bleeding, impaired renal function and cardiovascular effects.

Regarding leukocytes migration, acute inflammation is characterized by accumulation of neutrophils (Phillipson & Kubes, 2011), whose main function is to phagocyte and consequently to eliminate the inflammatory stimulus. Afterwards, other leukocytes (lymphocytes and monocytes) also migrate to the inflammatory site

and together with neutrophils, they will be producing more mediators with systemic influences. Due to leukocytes actions, mediators are released in the circulation and as a consequence these mediators may trigger some systemic reaction. Therefore, the process described above explains four out of the five cardinal signs of inflammation first described by Celsus in AD50 (*redness*, *swelling* – microvascular changes, *edema* – migration of cells and proteins to the infected or damaged tissue, *pain* – systemic reaction through inflammation mediators being released).

Neutrophils migrate to the site of inflammation within few hours due to their ability to enhance expression of adhesion molecules in the presence of inflammatory signs. (Phillipson & Kubes, 2011). The first step for neutrophils to transmigrate is the upregulation of adhesion molecules on endothelial cells and on neutrophils. Regarding molecules overexpressed in endothelial cells, some examples are P-selectin, E-selectin, GlyCAM-1, PSGL-1 and hyaluronan. On the other hand, neutrophils increase the expression of L-selectin, E-selectin ligand, PSGL-1 and CD44. Together, chemokines produced by sentinel cells (tissue macrophages, dendritic cells and mast cells) induce cellular changes in neutrophils and more adhesion molecules are produced. Some examples are β 2 integrins, CD-11a, CD-11b (Phillipson & Kubes, 2011). A key factor for neutrophil transmigration is chemokine releasing and action. These can be divided into some classes; chemokines: IL-8, MIP-alfa; peptides complement molecules (C5a, C3a), MIF; eicosanoids: lipid chemoattractant leukotriene B4 (LTB4), Platelet activating factor (PAF) (Chou et al., 2010; Sadik, Kim, & Luster, 2011).

Neutrophils are short-life cells and together with eosinophils and basophils, they are called granulocytes because they contain specialized granules in their cytoplasm. They also belong to the innate immune system, responsible for the first line of defense. Once in the site of inflammation, neutrophils will act trying to eliminate the pathogen or necrotic cells. Their First action is to phagocytize and kill it. Neutrophils use an array of toxic mediators to kill invading pathogens, so their activity must be tightly controlled. To illustrate some neutrophil mediators we can divide them into categories: granule protein; reactive oxygen species; lipid mediators; neutrophil

extracellular traps; cytokine; chemokines and growth factors. (Mantovani, Cassatella, & Costantini, 2011; Medzhitov, 2008).

3.2 CHRONIC INFLAMMATION AND RESOLUTION

Concerning the end of the inflammation process, it can be said that acute inflammation will be over when the inflammation target is eliminated. Not only do cells involved in the process have short lives but also their mediators, so a quick resolution is common.

Inflammation resolution is related to new blood supply (stimulated by inflammatory cells), fibrinogen being converted to fibrin providing a structure for new cell and molecular mediators that stimulate the growth of new original tissue. Together, these mechanisms result in tissue repair (Rock, 2011).

Tissue repair or wound-healing responses must be tightly regulated, otherwise tissue remodeling will end in fibrosis. Fibrotic disorders are associated with persistent production and releasing of growth factors, proteolytic enzymes, angiogenic factors and fibrogenic cytokines. In short, it will result in accumulation of extracellular matrix (ECM) components such as hyaluronic acid, fibronectin and, eventually, in a pathological remodeling tissue (Duffield, Lupher, Thannickal, & Wynn, 2013).

As a matter of fact, inflammation, when not resolved, can cause diseases in many situations. For example, inflammation against self-tissue, as well as inflammation not resolved. In order to have a perfect anti-inflammatory agent, it would be necessary to control inflammation damage and not to suppress the natural mechanism of inflammation resolution.

4. ANTI-INFLAMMATORY ROLE OF ISOFLAVONES

Plant extracts used to treat inflammation (pain, fever, edema) can be traced for more than a hundred years ago, when Felix Hoffman first identified aspirin as a cyclooxygenase inhibitor and explained its potential as an anti-inflammatory drug. Since then, many new inflammation pathways were able to be blocked using pharmacological agents.

Isoflavones found in *Trifolium pratense* (genistein, daidzein, formononetin and biochanin A) have been used to treat target points of inflammation, both isolated or as a total extract of the plant. However, few studies were made in animal models by the oral administration, which is closer to its use as a commercial drug in humans. Antioxidative activities, modulatory effects on lymphocytes, arachidonic acid (cyclooxygenase), nitric oxide metabolism, and proinflammatory, as well as anti-inflammatory molecules, have been some of the mechanisms with which those isoflavones have been described and are presented in table 1.

4.1 ARACHIDONIC ACID METHABOLISM

Inhibition of cyclooxygenase, especially type 2 (COX-2) is the mechanism of a variety of anti-inflammatory agents known as the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Genistein is able to inhibit COX-2 in human chondrocytes induced by LPS. Also, nitric oxide (NO) was reduced and more importantly, there was no alteration on COX-1 levels. (Hooshmand et al., 2007). Besides that, COX-2 can be reduced by genistein and daidzen after UVB irradiation on skin fibroblasts (Iovine et al., 2012).

Regarding total extract inflammation, Prostaglandin E2 and Thromboxane arachidonic acid mediators were reduced murine macrophages cell line and human monocyte stimulated with LPS (Lam, Demasi, James, Husband, & Walker, 2004). Prostaglandin E2 and NO reduced also through activation of macrophage using INF- γ instead of LPS, and treated with genistein and equol. In the same study, a variety of inflammation mediators were evaluated in those cells and NF κ B, NO, and several other important pathways were regulated by isoflavones (Blay et al., 2010).

4.2 CITOKINE RELEASE

Blocking cytokine has been an important new strategy to control inflammation. For instance, infliximab, a potent TNF- α inhibitor, can be used in many autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis or Chron's disease and is a therapy of choice for those patients who are non-responsive to other drugs. Genistein, Daidzein and other isoflavones were able to down regulate pro-inflammatory cytokines in different

cell lines and different conditions. Their mechanism is by down regulation of IL-6 and IL-8 in experimental model of colitis (Morimoto, Watanabe, Yamori, Takebe, & Wakatsuki, 2009), and by decreasing the levels of TNF- α , IL-1 β in lung produced by lymphocytes (Calveley et al., 2010), brain (Morimoto et al., 2009).

In the same way, biochanin A reduced TNF- α , IL-1 β and IL-6 in macrophages stimulated by LPS (Kole, Giri, Manna, Pal, & Ghosh, 2011). Moreover, biochanin was able to reduce nitric oxide production (measured by nitrite), iNOS and NF κ B expression as well as the p65 translocation to the nucleus and production of IL-6, IL-1 β and TNF- α released by macrophages activated by LPS (Manna, 2012).

Kole et al demonstrated that macrophages stimulated with LPS had anti-inflammatory activity inhibited by biochanin A in a dose dependent manner. The mechanism involved NF κ B pathway, as well as inhibition of iNOS expression, production of NO, in addition to pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β and TNF α) release inhibition and inhibition of p38MAPK and ATF2 phosphorylation. (Kole et al., 2011)

In agreement, Chen found that neurons stimulated with LPS and treated with biochanin reduced inflammation, by reducing the levels of TNF- α , NO and other antioxidative mediators. A key feature was to postulate a role for biochanin in Parkinson Disease, considering the inflammation processes in this condition (Booth et al., 2006).

4.3 ANIMAL MODELS OF INFLAMMATION

Wang et al, in a rat model of arthritis induced by collagen, demonstrated reduced paw edema and lymphocyte proliferation with genistein administered by gavage for 42 days after arthritis induction. In the same experiment, the authors also tested genistein effect on oophorectomized female rats, which was less protective than it was on non- oophorectomized rats. In addition, lymphocytes cultures demonstrated increased levels of INF- γ and reduced levels of IL-4 as well as reduced expression of T-bet cells and increased levels of GATA-3. Finally, the authors

suggested that genistein might have an immunomodulatory action through alteration of Th1/Th2 response in an inflammatory condition. (Wang et al., 2008)

Similarly, Verdrengh et al, in a mouse model of arthritis induced by collagen, demonstrated a less severe disease and lower levels of antibodies against collagen in animals that received genistein for 21 days after arthritis induction. Also, in a delayed type hypersensitivity inflammation model induced by oxazolone, genistein was able to significantly reduce edema. Besides, genistein also reduced (in a dose dependent manner) the levels of TNF- α and MIP-1 α in culture medium of monocyte cell line induced with LPS. (Verdrengh, Jonsson, Holmdahl, & Tarkowski, 2003)

Considering the ability of synovial fibroblast cells to get transformed into adipocytes linked with an anti-inflammatory activity in rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis, Relic et al, demonstrated that genistein was able to induce human synovial fibroblast adipogenesis. Although adipogenesis is usually related to enhanced levels of leptin, which is considered a pro-inflammatory adipocytokine, in this experiment, adipogenesis induced by genistein did not elevate the levels of leptin, meanwhile, both compounds enhanced adiponectin levels. Indeed, genistein was able to dramatically reduce IL-8 and IL-6 levels both endogenously and induced by TNF- α . Finally, the authors demonstrated that genistein anti-inflammatory actions are probably related to NF κ B pathway. (Relic et al., 2009)

4.4 INHIBITION OF ANGIOGENESIS

Inhibition of angiogenesis may also be a target point to prevent inflammation. Paper et al using an in vitro model demonstrated that red clover has antiangiogenic properties. (Krenn & Paper, 2009)

4.5 PROLIFERATION-ACTIVATED RECEPTOR (PPAR) ACTIVATORS

Recently, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) was discovered as a new target to control inflammation. Mueller et al demonstrated that not only can the total extract of red clover activate the PPAR- γ receptor, but also isoflavones have

the same action. This activation is lower than rosiglitazone – a strong known PPAR- γ receptor activator, in most of the isoflavones tested. However, some metabolites such as 6-hydroxydaidzein and 3'-hydroxygenistein were able to activate more PPAR- γ receptors than rosiglitazone. Also, Menoflavon forte (red clover extract treatment widely used for menopause) was tested and results were similar to the red clover extracts tested. From this study, it is clear that red clover isoflavones are able to activate PPAR- γ receptor and, by so, have an important role as anti-inflammatory molecules. (Mueller & Jungbauer, 2008)

Also, Qui L et al using a PPAR- γ inhibitor GW9662 could block biochanin A reduction of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) on macrophages stimulated with LPS but could not block this cytokine reduction induced by genistein (Qiu et al., 2012).

5. CONCLUSION

In this study, the available literature on isoflavones found in the red clover extract used to target inflammation was reviewed. Overall, one can conclude that those compounds may target inflammation process by blocking their mediators and function. Utter importance can be given to the ability of inhibition of COX-2 by genistein (Hooshmand et al., 2007).

Besides that, new inflammation target has been studied. From this point of view, PPAR gamma activators are a new promising anti-inflammatory mechanism. Mueller et al has demonstrated that red clover extract can be a PPAR gamma activator and as a consequence, has given it a new possible mechanism to its anti-inflammatory action (Mueller et al., 2010).

However, a problem faced is that most studies reviewed did use only cell inflammation models and not in vivo animal models. For sure, translation use becomes more difficult from these studies. Also, anti-inflammatory agents usually are associated with a variety of adverse effects and new pharmacological targets derived from plants may be much less invasive to human homeostasis.

Considering the polar nature of genistein, daidzein, formononetin and biochanin A, pharmaceutical modifications in solubility may facilitate their absorption when administered orally. Finally, new studies that demonstrate red clover extract as a new anti-inflammatory agent using animal models can provide useful information for human health.

6. REFERENCES

- Blay, M., Espinel, a E., Delgado, M. a, Baiges, I., Bladé, C., Arola, L., & Salvadó, J. 2010. Isoflavone effect on gene expression profile and biomarkers of inflammation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51, 382–90.
- Calveley, V. L., Jelveh, S., Langan, A., Mahmood, J., Yeung, I. W. T., Van Dyk, J., & Hill, R. P. 2010. Genistein can mitigate the effect of radiation on rat lung tissue. *Radiation research*, 173, 602–11.
- Chen, G. Y., & Nuñez, G. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Publishing Group*, 10, 826–837.
- Chou, R. C., Kim, N. D., Sadik, C. D., Seung, E., Lan, Y., Byrne, M. H., Haribabu, B., et al. 2010. Article Lipid-Cytokine-Chemokine Cascade Drives Neutrophil Recruitment in a Murine Model of Inflammatory Arthritis. *Immunity*, 33, 266–278.
- Couzin-Frankel, J. 2010. Inflammation bares a dark side. *Science (New York, N.Y.)*, 330, 1621.
- Duffield, J. S., Lupper, M., Thannickal, V. J., & Wynn, T. A. 2013. Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis. 8,241-76.
- Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly, J., et al. 2007. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of nutrition*, 137718S–737S.
- Iovine, B., Iannella, M. L., Gasparri, F., Giannini, V., Monfrecola, G., & Bevilacqua, M. A. 2012. A comparative analysis of the photo-protective effects of soy isoflavones in their aglycone and glucoside forms. *International journal of molecular sciences*, 13, 16444–56.
- Kole, L., Giri, B., Manna, S. K., Pal, B., & Ghosh, S. 2011. Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFκB nuclear translocation. *European journal of pharmacology*, 653, 8–15.

- Kolodziejczyk-czepas, J. 2012. Trifolium species-derived substances and extracts — Biological activity and prospects for medicinal applications. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 14–23.
- Krenn, L., & Paper, D. H. 2009. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 16, 1083–8.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., Van der Saag, P. T., Van der Burg, B., et al. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139, 4252–63.
- Lam, A. N. C., Demasi, M., James, M. J., Husband, A. J., & Walker, C. 2004. Effect of red clover isoflavones on cox-2 activity in murine and human monocyte/macrophage cells. *Nutrition and cancer*, 49, 89–93.
- Manna, S. K. 2012. Double-edged sword effect of biochanin to inhibit nuclear factor kappaB: Suppression of serine/threonine and tyrosine kinases. *Biochemical pharmacology*.
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., & Costantini, C. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Publishing Group*, 11, 519–531.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation, 454, 428-35.
- Morimoto, M., Watanabe, T., Yamori, M., Takebe, M., & Wakatsuki, Y. 2009. Isoflavones regulate innate immunity and inhibit experimental colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24, 1123–9.
- Mueller, M., & Jungbauer, A. 2008. Red clover extract: a putative source for simultaneous treatment of menopausal disorders and the metabolic syndrome. *Menopause (New York, N.Y.)*, 15, 1120–31.
- Nathan, C., & Ding, A. 2010. Review Nonresolving Inflammation. *Cell*, 140, 871–882.
- Phillipson, M., & Kubes, P. 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, 17, 1381–1390.
- Qiu, L., Lin, B., Lin, Z., Lin, Y., Lin, M., & Yang, X. 2012. Biochanin A ameliorates the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages by a PPAR γ -dependent pathway. *Molecular medicine reports*, 5, 217–22.
- Relic, B., Zeddou, M., Desoroux, A., Beguin, Y., De Seny, D., & Malaise, M. G. 2009. Genistein induces adipogenesis but inhibits leptin induction in human synovial fibroblasts. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 89, 811–22.

Rock, K. L. 2011. Innate and adaptive immune responses to cell death, 243, 191–205.

Rock, K. L., & Kono, H. 2011. The inflammatory response to cell death, 3, 99–126.

Sadik, C. D., Kim, N. D., & Luster, A. D. 2011. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, 32, 452–460.

Takeuchi, O., & Akira, S. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140, 805–820.

Verdrengh, M., Jonsson, I. M., Holmdahl, R., & Tarkowski, A. 2003. Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 52, 341–6.

Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., & Salomone, S. 2012. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 15–25.

Wang, J., Zhang, Q., Jin, S., He, D., Zhao, S., & Liu, S. 2008. Genistein modulate immune responses in collagen-induced rheumatoid arthritis model. *Maturitas*, 59, 405–12.

Table 1: Isoflavones found in red clover extract and their functions in inflammation.

Isoflavones/Function	Reference
Genistein	
Reduced levels of PGE2 and Tromboxane in macrophage (stimulated whit LPS or INF- γ ,)	(Blay et al., 2010)
Inhibit antioxidant mediators superoxide anion production, inhibit inflammatory mediators adhesion molecules expression and releasing of elastase	(Rotondo et al., 2008)
Reduces infection of HH-8 (Human herpesvirus 8) by inhibition of FAK	(Sharma-Walia et al., 2004)
Enhance phagocytosis index, decrease lymphocyte proliferation and decreases production of IL-6 (stimulated with ConA and LPS)	(Baeza et al., 2010)
Decreases production of INF- γ , IL-2, IL-4, TNF- α in PBMC (stimulated whit ConA and LPS)	(Gredel et al., 2008)
Decreases production of NO and PGE2 in macrophage (stimulated with INF- γ and LPS)	(Blay et al., 2010)

- Inhibit COX-2 and NO in human chondrocytes (stimulated with LPS) (Hooshmand et al., 2007)
- Decreased the levels of TNF- α , IL-1 β and TGF- β in lung cells (radiation-induced injury) (Calveley et al., 2010)
- Decreased the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-8 in brain (stimulated with LPS) (Y. W. Lee and W. H. Lee, 2008)
- Decreased level of IL-6 and reduced NF κ B expression in Monocytes-derived Dendritic Cells (stimulated with LPS) (Dijsselbloem et al., 2007)
- Decreased level of IL-6 and TNF- α by PPAR γ dependent – Biochanin A in Macrophage (stimulated with LPS) (Qiu et al., 2012)
- Reduced paw edema, lymphocyte proliferation, INF- γ and IL-4 in Rat model of arthritis (J. Wang et al., 2008)
- Reduced edema in delayed type hypersensitivity inflammation model (Verdrengh et al., 2003)
- Reduced levels of TNF- α and MIP-1 α in mouse model of arthritis
- Reduced antibody production in antigen induced model ovalbumin (Kogiso et al., n.d.)
- Reduced Th2 cytokines and increased Th1 cytokines in asthma model (Gao et al., 2012)
- Reduced MCP-1 and increased IL-10 in diabetic model (Babu et al., 2012)
- Induced adipogenesis, enhance adiponectin levels, reduced IL-8 and IL-6 (induced by TNF- α) and inhibited NF κ B pathway in human synovial fibroblast (Relic et al., 2009)

Daidzein

Immune functions

- Enhance immune functions (phagocytosis, antibody production and thymus weight) (R. Zhang et al., 1997)

- Inhibiting the maturation and activation of DCs. (Yum et al., 2011)
- Reduced bowel inflammation, reduced levels of IL-6 and IL-8 and increased levels of IL-10 in colitis experimental model (Morimoto et al., 2009)

Biochanin A

- Inhibition of NFkB and AP-1 activation by phorbol myristate acetate (PMA) in human T cell line (stimulated with IL-8, PMA and LPS) (Manna, 2012)
- Reduced levels of NO, reduced iNOS and NFkB expression and decreased level of IL-6, IL-1 β and TNF- α in macrophage (stimulated with LPS) (Kole et al., 2011)
- Inhibition on arachidonic acid release and inhibition of macrophage proliferation in HT-29 human colon cancer cells (Jun et al., 2005)

Genistein and Daidzein

- Inhibit the downregulation of adiponectin stimulated by TNF- α (Yanagisawa et al., 2012)
- Reduced COX-2 activity in skin fibroblast irradiated with UVB (Iovine et al., 2012)

Genistein and Biochanin A

- Increased levels of IL-4 in T cell activated (Park et al., 2006)

Red clover total extract

- Reduced levels of PGE2 and Tromboxane in macrophage and monocyte (stimulated with LPS) (Lam et al., 2004)
- Reduced levels of IL-6 and TNF- α and activated PPAR-gamma in macrophage and monocyte (stimulated with LPS) (Mueller et al., 2010)
-

6.2 Patente gerada pela tese: Processo de extração do extrato de trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e complexado com ciclodextrina e seu uso via oral como anti-inflamatório

PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DO TREVO-VERMELHO ENRIQUECIDO COM ISOFLAVONAS E SEU USO VIA ORAL COMO ANTI-INFLAMATÓRIO

Campo da Invenção

A presente invenção descreve um processo de obtenção do extrato do *Trifolium pratense*, popularmente conhecido como trevo vermelho. O extrato descrito na presente invenção possui frações ricas em isoflavonas e pode ser eficientemente utilizado como base de formulações farmacêuticas e também com efeito anti-inflamatório. O extrato, além de tudo, pode ser opcionalmente complexado com ciclodextrina para aumentar a solubilidade deste em água.

Antecedentes da Invenção

O trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) é uma importante leguminosa, tendo como principal característica a fixação de nitrogênio atmosférico no solo a qual melhora a qualidade das pastagens, apresentando também uma boa qualidade e produção de matéria seca.

O trevo-vermelho contém as isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, sendo as duas últimas encontradas em maiores concentrações na planta (JERI, A. R. The use of an isoflavone supplement to relieve hot flushes. **The Female Patient**, v. 27, p. 34–37, 2002 e VETTER, J. Isoflavones in Different Parts of Common Trifolium Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 106–108, 1995. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00049a020>>. Acesso em: 23/1/2013. Estes compostos têm recebido muita atenção atualmente devido aos seus possíveis benefícios à saúde humana (SIVESIND, E.; SEGUIN, P. Effects of Foliar Application of Elicitors on Red Clover Isoflavone Content. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 192, n. 1, p. 50–54, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-037X.2006.00191.x>>. Acesso em: 23/1/2013). Estudos demonstram que as isoflavonas podem reduzir os teores de colesterol sendo úteis também na prevenção e tratamento de câncer, perda óssea e sintomas associados à

menopausa (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, n. 16, p. 6397–402, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16076124>>. Acesso em: 28/12/2011).

PERRY *et al.* (PERRY, N. S. L.; BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 75, n. 3, p. 651–9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12895683>>. Acesso em: 5/12/2012) em seu trabalho de revisão verificou que os efeitos anticolinesterásico, antioxidante, anti-inflamatório, estrogênico e depressor do sistema nervoso central são indicativos para que o desenvolvimento de um fármaco possa ser empregado para auxiliar no tratamento da Doença de Alzheimer. O trevo-vermelho contém isoflavonas que podem ser capazes de demonstrar grande parte destas atividades.

Atualmente, a maior parte dos estudos sobre isoflavonas está focada no grão de soja que contém apenas genisteína e daidzeína em quantidades apreciáveis, e possuem de 2-10 vezes menor teor de isoflavonas totais que o trevo-vermelho (INSTITUTE FOR ENVIRONMENT AND HEALTH. Phytoestrogens in the human diet. Disponível em: <http://www.sissoe.cranfield.ac.uk/ieh/pdf/w3.pdf>). Extratos de isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A) e cumestanos (cumestrol) derivados da soja (*Glycine max*) e do trevo-vermelho (*Trifolium pratense L.*) são, em muitos países, um dos medicamentos de venda livre mais comercializados (WUTTKE, W.; JARRY, H.; WESTPHALEN, S.; CHRISTOFFEL, V.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 83, n. 1-5, p. 133–47, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12650710>>. Acesso em: 23/1/2013).

Recentemente, no ano de 2009, uma lista com 71 plantas de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) foi divulgada pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, e dentro desta listagem destaca-se o *Trifolium pratense L.*. A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) contém plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. A finalidade desta lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a

elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinadas doenças (MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, Espécies vegetais. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>).

As isoflavonas presente no trevo-vermelho apresentam baixa solubilidade em meios aquosos. Isso pode estar relacionado a uma menor absorção desses compostos quando administrado via oral. Ciclodextrinas são amplamente utilizadas para aumentar a solubilidade e estabilidade do material hospedeiro em várias indústrias devido a fácil formação dos complexos inclusos (HEDGES, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 2035–2044, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848958>>. Acesso em: 23/1/2013). Estes materiais são muito úteis para o aumento da eficácia da liberação dos fármacos e também para a liberação controlada desses (HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced drug delivery reviews**, v. 36, n. 1, p. 125–141, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837712>>. Acesso em: 23/1/2013).

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos de pelo menos seis unidades de D-(+)-glucopiranosose ligadas por ligações α -(1-4). Ciclodextrinas naturais ocorrem na forma de pó cristalino, e formam hidratos estáveis. Elas possuem estruturas um tanto rígidas (estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila C2 e C3) deixando livre rotação nas ligações α -(1-4). As ciclodextrinas possuem a superfície externa hidrofílica e interior hidrofóbico (CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: practical aspects. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 68, n. 3, p. 467–78, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826046>>. Acesso em: 23/1/2013). Durante a ingestão, os glicosídeos de isoflavonas são hidrolisados pela microflora do intestino com a finalidade de formar agliconas livres que são metabolizadas por processos como demetilação e redução. Agliconas de isoflavonas e seus metabólitos são absorvidos e transportados para o fígado, onde os microsossomos catalisam a hidroxilação e conjugação das isoflavonas. Após a conversão em conjugados glucoronatos ou sulfatos

no fígado, os metabólitos são movidos para o plasma, tecidos, ou órgãos, e então excretados através da urina ou bile.

Aumenta ainda mais a importância do desenvolvimento da presente invenção o fato de que a totalidade dos extratos de trevo-vermelho comercializados no Brasil são importados de outros países.

Assim, o presente invento descreve o preparo do extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas e a complexação do mesmo com ciclodextrinas, bem como seu uso como anti-inflamatório.

O trevo-vermelho (*Trifolium pratense L.*) contém as isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, sendo as duas últimas encontradas em maiores concentrações na planta. Acredita-se que essas isoflavonas possam exercer um papel anti-inflamatório conforme já demonstrada previamente por alguns trabalhos.

Yang Zhi et. al. (YANG, Z.; HUANG, X.; ZENG, Y. Effects of red clover extract on the activation and proliferation of mouse T lymphocytes and the NO secretion of mouse macrophages. **Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica**, v. 43, n. 10, p. 1019–24, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19127865>>. Acesso em: 16/2/2012) demonstraram que o efeito de trevo vermelho total possui potente papel anti-inflamatório. Foi demonstrado que doses superiores a 5mg/L já eram capazes de inibir *in vitro* a proliferação celular de linfócitos estimulados por concavalina e inibir a liberação de mediadores inflamatórios como a produção de óxido nítrico. Sendo que somente doses superiores a 100mg/L demonstraram algum efeito tóxico sobre as culturas de células. Esse trabalho é um importante estudo que indica um potencial anti-inflamatório, mas seu uso ficou restrito a cultura de células não demonstrando seu efeito quando administrado via oral.

O extrato do trevo vermelho já é utilizado em medicação em outros países com objetivo terapêutico de controlar os desconfortos causados pela menopausa. Efeito atribuído as isoflavonas presentes no extrato. O medicamento Promensil da empresa Novogen confirma que essa planta pode ser utilizada para tratamentos via oral sem toxicidade.

Algumas patentes encontradas no estado da técnica demonstram a utilização do extrato do trevo vermelho, mas seus métodos de extração diferem do utilizado neste

invento, além disso, nenhuma dessas patentes utiliza o extrato do trevo vermelho para uso oral buscando suas propriedades anti-inflamatórias.

Nenhuma das patentes citadas invalida o invento, de uma forma geral podemos descrever que o presente invento relata um processo de extração diferente de todos apresentando pelas patentes listadas a seguir. O invento ainda propõe um melhoramento na solubilidade do extrato para seu uso via oral in vivo – o encapsulamento com dextrinas – o que possibilita o uso de menores doses para um uso como anti-inflamatório.

GB2483934 (A) – 28/03/2012, “Botanical extracts obtained by subcritical water extraction”. Foi aplicada extração com água supercrítica nos materiais botânicos (*Scutellaria baicalensis*, *Hypericum perforatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Melissa officinalis*, *Trifolium pratense*, *Sophora flavescens*, *Crataegus spp.*, *Pueraria lobata*, espécies de *Cimicifuga*, espécies de *Paeonia*, ou outras espécies relacionadas) para gerar materiais para serem usados como agentes anti-inflamatórios e como agentes de controle da matriz de metaloproteinase exemplificadas como elastase e colagenase. Este extrato pode ser incorporado em uma formulação tópica que pode ser útil na redução da inflamação da pele ou para reduzir a aparência do envelhecimento cutâneo pela redução das enzimas proteolíticas elastase e colagenase; este também pode ser usado como um adjuvante no tratamento do câncer de pele.

GB2480459 (A) - 23/11/2011, “Subcritical water extraction methods and apparatus”. A presente patente consiste em um método para o preparo de um extrato contendo constituintes farmacologicamente ativos de certas ervas usadas tradicionalmente na medicina, compreende a redução do tamanho de partícula do material vegetal fresco, extraíndo este material botânico com água supercrítica e então removendo a água para formar um extrato farmacológico. Os materiais botânicos podem ser: espécies de *Cimicifuga*, *Paeonia*, *Uncaria*, *Aesculus hippocastanum*, *Tribulus terrestris*, *Angelica radix*, *Fagopyrum esculentum*, *Calendula officinalis*, *Centella asiatica*, *Trifolium pratense*. O extrato pode ser formulado como um sistema de liberação de droga auto-emulsionante com a finalidade de aperfeiçoar a biodisponibilidade dos constituintes ativos.

GB2471293 (A) - 29/12/2010, “The extraction of pharmacological agents from medicinal herbs using subcritical water”.

A presente patente consiste em um método de extração contendo ativos farmacologicamente ativos usados na medicina tradicional, a extração do material vegetal fresco com água supercrítica e então a água é removida para formar o extrato farmacêutico. As plantas medicinais podem ser: *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Trifolium pratense*, *Calendula officinalis* ou *Hypericum perforatum*. Estes extratos provenientes da extração com água supercrítica podem ser similares em composição aos extratos obtidos com extração metanólica. Este extrato pode ser formulado como um sistema de liberação de droga auto-emulsionante com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade dos constituintes ativos.

Os processos de extração dos documentos acima são diferentes do processo de extração proposto nesta invenção.

PI0210262-5 (A2) – 10/04/2002, “Formulação Farmacêutica, seu Uso e Método para sua Fabricação”. Esta patente descreve a utilização do extrato seco em um composto farmacêutico na forma de comprimido associado a sal de cálcio.

JP2007176878 (A) – 12/07/2007, “NF-kappaB Activation Inhibitor and External Preparation Composition Containing the Same”. Esse documento propõe um produto que tem como finalidade inibir a molécula do NFkB (fator de transcrição nuclear) utilizado para inibir sintomas do fotoenvelhecimento. Entretanto, não descreve o processo de extração utilizado, não relata nenhum melhoramento no extrato bruto.

GEP20053591 - 25/07/2005, “Pharmaceutical Formulation Consisting of Plant Dry Extract with Calcium Coating”. Esta patente descreve a utilização de uma formulação farmacêutica que contém entre outros extratos o extrato seco do trevo vermelho (sem nenhum melhoramento na extração) para utilização como repositor hormonal – análogo ao estradiol essa formulação é revestida com cálcio e indicada para tratamento de doenças como osteoartrite.

EP1541158 - 15/06/2005, “Antioxydant composition for oral or topical administration”. Não descreve o processo de extração utilizado, não relata nenhum melhoramento no extrato bruto. Relata o uso de um composto que prevê dentre outros

componentes o extrato do trevo-vermelho, mas conforme descrito no início, sem melhoramento da solubilidade. Esse composto resultante deste invento visa um efeito antioxidante e amenizador dos efeitos da menopausa.

WO9918927- 22/04/1999, “Compositions for cosmetic and dermopharmaceutical use containing a plant extract obtained from clover (*Trifolium SP.*)”. Esta patente não relata o método de extração e seu uso previsto é para compostos dermofarmacêuticos com efeitos desejados sobre consequências da menopausa – imitando efeitos esteroides.

US2012077874 - 29/03/2012, “Development of a phytoestrogen product for the prevention or treatment of osteoporosis using red clover”. Essa patente descreve a determinação de uma forma farmacêutica utilizando o extrato do Trevo-vermelho com padronização da concentração de isoflavonas presente nas formulações. Seu uso descrito é para osteoartrite.

US2011229538 - 22/09/2011, “Topical skin care composition”. Esta patente não relata o processo de extração, aparentemente o extrato é comprado de forma comercial. Seu uso descrito do composto gerado é tópico.

US2008131534 - 05/06/2008, “Use of a plant extract or plant juice”. A patente não relata o uso de qualquer método de extração, o que fica implícito o uso da planta bruta. Além disso, o invento descreve seu uso associado a demais extratos de plantas para patologias associadas à síndrome metabólica.

CN1981799 - 20/06/2007, “Preparing method for extracts of red clover”. O método descreve a preparação de um extrato seco rico em isoflavonas do trevo-vermelho através de maceração com etanol.

US2007036742 - 15/02/2007, “Methods and compositions for modulating hair growth or regrowth”. A presente invenção compreende o uso de diversas espécies de plantas, substâncias isoladas ou extratos, incluindo o trevo vermelho, para a modulação do crescimento ou recrescimento capilar.

CN1876010 - 13/12/2006, “Preparation method of estrogen activity-possessed red clover extractive and extractive thereof”. A presente patente descreve um processo de preparação de um extrato de *Trifolium pratense* com atividade estrogênica. O preparo deste extrato consiste nos seguintes passos: 1) extração com etanol e concentração; 2) adição de 10-30% de solução alcoólica e agente clarificante, agitação até

homogeneização e decantação; 3) passagem do sobrenadante por colunas de resina de adsorção macroscópica, eluindo com etanol; 4) recuperação do etanol do eluente e diluição com água destilada até concentração de álcool 10-20%, passagem por coluna de poliamida eluída com etanol, concentração do solvente por vácuo até obtenção de um pó dourado.

RU2279287 - 10/07/2006, “Hemorheological agent and method for its preparing”. Esta invenção trata do desenvolvimento de preparações de origem vegetal que mostram efeito sobre os índices de reologia do sangue. Estas preparações são feitas a partir do extrato alcoólico de trevo-vermelho a partir da planta fresca e podem ser na forma de líquido ou extrato seco. O extrato de trevo-vermelho preparado pode ser usado no tratamento de pacientes com doenças cardiovasculares e outras doenças através da redução da viscosidade do sangue, a agregação espontânea de elementos sanguíneos formados e aumentar a capacidade de deformação dos eritrócitos. O agente proposto pode ser utilizado no tratamento de doenças que acompanham a síndrome de maior viscosidade do sangue (doença cardíaca isquêmica, doenças cérebro vasculares e assim por diante).

WO2006021007 - 23/02/2006, “Effervescent composition including alternative hormone replacement therapy agen”. A invenção compreende uma composição efervescente para o alívio dos sintomas da menopausa. Essa preparação contém, pelo menos, 0,5% em peso de um extrato de ervas selecionadas, incluindo o trevo-vermelho, em combinações com, pelo menos 0,1% de isoflavonas da soja, 0,1% em peso de N-acetilcisteína e um agente efervescente que incluem um ácido e uma base.

CN1709886 - 21/12/2005, “Method for extracting total isoflavone from herb of red clover”. A presente invenção descreve um tipo de método de extração de isoflavonas totais do trevo-vermelho. A extração é feita a partir das folhas secas e trituradas sob-refluxo com etanol, após, é feita extração com éter de petróleo ou óleo de extração e secagem do resíduo. Adiciona-se novamente etanol ao resíduo seco e novamente coloca-se sob-refluxo até a formação de cristal e adiciona-se óxido de alumínio. Em seguida lava-se o óxido de alumínio com água e a água é saturada com acetato de etila para a obtenção de uma solução concentrada. Após secagem sob vácuo obtêm-se as isoflavonas totais.

CN1683381 - 19/10/2005, “*Trifolium pratense* extract and preparing method”. A invenção relaciona-se com o extrato de trevo-vermelho e seu processo de preparação. O extrato é obtido a partir da extração com etanol e purificação e detecção por CLAE. O extrato possui quantidades não inferiores a 12% em formononetina e sophoricol. Também descreve o método de controle de qualidade da planta.

NZ515182 - 26/03/2004, “Extraction of biologically active compounds from plant material using acid and antioxidant”. São revelados métodos de extração de compostos biologicamente ativos de materiais vegetais, incluindo o trevo-vermelho, a partir da redução do tamanho de partícula do material botânico, mistura em solução contendo água, ácido e um composto antioxidante e separação do resíduo sólido.

LT2004002 - 25/03/2004, “Pharmaceutical formulation consisting of a plant dry extract with a calcium coating”. A invenção refere-se a uma formulação farmacêutica constituída de um sal de cálcio e um extrato de planta seca (podendo ser o trevo-vermelho) fornecido sob a forma de um comprimido revestido que possui um núcleo que compreende pelo menos um extrato de planta seca delimitado por pelo menos uma camada de pelo menos um sal de cálcio.

CN1439367 - 03/09/2003, “Pratensein extraction and preparation thereof”. Um extrato de trevo-vermelho é preparado através da extração em metanol ou álcool, filtração, concentração, separação em centrífuga, retirada do óleo e secagem com éter de petróleo ou n-hexano, extração com acetato de etila, concentração e cristalização. A seguir é feita uma extração dos sedimentos obtidos, recuperação do solvente para obtenção de um líquido concentrado, regulação do pH, separação por resina microreticular. Este extrato pode ser usado juntamente com Epimedium, VB1 e VB6 para preparar o medicamento para prevenir e tratar o câncer da mama, câncer da próstata, câncer do cólon, osteoporose e síndrome climatérico.

O presente invento propõe um método de extração das partes aéreas da planta *Trifolium pratense* diferenciado dos existentes supracitados e com um diferencial sobre a complexação deste extrato com ciclodextrinas, o que ocasiona uma solubilidade maior do produto em solução aquosa. Essa técnica de encapsulamento com ciclodextrinas melhora o desempenho do extrato do *Trifolium pratense* utilizado neste invento para seu

uso anti-inflamatório, sendo possível obter resultados satisfatórios com doses menores do que as obtidas com o extrato não encapsulado.

Esse diferencial pode ser um ganho para confecção de um produto farmacêutico com melhor absorção e menor toxicidade.

Descrição da Invenção

O objeto da presente invenção consiste em um processo para viabilizar a obtenção de extratos, preferentemente secos, de hidrodispersibilidade homogênea em água, a partir de uma extração com solventes, preferentemente empregando soluções extrativas hidroetanólicas de *Trifolium pratense* (trevo-vermelho) e *Trifolium riograndenses* e seu encapsulamento com ciclodextrinas.

É ainda objeto da presente invenção o uso do extrato como anti-inflamatório para ser ministrado via oral.

O processo da presente invenção compreende, mais especificamente, as seguintes etapas:

- a) preparo do extrato seco do trevo-vermelho rico em isoflavonas;
- b) encapsulamento com ciclodextrinas;

Preparo do extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas

O extrato seco preparado a partir de partes aéreas de *Trifolium pratense* ou *Trifolium riograndense*, é obtido através de extrações repetidas com álcool. Preferencialmente *Trifolium pratense*. Primeiramente coleta-se o material vegetal e o mesmo é seco e triturado. Após, o material é macerado com uma solução alcoólica contendo álcoois de 1-4 carbonos na concentração de 10 a 100% v/v e deixado em repouso durante 1 a 15 dias. O recipiente contendo a mistura é reservado em temperatura na faixa compreendida do ambiente a 60°C. Preferencialmente, o material pode ser macerado em etanol 40% v/v e deixado em repouso à temperatura ambiente por três dias. Após o período de repouso a mistura é filtrada e o solvente retirado. Essa operação deve ser repetida até esgotamento das isoflavonas no material vegetal, que pode ser feito com o auxílio de cromatografia líquida de alta eficiência. O solvente filtrado é evaporado em evaporador rotatório para a diminuição do volume. O restante obtido após a evaporação é extraído com solvente orgânico mais apolar, como diclorometano, acetato de etila, clorofórmio, éter, éter de petróleo, sendo preferido o diclorometano. A fração extraída é

posteriormente concentrada em evaporador rotatório até a evaporação total do solvente. O resíduo da evaporação é congelado e seco em liofilizador. O resíduo seco é o extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas (cerca de 20% de isoflavonas).

Encapsulamento do extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas com ciclodextrinas

A partir do extrato seco rico em isoflavonas é realizado o encapsulamento com ciclodextrinas. Uma quantidade em excesso de isoflavonas, calculadas no extrato seco (1M) dispersa em 10,0 mL de solução aquosa contendo concentrações crescentes de ciclodextrinas (β -ciclodextrina, Hidroxipropil β -ciclodextrina) em relações molares de 0,25M até 5M. Preferencialmente a β -ciclodextrina em relação molar de 1:1. As suspensões são mantidas sob agitação, em banho de água termostaticado, em temperatura que vai de ambiente a 70°C, durante 6 a 72 horas. Preferencialmente temperatura 50°C, durante 24 h. Após, a suspensão é liofilizada e o resíduo seco é o extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas encapsulado com β -ciclodextrina.

Potencial anti-inflamatório e antinocepcivo

O potencial anti-inflamatório via oral foi demonstrado com a utilização do modelo de monoartrite induzida por mBSA em camundongos Balb-c – amplamente utilizado pela literatura (OLIVEIRA, P. G.; GRESPAN, R.; PINTO, L. G.; et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 63, n. 10, p. 2956–65, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953084>>. Acesso em: 28/3/2012.) tratados via oral com o extrato do trevo-vermelho obtido nas preparações descritas previamente no seu estado encapsulado e não encapsulado.

Desenvolvemos um modelo de monoartrite amplamente descrito e utilizado pela literatura mundial em camundongos Balb-c por imunizações com a proteína metilada bovina (mBSA) em um esquema de três injeções subcutâneas administradas uma vez por semana por três semanas (dia 0; dia 7 e dia 14), sendo a primeira composta por 500 mg da proteína mBSA em uma emulsão de 0,1 ml de adjuvante completo de Freund e 0,1 ml de solução salina estéril (0,9% de cloreto de sódio), a segunda e terceira foi realizada com a mesma concentração de proteína, mesma concentração de solução

salina estéril e mesma concentração de adjuvante, porém nestas utilizamos adjuvante incompleto de Freund's.

O desafio da imunização para posterior avaliação do processo inflamatório decorrente deste foi feito em uma das articulações fêmoro-tibial com injeção intra-articular da proteína utilizada nas imunizações diluída em solução salina estéril em uma concentração de 30 µg por articulação. Para controle do experimento, articulação contra-lateral (não desafiada) foi utilizada.

O tratamento com extrato do trevo-vermelho encapsulado com ciclodextrina foi administrado duas vezes ao dia, dois antes do desafio intra-articular por via oral diluído em solução salina. As doses testadas foram de 100, 50, 25 e 12,5 mg/kg. Um grupo de animais foi tratado com o veículo do tratamento (solução salina) para fins de controle, este grupo denominamos controle positivo nos gráficos.

Decorridas 24h do desafio intra-articular feito com a proteína mBSA realizamos a lavagem da articulação induzida (e contra-lateral – controle do experimento) com uma solução de PBS-EDTA. Neste ponto, após a morte do animal, foi determinada a migração de neutrófilos na articulação – demonstrando assim um processo inflamatório agudo.

Foi significativamente menor a migração de neutrófilos para as articulações desafiadas nos animais tratados com o extrato do trevo-vermelho complexado com ciclodextrina nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg.

O mesmo experimento foi realizado com a modificação do tratamento que foi feito com o extrato do trevo-vermelho não encapsulado com ciclodextrina e neste experimento foi identificada uma diferença significativa na migração de neutrófilos para a articulação desafiada conforme foi verificado com o extrato complexado, entretanto a dose efetiva do extrato complexado foi superior a dose do extrato não complexado. Demonstrando assim que o processo de cicloencapsulamento melhora o efeito anti-inflamatório encontrado no extrato do trevo-vermelho.

Neste mesmo modelo, foi testado o potencial antinocepcivo do extrato do trevo-vermelho. Para isso os animais foram submetidos ao teste do aparelho Von Frey utilizado previamente para este fim conforme literatura prévia (OLIVEIRA, P. G.; GRESPAN, R.; PINTO, L. G.; et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the

gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 63, n. 10, p. 2956–65, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953084>>. Acesso em: 28/3/2012). Com este equipamento medimos o reflexo da retirada da pata relacionado à força aplicada nela e conseguimos verificar que os animais tratados com extrato do trevo-vermelho via oral tiveram uma maior força aplicada na pata para o reflexo. Demonstrando assim que o extrato do trevo-vermelho foi capaz de ter uma ação sobre a nocicepção dos animais.

Com alguns experimentos em culturas de células conseguimos reforçar o efeito anti-inflamatório e baixa toxicidade do extrato do trevo-vermelho. Utilizamos os ensaios de linfoproliferação e viabilidade celular para estes fins. Para estes ensaios diluímos o extrato do trevo-vermelho em dimetilsulfóxido (DMSO) buscando a sua melhor diluição para experimentos com culturas de células em uma concentração máxima de 0,1% de DMSO – que foi utilizada como controle em todos os experimentos. Conforme descrito a seguir.

Experimentos sobre cultura de linfócitos

Teste de viabilidade linfocitária

Teste de viabilidade linfocitária foi realizado para avaliar a citotoxicidade do extrato do trevo-vermelho usando ensaio colorimétrico de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] descrito por (2). Os animais foram sacrificados e seus linfonodos drenantes (poplíteo e inguinal) foram removidos assepticamente. Uma suspensão única de células foi preparada, cultivada em triplicatas (5×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços) e tratada com extrato do trevo-vermelho nas doses (0,001 mg/ml; 0,005 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,05 mg/ml e 0,1 mg/ml) por 48h a 37 °C em 5% CO₂ em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino e antibiótico. Após o período de incubação, o MTT (0.5 mg/ml) foi adicionado em cada poço, e a placa retornou a estufa e ao final de 4h, o sobrenadante foi removido e 50 µl de DMSO foi adicionado. Após a placa ser agitada para dissolver os cristais de formazam de MTT, a densidade óptica (OD) de cada poço foi lida em 570nm usando um leitor de microplaca de ELISA. Conforme demonstrado na figura 3, o extrato do trevo-vermelho nas doses de 0,001 a 0,1 mg/ml não alterou a viabilidade celular de linfócitos. Não existe diferença significativa na absorbância entre os grupos.

Teste de proliferação linfocitária in vitro e ex-vivo

Proliferação in vitro de linfócitos foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT descrito por (2). Camundongos BALB/c foram mortos e seus linfonodos drenantes foram retirados assepticamente. Uma suspensão única de células foi preparada, cultivada em triplicatas (5×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços) e tratada com extrato do trevo-vermelho nas doses de 0,001 mg/ml; 0,01 mg/ml e 0,1 mg/ml por 48h a 37 °C em 5% CO₂ em meio RPMI contendo 5 mg/ml de concanavalina A (ConA) ou apenas meio RPMI para controle de cultura. Após o período de incubação, o MTT (0.5 mg/ml) foi adicionado em cada poço, e a placa retornou a estufa e ao final de 4h o sobrenadante foi removido e 50 µl de DMSO foi adicionado. Após a placa ser agitada para dissolver os cristais de formazan a densidade óptica de cada poço foi lida a 570 nm.

A estimulação da molécula do ConA foi eficaz conforme demonstrado pelo gráfico da Figura 4. O extrato do trevo-vermelho foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos estimulada pelo ConA nas doses de 0,1 mg/ml e 0,01 mg/ml. Assim, conclui-se que o extrato do trevo-vermelho possui efeito sobre a inibição da proliferação de linfócitos T (via estimulada pela molécula do ConA).

Um experimento semelhante a esse ajudou a confirmar o efeito do extrato do trevo-vermelho sobre a proliferação de linfócitos. Retiramos os linfonodos dos animais tratados com o extrato do trevo-vermelho nas doses de 100 mg/kg e 50 mg/kg e animais controles, isolamos os linfócitos (retirados dos linfonodos e estes nas mesmas condições de estimulação descritas acima).

Verificamos que os linfócitos dos animais tratados com o extrato do trevo-vermelho proliferaram menos (não há diferença significativa entre as células com estímulo e sem estímulo) do que os linfócitos dos animais não tratados com o estímulo da molécula ConA (Figura 5).

Descrição detalhada das figuras:

Figura 1: Experimento migração de neutrófilos em modelo de monoartrite

Figura 2: Experimento nocicepção em modelo de monoartrite

Figura 3: Experimento de viabilidade celular de linfócitos

Figura 4: Experimento de linfoproliferação *in vitro*

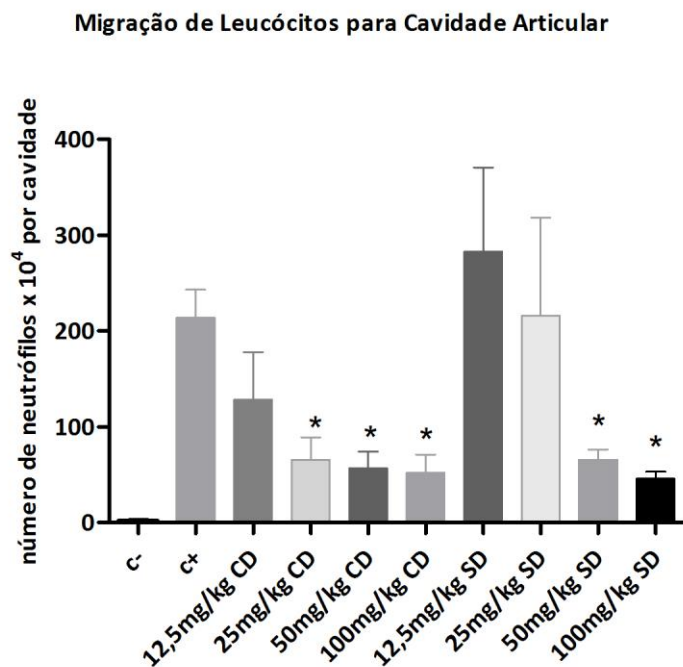
Figura 5: Experimento de linfoproliferação *ex vivo*

Reivindicações

1. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
 - i) preparo do extrato seco do trevo vermelho rico em isoflavonas
 - ii) encapsulamento do dito extrato com ciclodextrinas
2. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso Via oral como anti-inflamatório de acordo com a etapa (i) da reivindicação 1, **caracterizado por**:
 - a) macerar o material seco com uma solução alcoólica contendo álcoois de 1-4 carbonos na concentração de 10 a 100% v/v e deixado em repouso de 1 a 15 dias na temperatura do ambiente a 60°C, preferencialmente utiliza-se etanol 40% v/v e deixa-se o material em repouso por três dias a temperatura do ambiente
 - b) filtração e secagem do solvente
3. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** repetição exaustiva do processo de extração a) e b) até o esgotamento das isoflavonas no material vegetal.
4. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório de acordo com a etapa b) da reivindicação 2, **caracterizado por** reduzir significativamente o volume do solvente, seguida de uma extração com um solvente orgânico mais apolar e depois a secagem completa do extrato.
5. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório de acordo com a etapa b) das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado pelo** resíduo da extração ser congelado e seco em liofilizador.
6. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório de acordo com a etapa (ii) da reivindicação

- 1, **caracterizado pelo** encapsulamento do extrato seco rico em isoflavonas compreender:
- i) uma dispersão do extrato seco em uma solução aquosa contendo ciclodextrinas em razões molares de 0,25 – 5,00 M
 - ii) agitação em banho de água termostaticado em temperaturas do ambiente a 70°C durante 6 a 72 horas
 - iii) liofilização e secagem do resíduo
7. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório, **caracterizado por** utilizar o extrato do trevo vermelho in natura, ou em quaisquer formulações farmacêuticamente aceitáveis encapsulado com ciclodextrinas ou não.

Figuras



Legenda:

c - : controle negativo, injeção de salina via ia

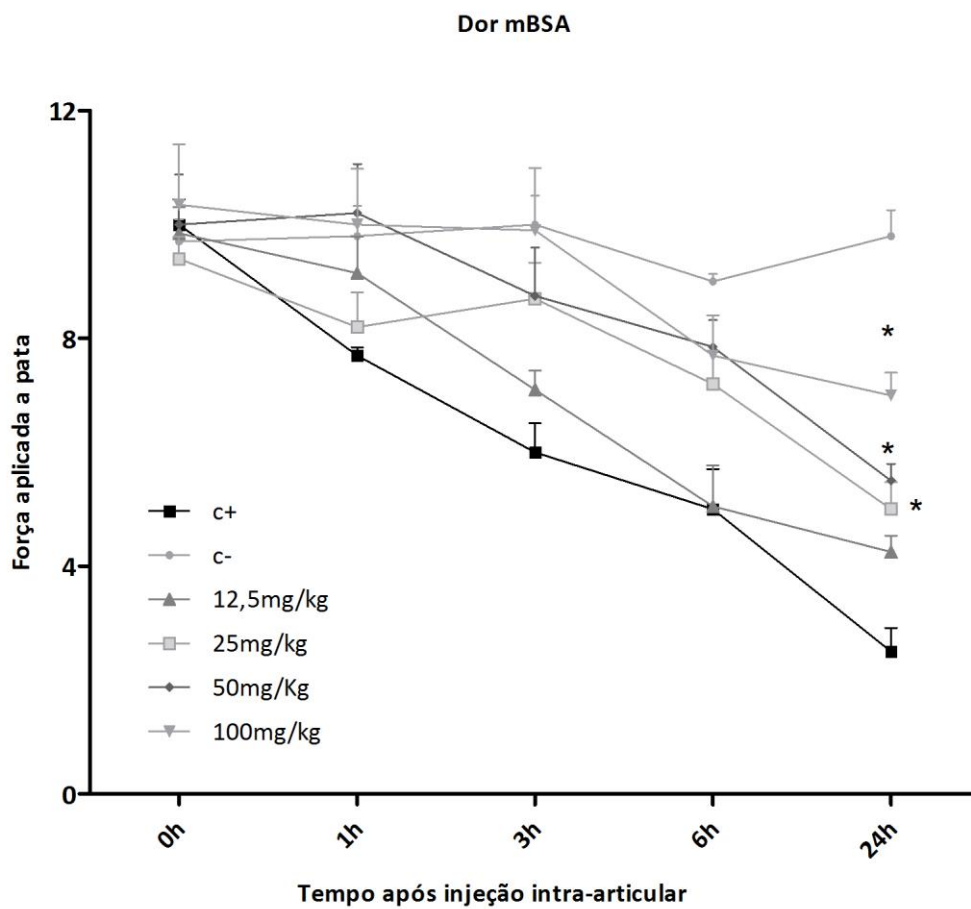
c +: animais tratados com salina

CD: extrato do trevo-vermelho complexado com com β -ciclodextrina

SD: extrato do trevo-vermelho não complexado

* : diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$)

Figura 1:



Legenda:

c - : controle negativo, injeção de salina via ia

c +: animais tratados com salina

Tratamento com extrato do trevo-vermelho complexado

* : diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$)

Figura 6:

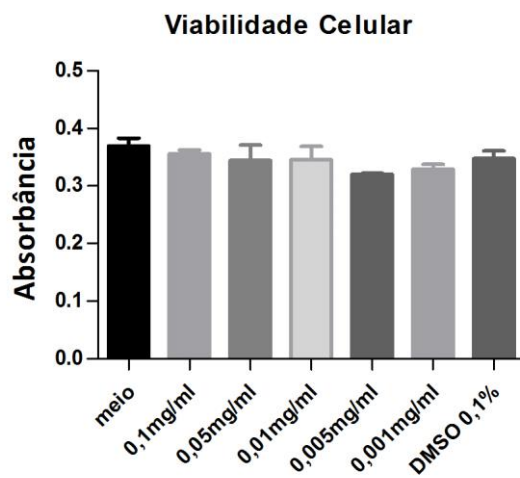
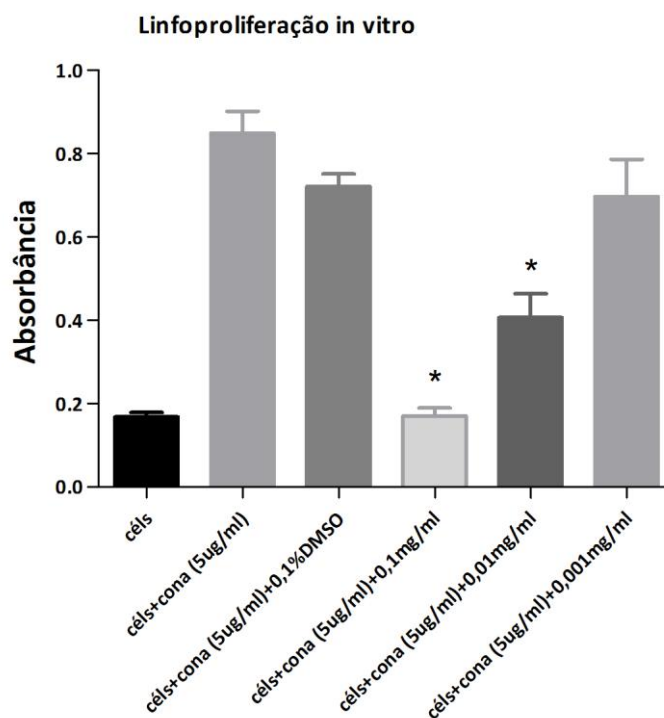


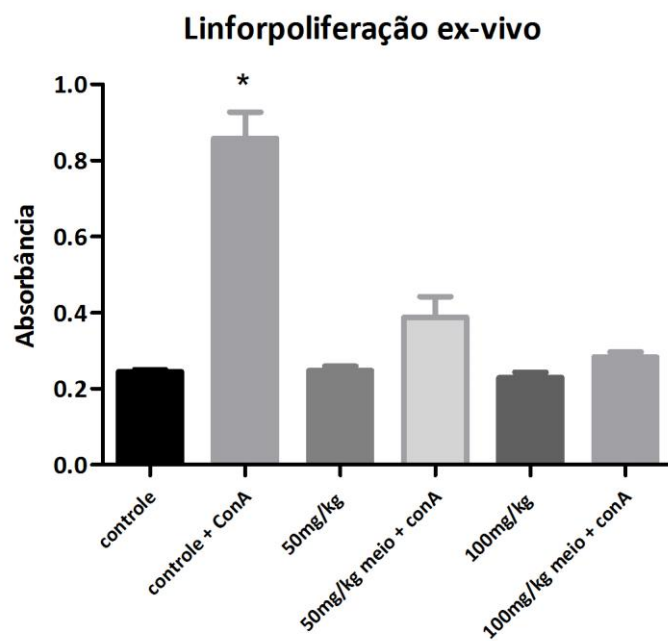
Figura 7:



Legenda:

* : diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$)

Figura 8:

**Legenda:**

* : diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$)

Figura 9:

Resumo

PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DO TREVO-VERMELHO ENRIQUECIDO COM ISOFLAVONAS E SEU USO VIA ORAL COMO ANTI-INFLAMATÓRIO

A presente invenção descreve um processo de obtenção do extrato do *Trifolium pratense*, popularmente conhecido como trevo vermelho. O extrato descrito na presente invenção possui frações ricas em isoflavonas e pode ser eficientemente utilizado como base de formulações farmacêuticas e também com efeito anti-inflamatório. O extrato, além de tudo, pode ser opcionalmente complexado com ciclodextrina para aumentar a solubilidade deste em água.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 Conclusão

O extrato do trevo-vermelho administrado via oral em camundongos com modelo de artrite induzida por antígeno demonstrou efeito anti-inflamatório e imunomodulador através da redução de neutrófilos e redução da dor (nocicepção). Ainda demonstramos que quando o extrato é complexado a ciclodextrinas menores doses podem ser administradas obtendo os mesmos efeitos.

Mostramos ainda que em ensaios de proliferação de linfócitos *in vitro* o extrato do trevo-vermelho foi capaz de reduzir a proliferação das células tanto em experimentos *in vitro* quanto em experimentos *ex vivo*. E também que esses efeitos são dose-dependente.

7.2 Perspectivas

O processo inflamatório é complexo e envolve a liberação de diversos mediadores e o envolvimento de inúmeras células do sistema imune. Apesar de existir uma gama de medicamentos utilizados para controlar a inflamação, o uso dos mesmos ainda acarreta na incidência de efeitos adversos.

O extrato do trevo-vermelho enriquecido em isoflavonas foi capaz de inibir a inflamação nos modelos trabalhos. Acreditamos que esse mecanismo possa envolver a inibição da enzima da cicloxigenase 2 ou que os compostos presentes nesse extrato sejam ativadores do PPAR, uma vez que esses mecanismo já foram elucidados como possíveis alvos para ação desse extrato.

É nesse contexto que daremos continuidade a essa linha de pesquisa. Nossos futuros objetivos são avaliar o real mecanismo de ação pelo qual encontramos esses efeitos. Para isso, faremos o estudo das rotas de ativação das enzimas cicloxigenase 1 e 2, a ativação do PPAR e ainda a dosagem de mediadores inflamatórios, como citocinas e prostaglandinas, liberados pelas células quando estimuladas pela inflamação.

Além disso, pretendemos avaliar a eficácia desse extrato em outros modelos in vivo de inflamação como, por exemplo, o modelo de poliartrite induzida por colágeno e o modelo de colite.

E por fim, trabalhando junto a Faculdade de Farmácia da UFRGS transformar esse extrato em uma forma farmacêutica. E dessa forma farmacêutica avaliar parâmetros de farmacocinética.