

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Avaliação do teor de isoflavonas em medicamentos contendo extrato de *Trifolium pratense L.*

Mairique Waszczuk

Porto Alegre, Novembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Avaliação do teor de isoflavonas em medicamentos contendo extrato de *Trifolium pratense L.*

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado por Mairique Waszczuk  
para obtenção do título de  
Farmacêutico.**

Orientadora: Prof. Dra. Valquíria Linck Bassani

Coorientadora: Simony Martiny

Porto Alegre, Novembro de 2016.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Prof. Dra.Valquiria Linck Bassani, pelo acolhimento em seu laboratório, assistência desde a escolha do tema até os detalhes finais do trabalho, pela orientação, dedicação e por todos os ensinamentos.

À minha coorientadora Farm. Ma.Simony Martiny pelo auxílio, dedicação e amizade.

Ao professor Dr. Martin Steppe, a Farm. Dra Marina Cardoso Nemitz e a Farm. Ma. Sara Elis Bianchi pelas contribuições feitas no estudo.

Aos meus pais, Dionísio e Marinês, pelo apoio incondicional, amor e incentivo ao estudo, sem os quais nada disso seria possível, meu eterno agradecimento.

Ao meu irmão, Renan, pelo amor, auxílio e companheirismo da vida toda.

Ao meu namorado, Jorge Henrique, pelo incentivo, companheirismo e paciência.

Aos meus colegas e amigos, sem os quais seria muito mais difícil chegar até aqui.

O presente trabalho foi elaborado no formato de artigo segundo as normas de publicação da Revista Brasileira de Farmácia apresentadas em anexo.

1 **Avaliação do teor de isoflavonas em medicamentos contendo extrato de**

2 ***Trifolium pratense* L.**

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

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

5

6 **Resumo:** O *Trifolium pratense* apresenta como isoflavonas majoritárias a  
7 formononetina, biochanina A, daidzeína e genisteína, conhecidas como fitoestrógenos, sendo  
8 capazes de interagir com receptores estrogênicos biológicos. Estes constituintes são utilizados  
9 pela população no alívio dos sintomas da menopausa, mas diversos outros efeitos benéficos  
10 lhes tem sido atribuídos. Medicamentos contendo extrato da espécie são disponíveis na forma  
11 de especialidades farmacêuticas e manipulados sob demanda. O presente trabalho tem por  
12 objetivo avaliar o perfil qualitativo e o teor das isoflavonas majoritárias de *Trifolium pratense*  
13 em medicamentos disponíveis em drogarias e farmácias de manipulação, verificando se  
14 apresentam a quantidade de isoflavonas totais declarada no rótulo. Um total de cinco  
15 medicamentos foram analisados, sendo dois industrializados e três manipulados. O  
16 doseamento destes foi realizado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. O  
17 método foi co-validado e demonstrou-se preciso, exato, linear na faixa de concentração  
18 avaliada (0,5 – 10 µg/mL), específico e com baixo efeito de matriz. Os medicamentos  
19 industrializados apresentaram quantidades de isoflavonas totais (IT) de acordo com o  
20 declarado na embalagem e perfil qualitativo correspondente ao descrito na literatura. Os  
21 medicamentos manipulados revelaram a presença de isoflavonas majoritárias em proporções  
22 atípicas e quantidades de IT fora dos limites de aceitação.

23

24 **Palavras-chave:** Isoflavonas, *Trifolium pratense*, fitoestrógenos, fitoterápicos,  
25 controle de qualidade.

26

27           **Abstract:** *Trifolium pratense* is a herbal species which presents as its major  
28 isoflavones formononetin, biochanin A, daidzein and genistein. These isoflavones are known  
29 as phytoestrogens since they are able of interacting with biological estrogen receptors. Herbal  
30 extracts from this species have been used for relieving the symptoms of menopause, but  
31 several other beneficial effects have been attributed to its main isoflavones. The drugs  
32 containing extracts of the species are available as industrial proprietary products or  
33 compounding on demand. The present study has the aim evaluating the qualitative profile and  
34 the content of the major isoflavones of *Trifolium pratense* in medicines available in  
35 drugstores (industrial products) and compounding products, verifying if they present the  
36 amount of total isoflavones declared in the label. A total of five drugs were analyzed, being  
37 two industrialized and three compounded in pharmacies. The dosing of them was performed  
38 using high performance liquid chromatography. The method was co-validated and has  
39 demonstrated to be precise, accurate, linear, in the evaluated concentration range (0.5-10  
40 µg/mL), specific and with low matrix effect. Industrialized drugs presented total isoflavone  
41 (TI) amounts as stated on the labels and qualitative profile corresponding to that described in  
42 the literature. All the compounded products revealed the presence of major isoflavones in  
43 atypical proportions and quantities of total isoflavones out of the acceptance limits.

44

45           **Keywords:** Isoflavones; *Trifolium pratense*, phytoestrogens, herbal medicines, quality  
46 control.

47 **1.Introdução**

48 Com o aumento da expectativa de vida da população observa-se concomitante  
49 aumentada prevalência de doenças crônicas relacionadas à idade (Coxam, 2005). As mulheres  
50 passam importante parte da vida na pós-menopausa (Campos *et al.*, 2005), expondo-se mais  
51 às conseqüências deletérias do hipoestrogenismo (Eichholz, Mahavni & Sood, 2002; Baracat,  
52 Haida & Lima, 1991). O hipoestrogenismo pode causar diversos distúrbios como doenças  
53 cardiovasculares, doença de Alzheimer, câncer de mama e de endométrio, osteoporose,  
54 alterações urogenitais, distúrbios cognitivos, perda de massa óssea, sintomas vaginais e  
55 vesicais, entre outros (Yabur, 2006; Ewies, 2002; Navarro *et al.*, 2001). O sistema imune  
56 também pode ser comprometido depois da menopausa pelos efeitos da idade e da diminuição  
57 das concentrações de estrogênio, considerado um imunomodulador (Ryan-Borchers, 2006).

58 Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis presentes em relativa  
59 abundância entre os metabólitos secundários de diversas espécies vegetais. (Simões; 2001),  
60 sendo as isoflavanosuma de suas principais subclasses. (Sato *et al.*, 1996).

61 Os isoflavonóides estão presentes principalmente na família *Leguminosae* e  
62 apresentam estrutura química semelhante ao 17  $\beta$ -estradiol, sendo capazes de interagir com  
63 receptores estrogênicos presentes nos sistemas biológicos (Setchell *et al.*, 2001). São  
64 considerados moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), com atividade  
65 estrogênica e antiestrogênica (Bedani & Rossi, 2005; Stark & Madar, 2002). As isoflavanos  
66 ligam-se aos receptores estrogênicos distribuídos principalmente nos ossos, cérebro, endotélio  
67 vascular e bexiga (Paech *et al.*, 1997). Já o estradiol tem maior afinidade por receptores  
68 estrogênicos  $\alpha$ , presentes no tecido mamário e uterino (Kuiper *et al.*, 1998). Por esta razão  
69 acredita-se que estes fitoestrógenos possam exercer efeitos benéficos sem apresentar os  
70 efeitos colaterais indesejados dos estrógenos sintéticos em caso de terapia de reposição  
71 hormonal. (Messina, Gardner & Barnes, 2002).

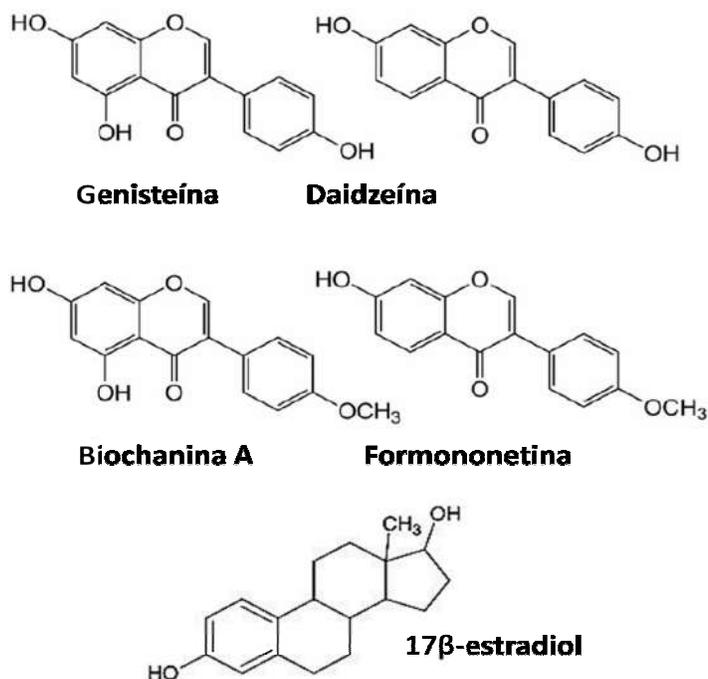
72 Para as isoflavonas exercerem atividade estrogênica, a semelhança do núcleo  
73 estrutural e da posição das hidroxilas à estrutura química do estrogênio é determinante. Há  
74 estudos que demonstram que a metilação dos grupamentos hidroxila resultam na diminuição  
75 do efeito estrogênico (Accorsi-Neto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

77 Além de reduzirem sintomas do climatério (Ghazanfarpour M *et al.*, 2015), as  
78 isoflavonas são referidas por apresentarem atividade antifúngica e antibacteriana (Veitch,  
79 2013), desempenharem papel de proteção frente a doenças cardiovasculares (Han *et al.*,  
80 2002), por haver evidências epidemiológicas sobre a relação positiva entre o consumo de  
81 isoflavonas e a densidade mineral óssea, bem como a melhora cognitiva (Wang *et al.*, 2013;  
82 Lee *et al.*, 2009). Outros estudos tem demonstrado que as isoflavonas apresentam atividade  
83 antioxidante (Carbonel, 2011) e que os fitoestrógenos são benéficos para a hiperlipidemia  
84 após a menopausa (Sirtori, 1995). Apresentam também atividade antiproliferativa (Hirano,  
85 Oka & Akiba, 1989), antiangiogênica (Fotsis *et al.*, 1993), atividade antimutagênica  
86 (Miyazawa *et al.*, 1999) e antitumoral, especialmente para cânceres de mama e próstata  
87 (Wang *et al.*, 2013; Hirota *et al.*, 2000). No Brasil, a ANVISA aprova o uso de isoflavonas  
88 para o tratamento dos fogachos da menopausa e como adjuvante na redução dos níveis séricos  
89 do colesterol. (Brasil, 2002)

90 Grande parte dos estudos sobre isoflavonas está focado na soja (*Glycine max*), mas os  
91 extratos da espécie disponíveis no mercado possuem um teor de isoflavonas totais menor que  
92 o trevo-vermelho. Diferentemente de *Trifolium pratense*, daidzeína, genisteína e gliciteína são  
93 as isoflavonas presentes em maior proporção na soja (Duncan, Phipps & Kurzer, 2003).

94 *Trifolium pratense*, espécie popularmente conhecida como trevo-vermelho, é uma  
95 planta forrageira pertencente à família *Leguminosae* (Engelmann *et al.*, 2009). Essa espécie  
96 contém concentrações importantes de formononetina e biochanina A, isoflavonas metiladas, e  
97 em menor concentração as isoflavonas não metiladas correspondentes, daidzeína e genisteína.

98 A **Figura 1** apresenta as estruturas químicas destas isoflavonas, bem como a sua semelhança  
99 estrutural ao estradiol. (Beck, Rohr & Jungbauer, 2005).



100

101 **Figura 1:** Estrutura química das isoflavonas biochanina A, formononetina, genisteína  
102 e daidzeína e do 17β-estradiol.

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

108 Tendo em vista a importância dos fitoestrógenos e a facilidade de aquisição de  
109 produtos contendo extratos de *Trifolium pratense*, este trabalho tem por objetivo determinar o  
110 teor das isoflavonas majoritárias (formononetina, biochanina A, genisteína e daidzeína)  
111 presentes em medicamentos disponíveis em estabelecimentos farmacêuticos, na forma de  
112 especialidades farmacêuticas ou aviaados sob demanda, observando as proporções entre as  
113 mesmas, bem como se o teor de isoflavonas totais corresponde ao declarado no rótulo do  
114 medicamento.

115 **2. Materiais e métodos**

116 **2.1 Materiais**

117 Os medicamentos comercializados como fontes de isoflavonas de *Trifolium pratense*  
118 analisados foram obtidos em drogarias de Porto Alegre e farmácias magistrais localizadas em  
119 três cidades distintas do Rio Grande do Sul em 2016, totalizando 5 amostras. As amostras  
120 foram denominadas medicamento manipulado 1, medicamento manipulado 2, medicamento  
121 manipulado 3, medicamento referência 4 e medicamento similar 5. Os produtos 4 e 5 são  
122 comercializados na forma de comprimidos revestidos, os demais na forma de cápsulas. Os  
123 medicamentos 2 e 3 têm em comum o mesmo fornecedor de extrato seco de trevo-vermelho,  
124 enquanto o medicamento manipulado 1 é preparado com extrato de outro fornecedor. Para  
125 ambas matérias-primas o fabricante declara conteúdo mínimo de 8% de isoflavonas totais  
126 (IT), e têm como país de origem a China. Todos os medicamentos estavam rotulados para  
127 conter 40 mg de IT/dose.

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

131 Acetonitrila para cromatografia líquida foi obtida da Tedia (EUA) e  
132 ácido trifluoroacético (TFA) da Vetec (Brasil). Água ultrapura foi obtida utilizando sistema  
133 MilliQ™ (Millipore, EUA). Os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico.

134

135 **2.2 Métodos**

136 **2.2.1 Preparo das amostras**

137 Inicialmente foi determinado o peso médio dos comprimidos e cápsulas, de acordo  
138 com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição (Brasil, 2010). Para os medicamentos 1, 2 e 3: foram  
139 pesadas, individualmente, 20 cápsulas. O peso do conteúdo de cada cápsula foi determinado  
140 pela diferença de peso entre a cápsula cheia e a vazia. Com os valores obtidos foi determinado

141 o peso médio do conteúdo e, posteriormente, fez-se uma mistura homogênea com o conteúdo  
142 destas 20 cápsulasde cada medicamento. Para os medicamentos 4 e 5 foram pesados,  
143 individualmente, 20 comprimidos e determinado o peso médio destes; posteriormente foram  
144 triturados em gral com auxílio de pistilo até obtenção de uma mistura homogênea de pó.

145

### 146 **2.2.2 Validação da extração das isoflavonas**

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

152 O equivalente a uma dose do medicamento 4, proveniente da mistura homogênea de  
153 20 comprimidos, foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 200 mL, completou-  
154 se o volume com os solventes testados e submetidos à extração em ultrassom por 10, 20 e 30  
155 minutos. Uma amostra de 5mL do sobrenadante foi retirada e transferida para balão de  
156 volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com os solventes testados. Aliquotas desta  
157 solução foram retiradas e filtradas (através de membrana PTFE -Milipore®- com diâmetro  
158 nominal de poro de 0,45 µm) e injetadas no aparelho de CLAE (Cromatografia Líquida de  
159 Alta Eficiência). Para o tempo e a proporção de solvente que apresentou uma maior extração  
160 das isoflavonas de interesse foi verificado ainda se esta extração foi completa(exaustiva).  
161 Assim, o conteúdo do balão volumétrico de 200 mL foi filtrado (através de membrana PTFE -  
162 Milipore®- com diâmetro nominal de poro de 0,45 µm) e o material retido na membrana foi  
163 extraído com acetato de etila em ultrassom por 30 minutos, sendo repetido o processo com  
164 renovação de solvente por três vezes.O líquido proveniente desta nova extração foi  
165 filtrado,evaporado em rotaevaporador até a secura e o resíduo do balão foi ressuspenso em  
166 acetonitrila para posterior quantificação por CLAE. Foi realizado ainda uma extração

167 adicional da membrana filtrante do último experimento, desta vez com acetonitrila como  
168 solvente por mais 30 minutos em ultrassom. Filtrou-se novamente e analisou-se por CLAE.  
169 Todos os testes realizados em triplicata.

170

### 171 **2.2.3 Análise dos medicamentos**

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

- 176 • Medicamentos 1 e 4:

177 A quantidade correspondente a  $\frac{1}{4}$  da dose foi transferida para balão volumétrico de  
178 50mL com acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetido à extração em ultrassom por 30 minutos,  
179 resultando no que intitulamos de solução extrativa A. Uma alíquota de 0,3 mL desta solução  
180 foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com  
181 acetonitrila:água (1:1, v/v), submetida ao ultrassom por 5 minutos, resultando na solução  
182 extrativa B.

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

- 187 • Medicamentos 2, 3 e 5

188 A quantidade correspondente a  $\frac{1}{4}$  de dose foi transferida para balão volumétrico de  
189 50mL com acetonitrila:água (1:1, v/v) e extraído em ultrassom por 30 minutos. Para a  
190 quantificação das quatro isoflavonas no medicamento 2, alíquotas deste balão foram filtradas  
191 e injetadas no aparelho CLAE. Para os medicamentos 3 e 5, uma alíquota de 0,3 mL foi então  
192 transferida para balão volumétrico de 5 mL, completando-se o volume com acetonitrila:água

193 (1:1, v/v); este balão foi colocado no ultrassom por mais 5 min, a solução foi filtrada e  
194 injetadas no aparelho de CLAE.

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

198

#### 199 **2.2.4 Análise cromatográfica**

200 A análise por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada segundo  
201 método validado por Maito (2015), em um equipamento Shimadzu LC-10 A (Kyoto, Japan)  
202 acoplado a um Detector por Arranjo de Diodos (DAD), controlado por software LC-  
203 SolutionMulti-PDA. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna Phenomenex RP - 18  
204 (SynergiFusion 150 × 4,6 mm) empacotada com diâmetro nominal de partícula de 4 µm e  
205 uma pré-coluna Waters - Milford, MA, EUA(20 × 3,9 milímetros ID; tamanho de partícula,  
206 10 µm). A fase móvel foi constituída por uma fase A composta de acetonitrila, água (20:80  
207 v/v) e 0,01% ácido trifluoracético e uma fase B composta por acetonitrila (100%) e 0,1% de  
208 ácido trifluoracético, com gradiente de eluição de (0-13 min) 20-25% B, (13-18 min) 25-  
209 28,6% B, (18-20 min) 28,6-100% B e (20-27 min) 100-20% B, com fluxo de 1mL/min,  
210 volume de injeção 10 µL, temperatura de 40 °C e detector UV 260 nm. A aquisição do  
211 cromatograma foi realizada até 20 min, pois os últimos 7 min são para limpeza da coluna. O  
212 método foi validado na faixa de concentração de 0,5-10,0 µg/mL para cada uma das quatro  
213 isoflavonas deste estudo..

214

#### 215 **2.2.5 Validação do método de análise por CLAE**

216 A fim de avaliar uma possível interferência dos excipientes frente a metodologia  
217 validada anteriormente por Maito (2015) para extratos de *Trifolium pratense*, foi realizada a

218 co-validação do método para análise de medicamentos a base desta planta contendo diferentes  
219 excipientes.

220

#### 221 **2.2.5.1 Especificidade**

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

229

#### 230 **2.2.5.2 Efeito de matriz**

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

234 Três curvas para cada isoflavona foram obtidas, em três dias consecutivos,  
235 relacionando as áreas dos picos com a concentração de cada aglicona. As curvas das  
236 isoflavonas diluídas em acetonitrila 50% (v/v) foram preparadas nas concentrações de 0,5;  
237 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL e as curvas das isoflavonas diluídas na matriz contendo  
238 extrato de *Trifolium pratense* foram nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL  
239 para que o teor de isoflavonas não saísse da linearidade do método.

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

244 angular da curva analítica das isoflavonas diluídas em acetonitrila 50% (v/v) e Ss: coeficiente  
245 angular da curva analítica das isoflavonas diluídas na matriz do extrato.

246

### 247 **2.2.5.3 Precisão**

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

252

### 253 **2.2.5.4 Linearidade**

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

259

### 260 **2.2.5.5 Exatidão**

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

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

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

270

### 271 **3. Resultados e Discussão**

#### 272 **3.1 Validação da extração das isoflavonas**

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

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

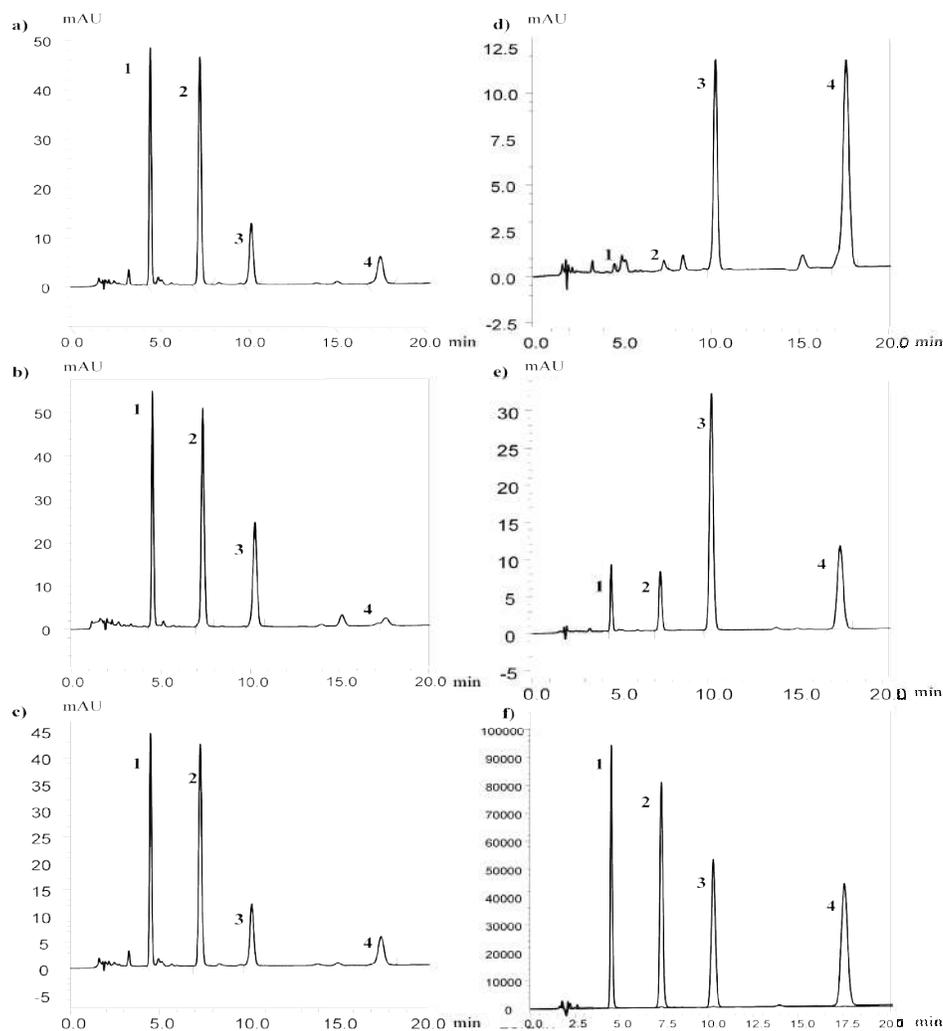
287

#### 288 **3.2 Validação do método**

##### 289 **3.2.1 Especificidade**

290 A especificidade refere-se à capacidade que o método analítico possui de quantificar  
291 um analito mesmo em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de  
292 degradação e componentes da matriz (FDA, 2013). Os cromatogramas referentes aos cinco  
293 medicamentos estão apresentados na **Figura 2**. Os espectros no UV apresentaram-se de

294 acordo com a literatura para as isoflavonas majoritárias de *Trifolium pratense*. (Azimova,  
295 2013). A análise por PDA demonstrou que os picos das quatro isoflavonas de interesse, em  
296 todos os medicamentos, apresentaram pureza situadas entre 0,98 e 1,00.



297 **Figura 2:** a) cromatograma do medicamento manipulado 1; b) cromatograma do medicamento  
298 manipulado 2; c) cromatograma do medicamento manipulado 3; d) cromatograma do  
299 medicamento referência 4; e) cromatograma do medicamento similar 5; f) cromatograma das  
300 isoflavonas de referência (1) daidzeína, (2) genisteína, (3) formononetina e (4) biochanina A.  
301  
302

### 303 3.2.2 Efeito de matriz

304 O efeito de matriz sobre a quantificação das substâncias de interesse foi medido por  
305 meio da análise dos coeficientes angulares das curvas analíticas das substâncias de referência

306 adicionadas ou não à matriz (Yatsu *et al.*, 2014). Realizou-se a análise do efeito de matriz no  
307 medicamento<sup>4</sup>, referência no Brasil, contendo extrato seco de *Trifolium pratense*,  
308 observando-se valores de 12,19% para a daidzeína, 0,75% para genisteína, 2,36% para  
309 formononetina e 3,41% para biochanina A. De acordo com Niessen; Manini& Andreoli  
310 (2006), um método possui baixo efeito de matriz quando os valores encontrados são inferiores  
311 a 20%, denotando que os resultados observados encontram-se abaixo dos limites aceitos.

312

### 313 3.2.3 Precisão

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

318

### 319 3.2.4 Linearidade

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

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

Isoflavona de referência	Equação	$R^2$
Formononetina	$y = 48.591,76x - 3.554,23$	0,996
Biochanina A	$y = 61.175,97x - 5.554,28$	0,996
Daidzeína	$y = 50.789,94x - 921,72$	0,996
Genisteína	$y = 64.490,70x - 2.252,76$	0,997

323

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

327

### 3.2.5 Exatidão

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

333

### 3.3 Quantificação das isoflavonas nos medicamentos

335 A **Tabela 2** apresenta as quantidades de formononetina, biochanina A, daidzeína e  
336 genisteína, bem como a quantidade total de isoflavonas para cada medicamento, analisados  
337 pelo método proposto.

338 **Tabela 2:** Quantidades de isoflavonas presentes em medicamentos contendo extrato de  
339 *Trifolium pratense* analisados por CLAE.

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

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

342

343 Enquanto a análise qualitativa revelou que todas as isoflavonas estavam presentes em  
344 todos os medicamentos, a análise quantitativa revela diferenças importantes entre os mesmos.  
345 No que se refere ao teor de isoflavonas totais, os medicamentos industrializados 4 e 5,

346 apresentaram quantidades totais de isoflavonas dentro dos limites estabelecidos pela Agência  
347 Nacional de Vigilância Sanitária, conforme formulário nacional da farmacopéia brasileira  
348 (2012), onde preconiza que os produtos farmacêuticos devem conter de 90% a 110% do  
349 princípio ativo declarado no rótulo de suas apresentações. O medicamento manipulado<sup>3</sup>  
350 apresentou em torno de 21% a mais de isoflavonas totais que o rotulado, já o medicamento  
351 manipulado 1 apresentou um total de aproximadamente 155% a mais que o rotulado, enquanto  
352 que, o medicamento manipulado 2 demonstrou conter apenas 7,57% de isoflavonas totais em  
353 relação ao especificado no rótulo, muito abaixo do limite aceito para medicamentos.

354 Outro aspecto importante observado foram as proporções das isoflavonas presentes,  
355 nos medicamentos 4 e 5 observa-se a predominância de formononetina e biochanina A, o que  
356 é coerente com o descrito na literatura para amostras da espécie (Maito 2015; Ramos 2010;  
357 Saviranta *et al.*, 2008). Contrariamente, os medicamentos manipulados apresentam  
358 predominância de daidzeína e genisteína, o que não corresponde ao perfil descrito na  
359 literatura para a espécie. Tais diferenças podem ser devidas ao método de extração ou  
360 purificação empregados pelos fabricantes dos extratos, cuja preocupação parece estar pautada  
361 apenas no teor mínimo de isoflavonas totais, sem a preocupação de garantir também as  
362 proporções entre as mesmas.

363 O teor de isoflavonas no trevo-vermelho depende da variedade, local de plantio, clima,  
364 solo e disponibilidade de água (Booth *et al.*, 2006). A forma de obtenção e processamento  
365 industrial do produto também influenciam nos teores finais de isoflavonas (Barnes, Kirk &  
366 Coward, 1994). Logo, a padronização e o controle de qualidade dos fitoterápicos é exigência  
367 legal para fins de registro destes medicamentos segundo resolução RDC n. 48 de 2004 (Brasil,  
368 2004). Porém, para os medicamentos manipulados é necessário que o farmacêutico conheça a  
369 concentração dos componentes ativos do extrato que utilizam como matéria-prima, a fim  
370 de garantir a produção e comercialização do produto corretamente, assegurando o teor dos  
371 ativos e a qualidade do produto.

372 Os laudos dos fornecedores dos medicamentos 1 e 3 trazem o valor de isoflavonas  
373 totais, nas especificações gerais, como sendo de no mínimo 8%, mas apresentam, ainda, o teor  
374 exato de isoflavonas totais no lote fornecido. Coincidentemente ambos dizem que seus  
375 extratos possuem 9,03% de IT. Uma possível causa de erro nos medicamentos manipulados é  
376 a não observância do teor especificado em cada lote, utilizando inadequadamente o teor  
377 mínimo descrito.

378 O medicamento 2, provavelmente, foi formulado contendo 40 mg de extrato seco de  
379 trevo-vermelho, e não 40 mg de IT, o que explica o baixo teor de IT encontrado.

380 Em nenhum dos rótulos dos produtos analisados, nem nas bulas dos medicamentos  
381 comerciais e em nenhum dos laudos dos fornecedores de extrato seco de trevo-vermelho  
382 obtidos está especificada a forma de se expressar o conteúdo total de isoflavonas, ou seja, se a  
383 massa total foi calculada a partir da soma da massa dos derivados glicosilados mais as  
384 agliconas, ou se refere a resultados normalizados para massa equivalente das respectivas  
385 agliconas. Resultados expressos na forma de derivados glicosilados superestimariam os teores  
386 de isoflavonas já que o seu peso molecular é quase o dobro do das agliconas. O recomendável  
387 para expressar o conteúdo de isoflavonas é normalizar os resultados para massa das agliconas  
388 ou apresentar as quantidades molares das isoflavonas (Nurmi *et al.*, 2002; Song *et al.*, 1998).  
389 No presente trabalho isoflavonas foram quantificadas e expressas na forma de agliconas, que  
390 segundo Tsao *et al* (2006), após avaliar 13 cultivares de trevo-vermelho, são as formas  
391 predominantes na espécie.

392 Não existe uma definição da quantidade mínima de cada uma das agliconas que os  
393 extratos ou medicamentos contendo isoflavonas desta espécie vegetal devam  
394 apresentar. Embora as isoflavonas possuam semelhança estrutural e efeitos relacionados entre  
395 si, Maito (2015) apresenta uma revisão da literatura que relata diversos estudos mostrando  
396 diferenças entre elas no que diz respeito à suas atividades farmacológicas. Dessa forma,  
397 ingerir não apenas quantidades diferentes de IT mas também proporções distintas de cada

398 aglicona pode acarretar efeitos fisiológicos diferentes; logo, não se pode assegurar os mesmos  
399 resultados para produtos diferentes.

400 A análise realizada denota que a qualidade variável das matérias-primas vegetais  
401 disponibilizada por alguns fornecedores, a falta de especificações quanto a forma de expressar  
402 a concentração das isoflavonas (aglicona ou heterosídeo), a ausência de definição das  
403 proporções entre as diferentes agliconas presentes, bem como a falta de capacitação de alguns  
404 profissionais que aviam as prescrições de fitoterápicos, representam uma lacuna substancial  
405 no preparo magistral de cápsulas de extrato seco de *Trifolium pratense* com a qualidade  
406 requerida para medicamentos.

407

#### 408 **4. Conclusão**

409 A extração das isoflavonas, realizada com a mistura acetonitrila:água (1:1, v/v),  
410 apresentou-se apropriada, permitindo a extração das mesmas em quase sua totalidade.

411 O método analítico por CLAE, co-validado para a quantificação das isoflavonas da  
412 espécie demonstrou ser preciso, exato, linear na faixa de concentração avaliada (0,5 – 10  
413 µg/mL), específico e com baixo efeito de matriz, sendo apropriado para a análise das  
414 isoflavonas nos medicamentos avaliados.

415 Os medicamentos industrializados analisados apresentaram teores de isoflavonas totais  
416 coerentes com o declarado no rótulo, enquanto que, os medicamentos magistrais apresentaram  
417 conteúdo total de isoflavonas em desacordo com o especificado no rótulo. No que se refere às  
418 proporções das isoflavonas encontradas, os medicamentos industrializados apresentaram  
419 perfil correspondente ao relatado para a espécie, com predominância das isoflavonas  
420 formononetina e biochanina A, enquanto que os medicamentos magistrais apresentaram  
421 predominância de genisteína e daidzeína, perfil atípico para a espécie.

422

423

424 **5. Referências**

- 425 Accorsi-Neto A. *et al.* Effects of isoflavones on the skin of postmenopausal women: a pilot  
426 study. *Clinics*. 64: 505-510, 2009.
- 427 Azimova SS. Natural Compounds Plant Sources, Structure and Properties. Nova York:  
428 Springer, 2013.
- 429 Baracat EC, Haidar MA & Lima GR de. Síndrome do climatério. *ArsCurandi*. 24(8): 9-16,  
430 1991
- 431 Barnes S, Kirk M & Coward L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction  
432 conditions and analysis by HPLC-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 42 (11): 2466-  
433 2474, 1994
- 434 Beck V, Rohr U & Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to  
435 estrogen replacement therapy? *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 94: 499-518, 2005.
- 436 Bedani R & Rossi EA. Isoflavonas: bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. *Bol.*  
437 *Centro Pesqui.Process.Aliment.* 23(2):231-64, 2005.
- 438 Booth NL *et al.* Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense L., Fabaceae*)  
439 isoflavones and estrogenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 54(4):1277-82. 2006
- 440 Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de  
441 29 de maio de 2003.
- 442 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira, vol. 2. 5 ed.  
443 Brasília: Anvisa, 2010. 546p.
- 444 Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe do workshop  
445 sobre isoflavonas realizado em 29 de agosto de 2002

446 Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário nacional  
447 da farmacopéia brasileira. 2.ed. Brasília, 2012. 224 p

448 Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria  
449 Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004.

450 Brasil. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS  
451 (RENISUS), 2009.

452 Campos HH *et al.* Distúrbios do Sono no Climatério. *Femina*.33(11):815-20, 2005

453 Carbonel AAF *et al.* Ação das isoflavonas no estresse oxidativo na pós-menopausa da mulher.  
454 *Reprod. Clim.* 26(2): 39-43, 2011.

455 Coxam V. New advances in osteoporosis nutritional prevention.*Med Sci (Paris)*. 21(3): 297-  
456 301, 2005.

457 Duncan AM, Phipps WR & Kurzer MS. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res*  
458 *ClinEndocrinolMetab*17: 253-271, 2003

459 Eichholz AC, Mahavni V & Sood AK. Allopathic and complementary alternatives to hormone  
460 replacement therapy.*Expert Opin Pharmacother.* 3(7): 949-55, 2002.

461 Engelmann NJ *et al.* In vitro production of radiolabeled red clover (*Trifolium pratense*)  
462 isoflavones. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*98: 147-156, 2009.

463 Ewies AA. Phytoestrogens in the management of the menopause: up-to-date. *Obstet Gynecol*  
464 *Surv.* 57(5): 306-13, 2002.

465 Food and Drug Administration (FDA), Center for drug evaluation and research. Guidance for  
466 Industry: Bioanalytical Method Validation. p. 1-34, 2013.

467 Fotsis T *et al.* Genistein, a dietary derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc. Natl. Acad.*  
468 *Sci. U.S.A.* 90(7):2690–94, 1993.

469 Ghazanfarpour M *et al.* Effects of red clover on hot flash and circulating hormone  
470 concentrations in menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Avicenna J.*  
471 *Phytomed.* 5(6): 498–511, 2015.

472 Han KK *et al.* Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms.  
473 *Obstet Gynecol.* 99(3): 389-394, 2002

474 Hirano T, Oka K & Akiba M. Antiproliferative effects of synthetic and naturally occurring  
475 flavonoids on tumor cells of the human breast carcinoma cell line, ZR- 75–1. *Res. Commun*  
476 *Chem. Pathol.Pharmacol.* 64(1):69–78, 1989.

477 Hirota A *et al.* 1,1-Diphenyl- 2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean  
478 miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell  
479 lines. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 64(5): 1038-1040, 2000.

480 Kuiper GG *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen  
481 receptor beta. *Endocrinology.* 139(10): 4252-63, 1998.

482 Lee MH, Yu MW, Kao L & Lin CC. Enhancement of the encapsulation and transmembrane  
483 permeation of isoflavone-containing red clover extracts in phospholipid-based  
484 microemulsions using different extraction processes. *J. Agric. Food Chem.* 57: (20): 9489-  
485 9495, 2009.

486 Maito TF. *Multicomplexação de isoflavonas de Trifolium pratense L. com*  
487 *hidroxipropil-β-ciclodextrina* 2015. Porto Alegre. 128 p. Dissertação de mestrado,  
488 Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

492 Miyazawa M *et al.* Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max*  
493 Merrill). *J. Agric. Food Chem.* 47(4):1346-1349, 1999.

494 Navarro PAAS *et al.* Fatores locais envolvidos na etiopatogênese da osteoporose pós-  
495 menopausa. *Reprodução & Climatério*16:167-72, 2001.

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

498 Nurmi T *et al.* Isoflavone content of the soy based supplements. *J. Pharm. Biomed. Anal.*28:  
499 1- 11, 2002.

500 Paech K *et al.* Differential ligand activation of estrogen receptors ER and ER $\beta$  at API  
501 sites. *Science.* 227:1508-10, 1997.

502 Ramos GP. *Estudo químico de diferentes acessos de trevo-vermelho (Trifolium pratense L.) e*  
503 *atividades biológicas.* 2010. Porto Alegre. 178 p. Tese de doutorado, Universidade Federal do  
504 Rio Grande do Sul.

505 Ryan-Borchers TA *et al.* Soy isoflavones modulate immune function in healthy  
506 postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 83(5): 1118-25, 2006.

507 Sato M *et al.* Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging  
508 potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 44(1):37-41, 1996

509 Saviranta NM *et al.* Red clover (*Trifolium pratense L.*) isoflavones: determination of  
510 concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *J Sci Food Agric.*88(1):  
511 125- 132, 2008.

512 Setchell KD *et al.* Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of  
513 commercial soy isoflavone supplements. *J. Nutr.*131(4): 1362S-1375S, 2001.

514 Simões CMO *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre/  
515 Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.

516 Sirtori CR *et al.* Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *J. Nutr.* 125: 598S-605S,  
517 1995.

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

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

522 Tsao R *et al.* Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts  
523 harvested at different growing stages. *J. Agric. Food Chem.* 54(16): 5797-5805, 2006

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

525 Wang Q *et al.* Soy isoflavone: The multipurpose phytochemical (Review). *Biomed. Rep.* 697-  
526 701, 2013.

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

528 Yatsu FK *et al.* A New Simplified and Stability Indicating Liquid Chromatography Method  
529 for Routine Analysis of Isoflavones Aglycones in Different Complex Matrices.  
530 *Food Anal Methods.*7(9): 1881-1890, 2014

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

## **Anexo 1: Regras para publicação na Revista Brasileira de Farmácia**

REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA (RBF) BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACY (BJP)

ISSN 2176-0667 (online)

### **ESCOPO E POLÍTICA**

A Revista Brasileira de Farmácia (RBF) (Brazilian Journal of Pharmacy - BJP) é um periódico da Associação Brasileira de Farmacêuticos que se mantém desde 1920, atualmente com periodicidade trimestral. O periódico é voltado para a publicação da produção científica dos diversos segmentos do campo das Ciências Farmacêuticas em manuscritos que poderão ser submetido em português, inglês ou espanhol adequado às normas de publicação descritas a seguir.

A linha editorial desse periódico enfatiza não só a inovação tecnológica, mas principalmente os possíveis diálogos interdisciplinares viáveis dentro da abordagem científica, e, portanto priorizam tanto os estudos qualitativos quanto os quantitativos que possam contribuir de forma inovadora e crítica para o desenvolvimento da arte de curar plena. Para tanto, o periódico poderá contemplar seções de **Artigos de Revisão** (sistemática, exaustiva ou não) que contribuam sobre temas de relevância ao campo das Ciências Farmacêuticas, e ainda a proposição de **Artigos Originais** resultados de pesquisas ou experimentos, **Resumos de Teses ou Dissertações** defendidas a pelo menos dois anos.

O Conselho editorial poderá propor temas específicos, considerados relevantes, com texto de autores convidados, com inserção no debate sobre temas de interesse da comunidade farmacêutica, que igualmente serão submetidos ao processo de revisão por pares.

Os autores devem indicar, em nota de fim de texto após a conclusão do manuscrito, se a pesquisa é financiada, resultado de dissertação de mestrado ou tese de doutorado, e ainda se há conflitos de interesse envolvidos na mesma. Como condução do processo de submissão caberá aos autores o preenchimento e envio dos APENDICES apresentados ao final desse texto.

533 No caso de artigos que trazem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos ou animais,  
534 os autores devem explicitar na seção de Metodologia que a pesquisa foi conduzida dentro de  
535 padrões éticos exigidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Conselho Nacional de  
536 Saúde/Ministério da Saúde (CONEP/CNS/MS). Deve-se atentar, sobretudo, ao disposto na  
537 Resolução CONEP nº 196/96. No caso de experimento com animais deverá atender aos  
538 padrões éticos da Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, publicada pelo Conselho Federal  
539 de Medicina Veterinária. **O parecer do CEP deve seguir anexado ao processo de**  
540 **submissão.**

541 Antes de enviar seu manuscrito para a **RBF confira as etapas para a submissão** para  
542 garantir a agilidade ao processo que será dividida em duas etapas: A primeira a partir da  
543 avaliação inicial da Comissão editorial quanto a identidade do artigo com a política do  
544 periódico e adequação as normas de publicação. A segunda etapa prevê a avaliação por pares  
545 de revisores.

546 A revisão final dos trabalhos e adequação às normas ortográficas é de inteira responsabilidade  
547 dos próprios autores. O Comitê Editorial não aprovará manuscritos incompletos, fora do  
548 escopo da revista e das instruções para os autores.

549

## **INSTRUÇÕES GERAIS**

Todos os manuscritos devem ser originais e não publicados anteriormente. Cabe salientar que submissão simultânea implicará em sua recusa nesse periódico. As publicações em inglês e

espanhol devem ser revisadas por um profissional de edição de língua estrangeira e não garantem o aceite do artigo. **O custo da revisão do texto em inglês ou espanhol é de responsabilidade dos autores que são encorajados a buscar profissionais ou empresas qualificados.**

A RBF reserva os direitos de submeter todos os manuscritos para revisores *ad hoc*, cujos nomes serão confidenciais e com autoridade para decidir a aceitação ou declínio da submissão. Nos casos de conflito de avaliações entre os pares, não se compromete a seguir com uma terceira avaliação, a decisão contará com avaliação dos pareceres pelo Conselho Editorial.

### **FORMA E APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS**

A RBF aceita artigos para as seguintes seções:

- a) **Artigos originais ou de revisão (até 7.000 palavras, incluindo notas e referências, e exclui o Resumo/Abstract. Máximo de 5 figuras, quadro/gráfico ou tabela):** textos inéditos provenientes de pesquisa ou análise/revisão bibliográfica. A publicação é decidida pelo Conselho Editorial, com base em pareceres - respeitando-se o anonimato tanto do autor quanto do parecerista (*double-blind peer review*) - e conforme disponibilidade de espaço.
  
- b) **Artigos originais por convite (até 8.000 palavras, incluindo notas e referências, e exclui o Resumo/abstract. Máximo de 5 figuras, quadro/gráfico ou tabela):** textos inéditos de temas previamente solicitados pelo editor (a) Chefe ou Conselho Editorial a autores/pesquisadores de reconhecida experiência no campo das Ciências Farmacêuticas, que poderão resultar em artigos resultado de pesquisa ou de revisão. Os artigos originais serão publicados com base em pareceres (*double-blind peer review*). Apenas artigos que, devido a seu caráter autoral, não podem ser submetidos

anonimamente a um parecerista, serão analisados, com ciência do autor, com base em pareceres em que só o parecerista é anônimo (*single-blind peerreview*).

- c) **Resumo de Tese de Doutorado ou Dissertações de Mestrado (até 1500 palavras, incluindo notas e referencias. Máximo de 3 figuras, tabela ou quadro/gráfico):**

Trata-se de um Resumo ampliado de estudos acadêmicos que tenham relevância no campo das Ciências farmacêuticas. Serão aceitos os Resumos de pesquisas que tenham sido defendidas até dois anos antes da publicação da RBF. O número de Resumos não poderá ultrapassar 15% do total de artigos apresentados por edição, e deverá contemplar as seções Introdução, Metodologia, Resultados e Discussão e Conclusão de forma resumida.

#### **ALGUMAS CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS**

- a) Deverá ser adotado o **Sistema Internacional (SI)** de medidas.
- b) As equações necessárias a compreensão do texto deverão ser editadas utilizando *software* compatível com o editor de texto. As variáveis deverão ser identificadas após a equação.
- c) Recomenda-se que os autores realizem a análise de regressão ou outro teste estatístico aplicável para fatores quantitativos, mas que a utilização de programas específicos para o tratamento dos dados estatísticos deve constar da seção de Metodologia.
- d) **ATENÇÃO: QUADROS/ TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS devem ter largura de no máximo 8,25 cm, com alta resolução e enviados em arquivo separado. Nesse caso, sua posição deve ser identificada no texto. CASO CONTRÁRIO, O MANUSCRITO SERÁ DEVOLVIDO AOS AUTORES, que acarretará em nova submissão.**

- e) A RBF recomenda a utilização de Referências Bibliográficas atualizada, salvo aquelas consagradas em trabalhos de autores seminais de cada área específica, ou ainda em textos que necessitam de informações históricas relevantes na compreensão da argumentação apresentada. Consideraremos atualizadas aquelas com data de publicação em periódicos indexados a pelo menos 5 anos da data de envio do manuscrito.
- f) TODAS as correções sugeridas durante o processo de submissão deverão ser destacadas em **VERMELHO, e devolvida a comissão editorial pelo endereço:** [revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br](mailto:revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br).

### FORMATAÇÃO DO TEXTO

Os manuscritos deverão utilizar aplicativos compatíveis com o **Microsoft Word**. Devem ser escritos em página formato A4 com margens de 2 cm, espaçamento duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12, justificado. As linhas e páginas devem ser numeradas a partir do Título até a página final.

Deve-se adotar no texto apenas as **abreviações padronizadas**. Por exemplo: Kg (quilograma)

A primeira citação da abreviatura entre parênteses deve ser precedida da expressão correspondente por extenso. Por exemplo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

O **recurso de itálico** deverá ser adotado apenas para realmente destacar partes importantes do texto, como por exemplo, citações *ipsis literis* de autores consultados, partes de depoimentos, entrevistas transcritas, nomes científicos de organismos vivos e termos estrangeiros.

As ilustrações, figuras, esquemas, tabelas e gráficos deverão ser identificadas no texto, conforme apresentação desejada pelo autor, e **apresentadas em arquivo separado**.

Os manuscritos deverão seguir a seguinte estrutura:

- **Título:** deverá ser conciso e não ultrapassar 30 palavras, informativo, digitado em negrito com letras minúsculas utilizando a fonte *Times New Roman* (tamanho 14), com exceção da primeira letra, dos nomes próprios e/ou científicos.
- **Autores:** deverão ser adicionados a um espaço abaixo do título, centralizados, separados por vírgula. O símbolo “&” deve ser adicionado antes do último autor (Ex.: Paulo da Paz, João de Deus & Pedro Bondoso). Inserir os nomes completos dos autores, por extenso, com letras minúsculas com exceção da primeira letra de cada nome.
- **Afiliação do autor:** cada nome de autor deverá receber um **número arábico** sobrescrito indicando a instituição na qual ele é afiliado. A lista de instituições deverá aparecer imediatamente abaixo da lista de autores. O nome do autor correspondente deverá ser identificado com um asterisco sobrescrito. O e-mail institucional, endereço completo, CEP, telefone e fax do autor correspondente deverão ser escritos no final da primeira página.
- **Resumo (Abstract):** deverá ser escrito na **segunda página** do manuscrito, não deverá exceder 200 palavras, deverá conter informações sucintas que descrevam **objetivo da pesquisa, metodologia, discussão/resultados e a conclusão.** Os manuscritos escritos em português ou em espanhol devem ter um Resumo traduzido para o inglês (Abstract). O Abstract deve ser digitado na **terceira página** do manuscrito e deve ser revisado por um profissional de edição de língua inglesa. **Os manuscritos em inglês deverão apresentar um Resumo em português.**
- **Palavras-chave (Keywords):** são fundamentais para a classificação da temática abordada no manuscrito em bancos de dados nacionais e internacionais. Serão aceitas entre 3 e 5 palavras-chave. Após a seleção, sua existência em português e

inglês deve ser confirmada pelo(s) autor (es) do manuscrito no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br> (Descritores em Ciências da Saúde - Bireme). As palavras-chave (Keywords) deverão ser separadas por vírgula e a primeira letra de cada palavra-chave deverá maiúscula.

- **Introdução:** Situa o leitor quanto ao tema que será abordado e apresenta o problema de estudo, destaca sua importância e lacunas de conhecimento (justificativa da investigação), e inclui ainda os objetivos (geral e específico) a que se destinam a discutir.
- **Metodologia ou Percurso Metodológico:** Nessa seção o autor (es) deve (m) apresentar o percurso metodológico utilizado que apresente o tipo de estudo (se qualitativo ou quantitativo), de base empírica, experimental ou de revisão de forma que identifique a natureza/tipo do estudo. São fundamentais os dados sobre o local onde foi realizada a pesquisa; população/sujeitos do estudo e seus critérios de seleção (inclusão e exclusão) e cálculo amostral. Nos casos de pesquisa experimental cabe a identificação do material, métodos, equipamentos, procedimentos técnicos e métodos adotados para a coleta de dados.

Na apresentação do tratamento estatístico/categorização dos dados cabe informar a técnica ou programa utilizado no tratamento e análise. Nos casos de investigação com humanos ou animais cabe informar a data e o número do protocolo da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Quanto ao estudo de espécies vegetais deve ter a indicação do seu local de coleta (dados de GPS), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e o depósito da exsiccata.

- **Resultados e Discussão:** devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica, utilizando ilustrações (figuras, quadros e tabelas) quando necessário. Deve-se comparar com informações da literatura sobre o tema ressaltando-se aspectos

novos e/ou fundamentais, as limitações do estudo e a indicação de novas pesquisas. Nessa seção cabe a análise e discussão crítica da pesquisa.

- **Conclusões:** apresentar considerações significativas fundamentadas nos resultados encontrados e vinculadas aos objetivos do estudo.
- **Agradecimentos:** opcional e deverá aparecer antes das referências.
- **Figuras, Quadro/Tabelas ou Gráficos:** Todas as ilustrações devem apresentar um título breve na parte superior e numerada consecutivamente com algarismos arábicos, conforme a ordem em que forem citadas no manuscrito e a legenda com fonte em Times New Roman, tamanho 12, justificado e com largura máxima de 8,25cm.

As Tabelas devem apresentar dados numéricos como informação central, e não utilizar traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé da tabela, com os seus respectivos símbolos. **Se houver ilustração extraída de outra fonte, publicada ou não, a fonte original deve ser mencionada abaixo da tabela.** Não é permitida a utilização de Figura, gráfico, quadro/tabela publicada em outro periódico **sem antes pedir autorização prévia dos autores e/ou da revista.**

**Qualquer uma dessas ilustrações com baixa resolução poderá ser excluída durante o processo de diagramação da RBF, ou ainda comprometer o aceite do manuscrito.**

As fotos deverão garantir o anonimato de qualquer indivíduo que nela constar. Caso os autores queiram apresentar fotos com identificação pessoal, deverão apresentar permissão específica e escrita para a publicação das mesmas.

- **Referências:**

As citações bibliográficas deverão ser adotadas de acordo com as exigências da RBF. Citação no texto, usar o sobrenome e ano: Lopes (2005) ou (Lopes, 2005); para dois autores (Souza & Scapim, 2005); três autores (Lima, Pereira & Silva, 2008), para mais do que quatro autores, utilizar o primeiro autor seguido por *et al.* (Wayner *et al.*, 2007), porém na lista de referências deverão aparecer ordenadas alfabeticamente pelo **sobrenome do primeiro autor**. A citação de mais que uma referência por parágrafo requer a ordenação em ordem decrescente cronológica e cada grupo de autores separados por “ponto e vírgula”. Por exemplo: (Gomes & Souza, 2012; Mendez, 2010; Lima, Pereira & Silva, 2008).

A veracidade das referências é de responsabilidade dos autores. Os exemplos de referências citados abaixo foram adaptados, em sua maioria, do documento original da ABNT (NBR 6023, agosto de 2002).

#### **a) Artigos de periódicos:**

A abreviatura do periódico deverá ser utilizada, em itálico, definida no Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) ou na Base de dados PubMed, da US National Library of Medicine (<http://www.pubmed.gov>), selecionando Journals Database. Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizada, deve-se citar o título completo.

Autor (es)\*. *Título do periódico em itálico*, volume (a indicação do fascículo é entre parênteses): páginas inicial - final do artigo, ano de publicação.

Galato D & Angeloni L. A farmácia como estabelecimento de saúde sob o ponto de vista do usuário de medicamentos. *Rev. Bras. Farm.* 90(1): 14 – 18, 2009.

Fonseca VM, Longobuco P, Guimarães EF, Moreira DL, Kaplan MAC. Um teste do formato de nome. *Rev. Bras. Farm.* 90(1): 14 – 18, 2009.

**b) Livros:**

- **Com 1 autor**

Autor. Título. Edição (a partir da 2ª). Cidade: Editora, ano de publicação. Número total de páginas.

Casciato DA. Manual de oncologia clínica. São Paulo: Tecmed, 2008. 1136 p.

- **Com 2 autores**

Lakatos EM & Marconi MA. Metodologia científica. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1991. 231 p.

- **Com autoriacorporativa**

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. I Fórum Nacional de Educação Farmacêutica: O farmacêutico de que o Brasil necessita (Relatório Final). Brasília, DF, 2008. 68p.

- **Capítulos de livros (o autor do capítulo citado é também autor da obra):**

Autor (es) da obra. Título do capítulo. *In*: \_\_\_\_. Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada.

Rang HP, Dale MM & RITTER JM. *In*: Quimioterapia do câncer. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 50, p. 789-809.

- **Capítulos de livros (o autor do capítulo citado não é o autor da obra):**

Autor (es) do capítulo. Título da parte referenciada. *In*: Autor (es) da obra (ou editor) Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada.

Schenkel EP, Gosmann G & Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. *In*: Simões CMO. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap. 15, p. 371-400.

- **Citação indireta**

Utiliza-se *apud* (citado por) nas citações que foram transcritas de uma obra de um determinado autor, mas que na verdade pertence a outro autor.

Helper CD & Strant LM. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *Am.*

*J. Hosp. Pharm.* 47: 533-543, 1990. *Apud* Bisson MP. Farmácia Clínica & Atenção Farmacêutica. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 3-9.

**c) Teses, Dissertações e demais trabalhos acadêmicos:**

Autor. *Título* (inclui subtítulo se houver). Ano. Cidade. Total de páginas. Tipo (Grau), Instituição (Faculdade e Universidade) onde foi defendida.

Sampaio IR. *Etnofarmacologia e toxicologia de espécies das famílias Araceae e Euphorbiaceae*. 2008. Rio de Janeiro. 45 p. Monografia (Especialização em Farmacologia), Associação Brasileira de Farmacêuticos. Rio de Janeiro.

**d) Eventos científicos (Congressos, Seminários, Simpósios e outros):**

Autor (es). Título do trabalho. *Nome do evento*, nº do evento. Página. Cidade. País. Ano.

Marchioretto CT, Junqueira MER & Almeida ACP. Eficácia anestésica da neocaína (cloridrato de bupivacaína associada a epinefrina) na duração e intensidade da anestesia local em dorso de cobaio. *Reunião anual da SBPC*, 54, Goiânia, Brasil, 2002.

**e) Patentes:** Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado.

Ichikawa M, Ogura M & Lijima T. 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396,apud* Chemical Abstracts 105: 178423q.

**f) Leis, Resoluções e demais documentos**

Conforme o modelo:

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) no 44, de 17 de agosto de 2009.

**g) Banco/Base de Dados**

Conforme o modelo

BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Lilacs - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde. Disponível em:

<<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&base=LILACS&lang=p>>. Acesso em: 27 ago. 2009.

**h) Homepage/Website**

Conforme o modelo:

WHO *Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses*. 91 p.

Disponível em:

<[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_guidelines\\_pharmaceutical\\_mngt.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf)>. Acesso em agosto de 2009.