

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

Estudo químico de diferentes acessos de trevo-vermelho
(*Trifolium pratense* L.) e atividades biológicas

GRAZIELE PEREIRA RAMOS

PORTO ALEGRE, 2010

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

Estudo químico de diferentes acessos de trevo-vermelho
(*Trifolium pratense* L.) e atividades biológicas

Tese apresentada por **Grazielle Pereira Ramos** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi
Co-Orientador: Prof. Dr. Miguel Dall'Agnol

Porto Alegre, 2010

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado - Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.02.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Edna Sayuri Suyenaga

Centro Universitário Feevale

Profa. Dra. Fabiane Moreira Farias

Universidade Federal do Pampa

Profa. Dra. Gilsane Lino Von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

R175e Ramos, Grazielle Pereira
Estudo químico de diferentes acessos de trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) e atividades biológicas / Grazielle Pereira Ramos. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xx, 156 p. : il., tab., gráf.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Trifolium pratense*. 2. Trevo vermelho. 3. Leguminosae. 4. Validação: métodos analíticos. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Melhoramento genético vegetal. 7. Isoflavonas. I. Zuanazzi, José Ângelo Silveira. II. Dall'Agnol, Miguel. III. Título.

CDU: 547.9:582.736

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi e co-orientação do Prof. Dr. Miguel Dall'Agnol. Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios de Farmacognosia e Controle de Qualidade (neste sob supervisão da Profa. Dra. Elfrides Eva Schapoval) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, na Estação Experimental Agronômica e nas casas de vegetação da Faculdade de Agronomia da mesma universidade. Este trabalho teve colaboração do Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröelich, no processo de validação do método analítico, e da Profa. Dra. Miriam Anders Apel nos ensaios biológicos.

Agradecemos ao CNPq pelo suporte financeiro e bolsas recebidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos pais, dedico....

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi por sua orientação, confiança, incentivo e ensinamentos inestimáveis.

Ao professor Dr. Miguel Dall'Agnol pela co-orientação, e por compartilhar comigo seu conhecimento sobre o trevo-vermelho e melhoramento genético.

As professoras Dra. Elfrides E. S. Schapoval, Dra. Miriam Anders Apel, e professor Dr. Pedro Eduardo Fröelich pela preciosa colaboração.

Aos meus pais pelo amor, apoio em todos os momentos e por serem os maiores incentivadores desta conquista.

À minha irmã pelo amor e companheirismo.

Ao Eduardo Pedrazza meu amigo e noivo, por todo amor, paciência, incentivo e apoio.

À Paula Dias que dividiu comigo todo seu conhecimento sobre trevo-vermelho, e discussões sobre o assunto que foram muito produtivas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacognosia pelo apoio em muitos momentos para a execução deste trabalho. Especialmente à bolsista de iniciação científica Cláudia Borges de Moraes que foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Análise Genética, da Faculdade de Agronomia, que sem o cuidado deles e as escalas para regar as plantas, teria sido impossível a realização deste trabalho.

As minhas queridas amigas Ariane, Fernanda, Mariana, Michele e Tatiana pela amizade e apoio desde muito tempo.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a elaboração deste trabalho.

*O ontem é apenas um sonho
E o amanhã é só uma visão:
O hoje, porém, bem vivido,
Transforma todo ontem em um sonho de felicidade
E todo amanhã em uma visão de esperança.
Portanto, cuide bem do dia de hoje.*

Provérbio Sânscrito

RESUMO

O trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.), uma das leguminosas forrageiras mais utilizadas na agricultura mundial, contém as isoflavonas formononetina e biochanina A, e em menores concentrações daidzeína e genisteína. Estes compostos têm ganhado muito interesse devido aos relatos de seus benefícios à saúde humana. Recentemente, no ano de 2009, esta espécie foi incluída na lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que contém plantas medicinais com potencial de gerar produtos para serem produzidos e distribuídos pelo SUS. Mas é importante destacar que não existem estudos de quantificação de isoflavonas em plantas de trevo-vermelho cultivados no Brasil. Os objetivos deste trabalho foram validar método de análise de amostras de trevo-vermelho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); quantificar quatro isoflavonas em 78 acessos de trevo-vermelho; verificar as modificações sazonais na concentração de três acessos de trevo-vermelho; aumentar os níveis de isoflavonas através de melhoramento genético; e determinar a atividade anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro* e de atividade de inibição da acetilcolinesterase de um extrato seco de trevo-vermelho. Para analisar as plantas por CLAE, estas foram hidrolisadas, separadas por diclorometano, e ressuspendidas em metanol. O método de CLAE usado foi validado. As isoflavonas (daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A) foram quantificadas em 78 acessos de trevo-vermelho, os conteúdos das agliconas (expressos em µg/g de planta seca, n=3) destes compostos variaram entre 0,00 a 137,91 para daidzeína; 14,70 a 516,51 para genisteína; 452,97 a 28548,65 para formononetina; e 1967,64 a 20145,27 para biochanina A, e a concentração total de isoflavonas variou entre 9,81 e 36,36 mg/g. O estudo sazonal mostrou que a concentração total das isoflavonas não difere entre as estações, mas verifica-se que na primavera (quando o trevo-vermelho está no estágio reprodutivo) se observam concentrações inferiores, e no inverno (quando a planta está no estágio vegetativo) são encontradas concentrações mais elevadas. No estudo de melhoramento genético foi possível observar um aumento na concentração total de isoflavonas. A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi medida através da mobilização de leucócitos, pelo ensaio de quimiotaxia na câmara de Boyden. A atividade anti-inflamatória *in vivo* foi avaliada pelo teste de edema de pata de rato induzido por carragenina. Os resultados do teste anti-inflamatório *in vitro* mostram que houve

significante inibição da migração dos leucócitos nas concentrações de 100,0 (94,73% de inibição), 50,0 (95,39% de inibição), 25,0 (94,73% de inibição), 10,0 (84,68% de inibição) e 5,0 (78,75% de inibição) µg/mL de extrato seco de trevo-vermelho. O teste anti-inflamatório *in vivo* demonstrou significativa atividade nas doses testadas, 100 e 50 mg/kg de extrato seco de trevo-vermelho. O percentual médio de inibição do edema foi 63,37%. O teste da inibição da acetilcolinesterase não demonstrou atividade. Os resultados deste estudo sugerem que se pode produzir plantas com concentrações mais elevadas de isoflavonas para a produção de fitomedicamentos com maior qualidade, e o extrato de trevo-vermelho pode ser adequado para o tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras chave: *Trifolium pratense*, cromatografia líquida de alta eficiência, validação, isoflavonas, melhoramento vegetal, avaliação sazonal, atividades biológicas

ABSTRACT

Chemical study of different accessions of red clover (*Trifolium pratense* L.) and biological activities

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is one of the most utilized forage legume in the world agriculture and contains the isoflavones formononetin and biochanin A, and in smaller concentration daidzein and genistein. These compounds have gained a high interest due to their human health benefits. Recently this species was included in the list of *Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS* (RENISUS) which contains medicinal plants that have potential to generate products to be produced and distributed by SUS. But it is important to highlight that does not exist any study of isoflavones quantification in red clover plants cultivated in Brazil. The aims of this work were to validate a method to analyze red clover samples by High Performance Liquid Chromatography (HPLC); to quantify four isoflavones compounds in 78 red clover accessions; to verify seasonal modifications in the isoflavone concentration of three red clover accessions; to increase isoflavones levels through plant breeding; and to determine *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity, and inhibitory activity of acetylcholinesterase of a red clover dry extract. To analyze the plants by HPLC, they were hydrolyzed, separated by dichloromethane, and resuspended with methanol. The HPLC method used was validated. Isoflavones (daidzein, genistein, formononetin and biochanin A) were quantified in 78 red clover accessions, the aglycone contents (expressed in $\mu\text{g/g}$ of dry material, $n=3$) of these compounds varied from 0.00 to 137.91 to daidzein; 14.70 to 516.51 to genistein; 452.97 to 28548.65 to formononetin; and 1967.64 to 20145.27 to biochanin A, and the total isoflavone concentration ranged between 9.81 and 36.36 mg/g . The seasonal study showed that the total concentration of isoflavones is not statistically different at different seasons, but is possible to verify that at spring (when red clover is at reproductive stage) we could observe the lowest concentration, and at winter (when red clover is at vegetative stage) we found the highest concentration. In the breeding study we could observe an increase in the total concentration of isoflavones. The *in vitro* anti-inflammatory activity was measured towards by leucocytes mobilization, by chemotaxis assay in Boyden's chamber. The *in vivo* anti-inflammatory activity was tested by a carrageenan-induced rat paw edema test. The results of anti-inflammatory *in vitro* test showed that there was a significant inhibition

of leukocyte migration at concentrations of 100.0 (94.73% of inhibition), 50.0 (95.39% of inhibition), 25.0 (94.73% of inhibition), 10.0 (84.68% of inhibition) and 5.0 (78.75% of inhibition) µg/mL of red clover dry extract. The *in vivo* anti-inflammatory test demonstrated significant activity in the tested doses, 100 and 50 mg/kg of red clover dry extract. The average of edema inhibition percentage was 63.37%. The inhibition of acetylcholinesterase test did not show activity. The results of this study suggest that we can select or produce plants with higher concentrations of isoflavones to produce phytomedicines with higher quality, and the red clover extract might be suitable for the treatment of inflammatory diseases.

Key words: *Trifolium pratense*, high performance liquid chromatography, validation, isoflavones, breeding, seasonal evaluation, biological activities

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados dos acessos de trevo-vermelho (<i>Trifolium pratense</i>).	38
Tabela 2: Parâmetros para análise cromatográfica de trevo-vermelho (<i>Trifolium pratense</i>).	40
Tabela 3: Sistema gradiente utilizado para a análise por CLAE de trevo-vermelho (<i>Trifolium pratense</i>).	40
Tabela 4: Análise comparativa dos métodos de preparo das amostras de trevo-vermelho.	53
Tabela 5: Análise de variância para os dados de linearidade da daidzeína.	55
Tabela 6: Análise de variância para os dados de linearidade da genisteína.	55
Tabela 7: Análise de variância para os dados de linearidade da formononetina.	56
Tabela 8: Análise de variância para os dados de linearidade da biochanina A.	56
Tabela 9: Resultados da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária da solução amostra de <i>Trifolium pratense</i> por CLAE.	56
Tabela 10: Resultados da análise de exatidão em CLAE para a amostra de <i>Trifolium pratense</i>	58
Tabela 11: Avaliação do parâmetro robustez para a solução amostra de <i>Trifolium pratense</i> por CLAE.	61
Tabela 12: Concentração das isoflavonas de 78 acessos da Coleção Nuclear de trevo-vermelho ^a	64
Tabela 13: Análise de variância de 78 acessos de trevo-vermelho. Todas médias foram significativas ($p \leq 0,05$).	65
Tabela 14: Média da concentração das quatro isoflavonas e do total de isoflavonas em cada grupo	66
Tabela 15: Concentração das isoflavonas do acesso PI179146 analisado em diferentes estações do ano*	69
Tabela 16: Concentração das isoflavonas do acesso PI 376880 analisado em diferentes estações do ano*	69
Tabela 17: Concentração das isoflavonas do acesso PI 419550 analisado em diferentes estações do ano*	69
Tabela 18: Concentração das isoflavonas do extrato seco analisado em diferentes períodos.	70

Tabela 19: Concentração das isoflavonas dos acessos analisados para escolha das plantas mãe.	72
Tabela 20: Concentração das isoflavonas das plantas filhas 1 (F ₁).....	73
Tabela 21: Concentração das isoflavonas das plantas filhas 2 (F ₂).....	75
Tabela 22: Análise estatística para as médias das gerações do melhoramento vegetal	76
Tabela 23: Resposta quimiotáxica <i>in vitro</i> de neutrófilos tratados com extrato de trevo-vermelho (contendo 200mg/g de planta seca de total de isoflavonas).	78
Tabela 24: Efeito da administração v.o. de extrato de trevo-vermelho sobre o edema em pata de ratos induzido pela carragenina (n= 7 animais).	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração	13
Figura 2: Representação esquemática da biossíntese dos isoflavonoides a partir de uma flavanona.....	14
Figura 3: Estrutura química de diferentes grupos de fitoestrógenos.	15
Figura 4: Estrutura química das isoflavonas biochanina A, genisteína, daidzeína e formononetina e do 17 β -estradiol.....	16
Figura 5: Representação gráfica da reta apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão para daidzeína.....	54
Figura 6: Representação gráfica da reta apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão para genisteína.....	54
Figura 7: Representação gráfica da reta apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão para formononetina.	55
Figura 8: Representação gráfica da reta apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão para biochanina A.....	55
Figura 9: Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação à isoflavona daidzeína.....	58
Figura 10: Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação à isoflavona genisteína.....	59
Figura 11: Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação à isoflavona formononetina.	59
Figura 12: Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação à isoflavona biochanina A.....	59
Figura 13: Cromatograma de uma solução dos padrões das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A.	61
Figura 14: Cromatograma de uma amostra de <i>Trifolium pratense</i> , demonstrando os picos das isoflavonas de interesse para este trabalho..	62
Figura 15: Representação bidimensional da relação bioquímica entre 77 acessos da coleção nuclear de trevo-vermelho e uma população cultivada no Brasil	66

SUMÁRIO

RESUMO	XIII
ABSTRACT.....	XV
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE FIGURAS	XIX
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
3 REVISÃO DO TEMA.....	9
3.1 Aspectos botânicos	11
3.2 Aspectos químicos	12
3.3 Estudos químicos das isoflavonas de trevo-vermelho.....	16
3.4 Validação de métodos analíticos.....	20
3.5 Determinação da estabilidade química	24
3.6 Melhoramento genético.....	25
3.7 Atividades farmacológicas.....	28
3.7.1 Estudos biológicos realizados com trevo-vermelho.....	30
4 PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1 Material.....	37
4.1.1 Material Vegetal	37
4.1.2 Solventes e reagentes.....	37
4.2 Métodos.....	39
4.2.1 Estudos químicos	39
4.2.1.1 Preparo das amostras de trevo-vermelho	39
4.2.1.2 Análise cromatográfica	40
4.2.1.3 Validação do método de análise por CLAE	41
4.2.1.4 Análise dos acessos da coleção nuclear de trevo-vermelho	42
4.2.1.5 Análise sazonal	42
4.2.1.6 Preparo do extrato seco de trevo-vermelho	42
4.2.1.7 Estabilidade química acelerada.....	43
4.2.1.8 Melhoramento genético	43
4.2.2 Estudos biológicos	44
4.2.2.1 Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	44

4.2.2.2 Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	47
4.2.2.3 Detecção de inibidores da acetilcolinesterase	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Preparo da amostras de trevo-vermelho.....	53
5.2 Validação do método de análise por CLAE	54
5.2.1 Linearidade	54
5.2.2 Precisão	56
5.2.3 Exatidão	57
5.2.4 Especificidade.....	57
5.2.5 Limite de Detecção e Quantificação	60
5.2.6 Robustez.....	60
5.3 Análise dos acessos da coleção nuclear de trevo-vermelho	62
5.4 Análise Sazonal	68
5.5 Estabilidade Química Acelerada	69
5.6 Melhoramento Genético.....	70
5.7 Estudos biológicos	77
5.7.1 Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	77
5.7.2 Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	80
5.7.3 Detecção de inibidores da acetilcolinesterase	83
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
7 CONCLUSÕES.....	93
8 REFERÊNCIAS	97
9 ANEXOS.....	109
9.1 Anexo 1: Carta de Aprovação do Comitê de Ética.....	111
9.2 Anexo 2: Artigo publicado na Revista Chromatographia.....	113
9.3 Anexo 3: Artigo submetido à Revista Phytochemical Analysis	119
9.4 Anexo 4: Artigo submetido à Revista Planta Medica	141

O trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) é uma importante leguminosa, constituindo uma boa alternativa dentre as espécies forrageiras de inverno, 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 (VETTER, 1995; JERI, 2002). Estes compostos têm recebido muita atenção atualmente devido aos seus possíveis benefícios à saúde humana (SIVESIND e SEGUIN, 2006). 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, 2005).

PERRY *et al.* (2003) em seu trabalho de revisão verificaram que os efeitos anticolinesterásico, antioxidante, anti-inflamatório, estrogênico e depressor do sistema nervoso central são indicativos para 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, 2000). Extratos de isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A) e cumestanos (cumestrol) derivados da soja (*Glycine max*) e do trevo-vermelho (*Trifolium pratense*) são, em muitos países, um dos medicamentos de venda livre mais comercializados (WUTTKE *et al.*, 2003).

A padronização de extratos vegetais tem se tornado de extrema importância para a indústria e para a pesquisa de medicamentos de origem natural (HE *et al.*, 1996). É de extrema importância para a triagem e seleção de um material vegetal um método analítico validado para a quantificação das substâncias ativas, que no

caso do trevo-vermelho, são as isoflavonas. Estas são geralmente quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Alguns métodos de CLAE desenvolvidos para a determinação de isoflavonas em trevo-vermelho possuem algumas desvantagens, como determinação de apenas 3 isoflavonas, ou grande tempo para preparação e análise das amostras (KRENN *et al.*, 2002).

No trevo-vermelho, o teor de isoflavonas depende da variedade, local de plantio, solo e condições climáticas (BECK *et al.*, 2003). Muitos estudos demonstraram que a quantidade de formononetina está controlada geneticamente e difere entre as variedades (TAYLOR e QUESENBERRY, 1996). DIAS *et al.* (2008) evidenciaram a alta diversidade genética e também demonstraram uma grande diversidade dentro das populações da coleção nuclear de trevo-vermelho do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Estudos também demonstraram que os teores de isoflavonas no trevo-vermelho podem variar conforme a época do ano (BOOTH *et al.*, 2006).

Apesar da atual importância do trevo-vermelho como fonte de isoflavona, bem como sua importância como planta forrageira, não existem dados sobre os teores de isoflavonas em plantas cultivadas no Brasil.

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a espécie *Trifolium pratense* quanto a seus constituintes químicos e atividades biológicas.

Os objetivos específicos incluem:

- Desenvolvimento e validação de método de análise de isoflavonas (daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A) em extratos de folhas de *Trifolium pratense*;
- Identificação e quantificação das isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A) por CLAE de extratos de folhas de 77 acessos de *Trifolium pratense* obtidos no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e uma população brasileira;
- Verificação das possíveis modificações sazonais nos teores das isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A) em folhas de 3 acessos de *Trifolium pratense* nas diferentes estações do ano;
- Realização de trabalho de melhoramento genético do trevo-vermelho, com finalidade de obter uma população de plantas que contenha maiores teores de isoflavonas analisadas (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A);
- Produzir extrato seco da folhas de *Trifolium pratense*;
- Avaliação da estabilidade química acelerada de um extrato seco de *Trifolium pratense*, determinando a velocidade de degradação (k), o tempo em que a concentração das isoflavonas genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A sejam 90% do inicial ($t_{90\%}$) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$);
- Determinação da atividade anti-inflamatória *in vitro* de extrato seco de folhas de *Trifolium pratense* pelo método de inibição da motilidade leucocitária, através do método de quimiotaxia;
- Determinação da atividade anti-inflamatória *in vivo* de extrato seco de folhas de *Trifolium pratense* pelo método de edema em pata de rato;

- Detectar inibidores da acetilcolinesterase, por ensaio *in vitro*, em extrato seco de *Trifolium pratense*.

3.1 Aspectos botânicos

A família *Leguminosae* (ou *Fabaceae*) é uma das maiores dentre as Dicotiledôneas, possuindo mais de 600 gêneros reunindo cerca de 13000 espécies, espalhadas em todo mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. São plantas de hábitos muito variados, desde grandes árvores das matas tropicais, a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e também trepadeiras; vivem em diferentes ambientes, latitudes e altitudes (JOLY, 1993).

Está dividida em três subfamílias: *Caesalpinoideae* contendo 152 gêneros sendo 4 cultivados e 2800 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais; *Mimosoideae* contendo 50-60 gêneros sendo 2 cultivados, 2800 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e cálido-temperadas; e *Faboideae* (ou *Papilionoideae*) contendo 482 gêneros sendo 19 cultivados e 12000 espécies, sendo as herbáceas difundidas nas regiões temperadas e as espécies lenhosas mais representadas nas regiões tropicais (BARROSO, 1991).

O gênero *Trifolium* L., pertence à família *Leguminosae* (ou *Fabaceae*) subfamília *Papilionoidae*, tribo *Trifolieae* e compreende cerca de 240 espécies, sendo encontrado em regiões úmidas e temperadas, áreas Mediterrâneas e em algumas partes subtropicais do mundo. Apesar de estar largamente distribuído, apenas algumas espécies possuem significância para pastagens. Existem controvérsias sobre o centro de origem deste gênero, mas suficiente para dizer que a bacia Mediterrânea e a região Californiana do oeste dos Estados Unidos são os locais mais prováveis. A área Mediterrânea origina 110 das 237 espécies de *Trifolium* (FRAME *et al.*, 1997; LANGE, 2001).

No Rio Grande do Sul destaca-se o gênero *Trifolium* L. (trevos) como importantes forrageiras cultivadas, como *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L. e *Trifolium vesiculosum* Savi, e três espécies nativas *Trifolium riograndense* Burkart, *Trifolium polymorphum* Poir e *Trifolium argentinense* Speg (LANGE, 2001).

O trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) é originário do sudeste da Europa e Ásia Menor. Adapta-se melhor em ambientes com climas temperados, sem extremos de calor ou frio; solos férteis, profundos e bem drenados, com pH relativamente alto;

podendo ser usado como silagem, feno, pasto e melhoramento do solo em muitas regiões do mundo. Está atualmente distribuído pela maioria das regiões temperadas do planeta (TAYLOR e QUESENBERRY, 1996).

Trifolium pratense L. é uma erva bienal ou anual com hastes eretas de 10-50 cm de altura; folhas basais com pecíolos longos; das hastes medianamente pecioladas ou quase sésseis; peciólulos iguais; folíolos elíptico-obovados com mancha branca em forma de V, com 1-3 cm de comprimento, bordos lisos, com muitos pêlos ou quase glabro; estípulas grandes, oblongo ovais, com parte livre curta, triangular com ponta setácea; nervuras visíveis de uma cor púrpura; inflorescência em espiga globosa ou ovóide; inflorescência de 1,2-3 cm de comprimento, em geral com 27 flores sésseis, de 10-25 mm de comprimento, violáceas (KAPPEL, 1967).

A floração inicia na primavera e pode estender-se até o outono. A fecundação é cruzada e a polinização é realizada por insetos, principalmente dos gêneros *Apis* e *Bombus*. O fruto é oval, engrossado no ápice, com 2-3 sementes ovóides, assimétricas, bicolores com a porção caulinar amarela ou castanho-clara e a radicular violeta, quando velhas tem cor de tijolo (LANGE, 2001).

3.2 Aspectos químicos

Flavonoides são um grupo de aproximadamente 4000 compostos de ocorrência natural que está onipresente em todas plantas vascularizadas (DI CARLO *et al.*, 1999). São compostos fenólicos que se caracterizam por apresentarem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, tendo por base a estrutura flavona (2-fenil-benzopirona), com as unidades recebendo denominação e numeração conforme descrito na **Figura 1** (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003; CUNHA, 2005). Os flavonoides podem ocorrer na forma genina (aglicona), glicosídica ou como derivados metilados. Os flavonoides na forma de genina consistem num anel benzênico (A), condensado com um anel de 6 membros (B) que, por sua vez transporta um anel fenílico (C) como substituinte na posição 2. O anel de 6 membros (B) condensado com o anel benzênico, ou é uma γ -pirona (flavonóis e flavonas) ou o seu derivado di-hidro. A posição dos substituintes benzênicos divide a classe destas

moléculas em flavonoides (substituição na posição 2) e isoflavonoides (substituição na posição 3) (CUNHA, 2005).

Os flavonoides diferem em seus substituintes (na maioria das vezes grupamentos hidroxila ou metoxila) e na natureza da composição do açúcar ligado à aglicona, podendo ocorrer na forma de O-glicosídeo ou C-glicosídeo (SAMUELSSON, 1999).

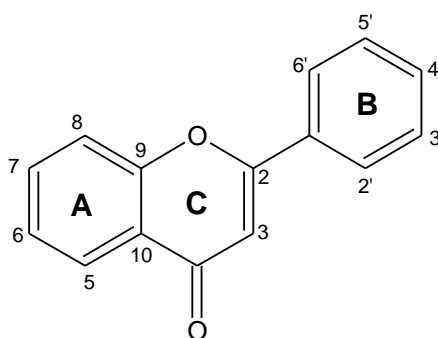


Figura 1: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração

Flavonoides podem ser utilizados como marcadores taxonômicos e isto se deve, sobretudo, à sua abundância relativa em quase todo o reino vegetal, e especificidade (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

As classes mais comuns de flavonoides são: flavonas, flavonóis, antocianidinas, flavanonas e isoflavonoides. Juntas, estas classes representam mais de 80% dos flavonoides conhecidos (SAMUELSSON, 1999).

Os isoflavonoides são caracterizados, como os demais flavonoides, por uma cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano. Esta classe de compostos secundários apresenta uma diversidade estrutural importante: além das isoflavonas, isoflavanonas, isoflavenos e aril-3-cumarinas encontram-se estruturas ciclizadas como os pterocarpanos, cumestanos, cumarocromonas, sendo que algumas possuem um carbono suplementar (rotenoides). As três propriedades biológicas mais importantes dos isoflavonoides são: antifúngicas e antibacterianas (fitoalexinas), atividade estrogênica das isoflavonas e cumestanos, e propriedades inseticidas dos rotenoides (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Estes não são de ocorrência restrita às leguminosas, como se acreditou por muito tempo. Estes são sintetizados por pelo menos 60 famílias que pertencem a grandes distâncias de unidades taxonômicas (por exemplo: Briófitas, Coniferófitas e Magnoliófitas). A relação entre a produção de isoflavonoides pelas famílias ainda é desconhecida. Na literatura, nenhuma informação está disponível sobre enzimas responsáveis pelo passo de migração do grupo aril na biossíntese de isoflavonas por não-legumes (LAPČÍK, 2007).

Estes compostos em leguminosas são formados por uma ramificação da rota biossintética dos flavonoides, originários de uma flavanona intermediária central que é ubiqüamente presente em plantas (**Figura 2**). Na biossíntese dos isoflavonoides primeiramente a flavanona perde o hidrogênio da posição C-3, seguido de uma migração do anel B de C-2 para C-3 e subsequente hidroxilação da posição C-2. Essa reação requer NADPH e oxigênio molecular e é catalisada pela enzima isoflavona sintetase que consiste de 2-hidroxiisoflavona sintase (2-HIS) e 2-hidroxiisoflavanona desidratase (DIXON e STEELE, 1999; DIXON e FERREIRA, 2002). Acredita-se que todos isoflavonoides são derivados de um restrito número de isoflavonas simples, como por exemplo, da daidzeína e genisteína (TAHARA e IBRAHIM, 1995).

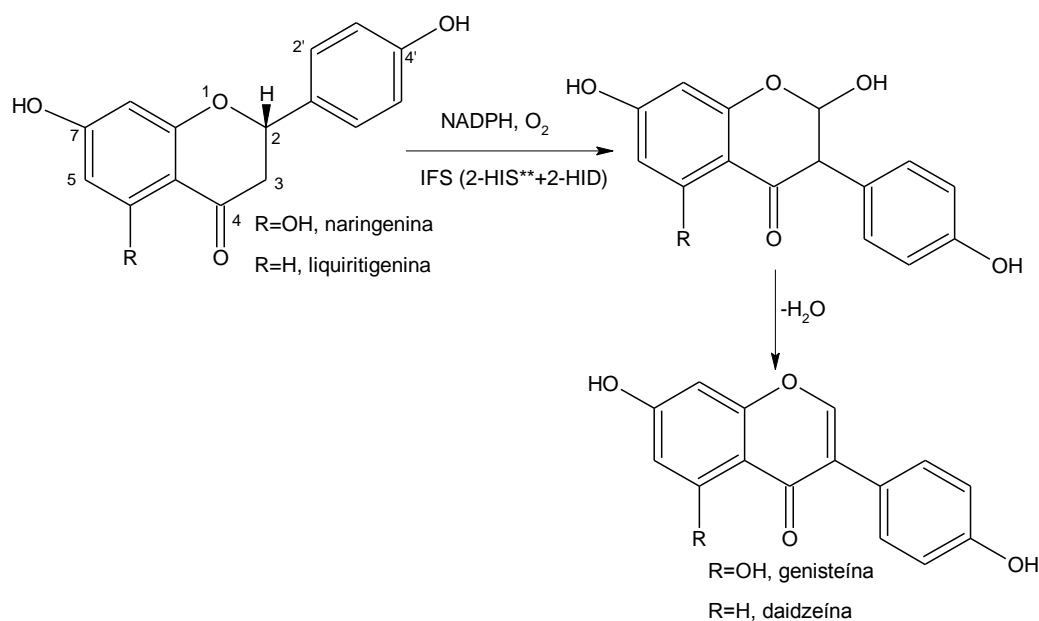


Figura 2: Representação esquemática da biossíntese dos isoflavonoides a partir de uma flavanona. Enzima IFS: isoflavona sintetase (consiste em 2-HIS, 2-hidroxiisoflavona sintase; 2-HID, 2-hidroxiisoflavona desidratase). **hidroxilase do citocromo P450.

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

Os fitoestrógenos fenólicos são membros dos flavonoides e podem ser divididos em 6 categorias principais: cumestanos, neolignanas, isoflavonas, flavonas, flavanonas e chalconas. Na **Figura 3** estão apresentadas as estruturas químicas destas diferentes classes (MIKSICEK, 1994). A estrutura química destes grupos mostra algumas similaridades com a estrutura (**Figura 4**) e o peso molecular do 17 β -estradiol e, por isso conseguem se ligar aos sítios de ligação dos receptores estrogênicos (BECK *et al.*, 2005).

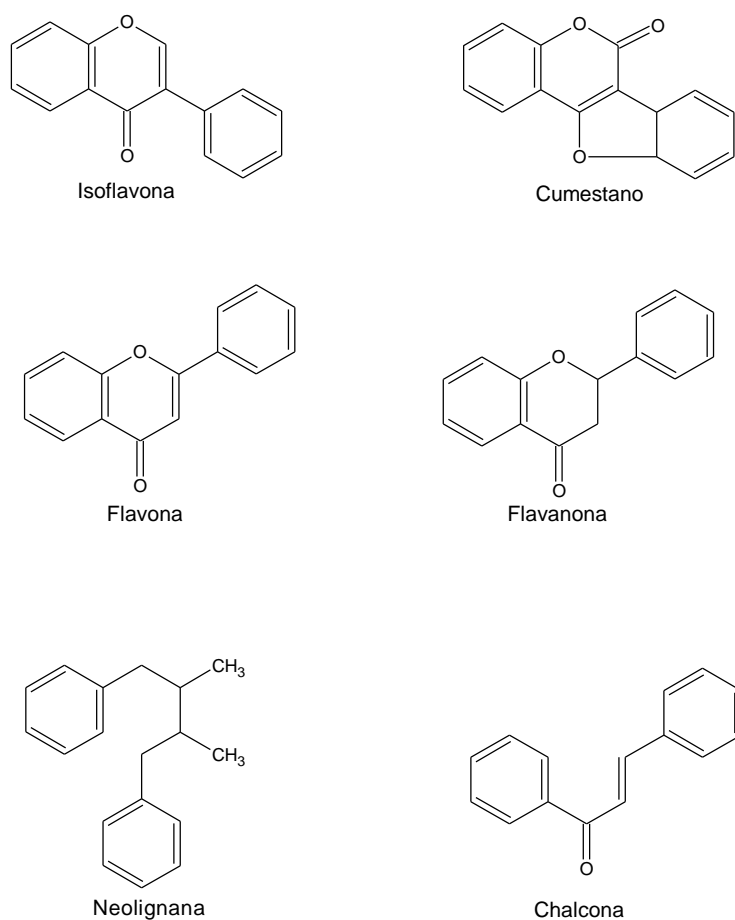


Figura 3: Estrutura química de diferentes grupos de fitoestrógenos.

Alguns aspectos estruturais dos fitoestrógenos são necessários para exercerem atividade estrogênica, como o núcleo da estrutura dos flavonoides com grupos 2,4-hidroxil em certas posições é fundamental para a estrogenicidade, mas a metilação dos grupos hidroxil diminui o efeito estrogênico. As isoflavonas possuem maior atividade estrogênica do que os outros flavonoides, devido à posição 2 do anel benzênico (ZAND *et al.*, 2000; BECK *et al.*, 2005).

Existem mais de 350 isoflavonas conhecidas, fazendo delas o maior grupo de compostos na classe dos isoflavonoides. As quatro isoflavonas mais comuns associadas com plantas ou extratos fitoestrogênicos são: daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A (**Figura 4**).

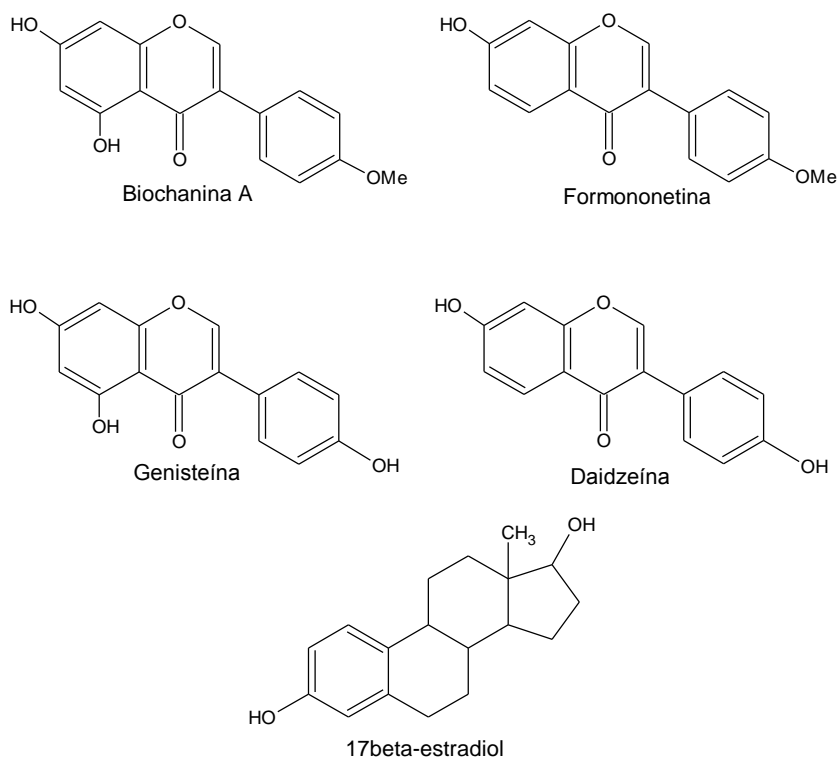


Figura 4: Estrutura química das isoflavonas biochanina A, genisteína, daidzeína e formononetina e do 17 β -estradiol.

3.3 Estudos químicos das isoflavonas de trevo-vermelho

A concentração das isoflavonas em leguminosas é controlada por fatores genéticos e ambientais (SIVESIND e SEGUIN, 2005). As isoflavonas são constitutivamente encontradas em leguminosas, mas suas concentrações são aumentadas frequentemente em resposta a fatores de estresse bióticos e abióticos.

Elas possuem um papel na resposta de defesa da planta em diversas situações, incluindo ataque de patógenos, raios UV, e danos físicos e químicos, assim como também estão envolvidas em interações simbióticas planta-inseto (SIVESIND e SEGUIN, 2006).

O trevo-vermelho possui grandes concentrações das isoflavonas biochanina A (5,7-diidroxí-4'-metoxiisoflavona) e formononetina (7-hidroxí-4'-metoxiisoflavona), e em menor concentração também são encontradas a daidzeína (7,4'-diidroxíisoflavona) e a genisteína (5,7,4'-triidroxíisoflavona) (VETTER, 1995; MAZUR *et al.*, 1998; KRENN *et al.*, 2002). Estudos qualitativos revelaram que as isoflavonas contidas no trevo-vermelho são comumente encontradas como glicosídeos, ésteres malonato glicosídeos ou agliconas livres (LIN *et al.*, 2000; KLEJDUS *et al.*, 2001; SWINNY e MARKHAM, 2003; WU *et al.*, 2003).

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

KLEJDUS *et al.* (2001) utilizaram o método de CLAE-espectrometria de massas combinado com extração em fase sólida para identificar conjugados de isoflavonas no trevo-vermelho. Este método foi capaz de isolar e identificar 14 glicosídeos malonatos (daidzina-6''-O-malonato, genistina-6''-O-malonato, orobol-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, 3-metilorobol-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, calicosina-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, pratenseína-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, pseudobaptigenina-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, formononetina-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, irilona-4'-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, afrormosina-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, biochanina A-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, texasina-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, 5,7,2'-triidróxi-6-metoxiisoflavona-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato, prunetina-4'-O-β-D-glucosídeo-6''-O-malonato) e 6 acetil-glicosídeos (daidzina-6''-O-acetato, formononetina-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-acetato, pseudobaptigenina-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-acetato, irilona-4'-O-β-D-glucosídeo-6''-O-acetato, biochanina A-7-O-β-D-glucosídeo-6''-O-acetato e prunetina-4'-O-β-D-glucosídeo-6''-O-acetato).

Um estudo sobre a variação sazonal de daidzeína, genisteína, biochanina A e formononetina em trevo-vermelho, foi realizado por BOOTH *et al.* (2006) através de um método de quantificação por CLAE dos extratos de flores e partes aéreas durante o período de junho a outubro nos Estados Unidos (Chicago). Para preparar as amostras, foram coletadas as partes aéreas das plantas de trevo-vermelho (contendo folhas, hastes, pecíolos e flores). Neste estudo foi verificado que as folhas possuíam maior quantidade de isoflavonas que as flores. Daidzeína e genisteína obtiveram seus picos de concentração entre junho a julho, enquanto que a formononetina e a biochanina A obtiveram seus picos de concentração no começo de setembro.

TSAO *et al.* (2006) avaliaram o perfil das isoflavonas daidzeína, genisteína, biochanina A e formononetina em 13 cultivares de trevo-vermelho, e observaram que em todas as amostras a maioria das isoflavonas encontram-se na forma de aglicona, discordando de estudos anteriores que demonstravam que as formas de glicosídeos e malonilglicosídeos seriam as majoritárias. Estes pesquisadores também verificaram a distribuição das isoflavonas nas diferentes partes da planta; as folhas tiveram a maior concentração de isoflavonas, seguida pelas hastes, pecíolos e flores. A biochanina A e a formononetina foram as isoflavonas predominantes em todas as cultivares e em todas as partes das plantas, seguidas por oito agliconas (daidzeína, genisteína, gliciteína, irilona, orobol, pratenseína, pseudobaptigenina, e prunetina), e quatro malonilglicosídeos (genisteína-7-glicosídeo-6''-malonato, orobol-7-glicosídeo-6''-malonato, formononetina-7-glicosídeo-6''-malonato, e biochanina A-7-glicosídeo-6''-malonato).

Utilizando um método CLAE-UV-ionização por eletrospray/ espectrometria de massas, WU *et al.* (2003) identificaram e quantificaram isoflavonas, no trevo-vermelho e espécies relacionadas (*T. repense* L., *T. hybridum* L., *T. campestre* Scheber), em quatro diferentes tecidos vegetais (folhas, hastes, raízes e flores). Deste modo, detectaram um total de 31 isoflavonas (incluindo agliconas, glicosídeos e malonatos glicosídeos) no trevo-vermelho. Através de CLAE em fase reversa foram separadas todas as 10 agliconas de isoflavonas (daidzeína, formononetina, genisteína, pseudobaptigenina, gliciteína, calicosina, prunetina, biochanina A, irilona e pratenseína) em extratos de trevo-vermelho hidrolisados. Os resultados deste

estudo revelaram que o perfil das isoflavonas e seus conteúdos entre diferentes espécies demonstraram grande variação entre as espécies e o tecido de coleta. A concentração de isoflavonas em trevo-vermelho foi muito maior do que a encontrada nas espécies relacionadas, sendo o teor de isoflavonas no trevo-vermelho significativamente maior nas folhas, hastes e raízes do que nas flores.

LIN *et al.* (2000) estudaram por cromatografia líquida-ionização por eletrospray-espectrometria de massas (CL-IES-EM) os flavonoides e seus malonatos glicosídeos de flores e folhas de trevo-vermelho. Este estudo determinou que as flores apresentaram flavonas como seus flavonoides majoritários, enquanto que as folhas, as isoflavonas.

HE *et al.* (1996) analisaram flavonoides de flores de trevo-vermelho por CL-EM, e detectaram um total de 11 flavonoides, entre eles, sete flavonoides – genisteína, isoquercitrina, ononina, daidzeína, sissotrina, formononetina e biochanina A – foram identificados de modo não ambíguo baseado na abundância de íons $[M + H]^+$ e $[M + Na]^+$, espectro de UV, tempo de retenção e análise de produtos hidrolisados.

KRENN *et al.* (2002) desenvolveram e validaram um método por CLAE para determinação de daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em trevo-vermelho. Estes compostos foram quantificados após extração hidrolítica utilizando um padrão interno. Este método foi aplicado para análise de diferentes cultivares da planta. Em todas as amostras a formononetina e biochanina A foram os componentes principais, enquanto que apenas pequenas quantidades de daidzeína e genisteína foram detectadas. O conteúdo de biochanina A e formononetina variou de 0,025 a 0,3%, e as concentrações de daidzeína e genisteína ficaram em torno de um décimo deste valor, dependendo da cultivar e origem.

SIVESIND e SEGUIN (2005), em seus estudos, realizaram uma série de experimentos de campo (no Canadá) a fim de determinar os efeitos do meio ambiente, cultivares (10), maturidade da planta, parte da planta e método de preservação na concentração de duas isoflavonas predominantes no trevo-vermelho (formononetina e biochanina A). Como conclusão, este trabalho demonstrou que o meio ambiente possuiu um grande efeito na concentração de isoflavonas no trevo-

vermelho; as cultivares também diferiram na concentração de isoflavonas, onde a concentração total de isoflavonas (concentração de formononetina somada à concentração de biochanina A) variou entre 1525 e 16756 $\mu\text{g g}^{-1}$ (ou 0,15 e 1,67 %) de planta seca; as grandes diferenças observadas entre as partes da planta e seu estágio de maturidade ressaltam a necessidade de se elaborar recomendações específicas para a produção de trevo-vermelho para extração de isoflavonas.

Em outro estudo, SIVESIND e SEGUIN (2006) testaram a possibilidade de induzir a produção de isoflavonas nas folhas de duas cultivares de trevo-vermelho (*Azur* e *Start*) em casa de vegetação através da aplicação de compostos elicitores. A concentração da daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A foram determinadas por CLAE. Foi obtido um aumento das isoflavonas totais de 12%, quando usado extrato de levedura como elicitor; 14% para quitosana e 15% para ácido acético.

PENG e YE (2006) desenvolveram e validaram um método de eletroforese capilar com detecção eletroquímica para analisar isoflavonas em trevo-vermelho. Este método identificou e quantificou daidzeína (0,382 - 0,872 mg g^{-1} , ou 0,03 – 0,08 %), genisteína (0,388 - 0,496 mg g^{-1} , ou 0,03 – 0,05 %) e biochanina A (1,68 - 2,11 mg g^{-1} , ou 0,17 – 0,2 %) em três amostras de trevo-vermelho de diferentes variedades.

3.4 Validação de métodos analíticos

A necessidade de comprovar a qualidade de medições de conteúdos químicos, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. O método deve ser validado para garantir informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra (RIBANI *et al.*, 2004). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003) o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. A importância da validação é crucial para assegurar que determinado método analítico seja, no mínimo, exato, preciso, específico, reprodutível e robusto,

dentro de uma variação específica em que um analito presente numa dada matriz é analisado (ICH, 1996; USP 29, 2006).

A participação de plantas medicinais e de medicamentos de origem vegetal é crescente no arsenal terapêutico. Desta forma, a necessidade de efetuar o controle de qualidade, através de técnicas modernas e eficientes, também aumenta (SHARAPIN, 2000).

Em se tratando de plantas medicinais, o controle da qualidade assume particular importância. Isto porque alguns parâmetros essenciais para a qualidade da matéria-prima vegetal e, conseqüentemente, do produto final, podem variar quanto à composição química, pureza e características fenotípicas, dependendo da procedência do material, bem como quanto a fatores externos como: temperatura, umidade, luminosidade, nutrientes do solo, método de coleta, secagem e transporte, parte da planta usada, entre outros (CALIXTO, 2001; FARIAS *et al.*, 2003).

Os parâmetros analíticos devem estar baseados no objetivo do uso do método, e sendo assim, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (RIBANI *et al.*, 2004).

Os métodos analíticos podem ser de quatro tipos (ICH, 1993), descritos a seguir.

- Testes de identificação: os quais visam assegurar a identidade do analito presente na amostra. Geralmente é realizado através de ensaios comparativos das propriedades da amostra e um padrão.
- Testes para a quantificação de impurezas: permitem conhecer as características de pureza da amostra.
- Testes para o controle do limite de impurezas.
- Testes para a quantificação da substância ativa presente em amostra da substância pura ou de produtos acabados, ou de componentes que fazem parte da formulação.

De acordo com o método analítico desenvolvido, o analista escolhe quais parâmetros específicos devem ser avaliados para assegurar que o mesmo esteja validado. Estes parâmetros encontram-se descritos a seguir (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

- **Especificidade e seletividade** avaliam a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Em ensaios cromatográficos, deve-se tomar precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.
- A **linearidade** é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade é avaliada mediante análise da reta gerada por um grupo de sinais como função da concentração do analito. Deve-se utilizar um mínimo de concentrações, e apresentar-se o coeficiente de correlação, o intercepto da ordenada, a inclinação da linha de regressão e a soma residual dos quadrados, assim como o gráfico obtido e o desvio padrão.
- O **intervalo especificado** é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado. O intervalo de linearidade é estabelecido confirmando se o método apresenta linearidade, exatidão e precisão ao ser aplicado à análise de amostras com concentrações entre 80 – 120% da substância ativa presente na formulação.

- A **precisão** é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corridas), precisão intermediária (precisão inter-corridas) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) e se expressa em termos de variância, desvio padrão relativo ou coeficiente de variação de uma série de medidas. A *repetibilidade* se refere à precisão do método quando se utilizam as mesmas condições operativas, num curto período de tempo. Este parâmetro se avalia utilizando um mínimo de nove determinações com concentrações dentro da faixa de linearidade do método, ou com um mínimo de seis determinações com 100% da concentração esperada da amostra. A *precisão intermediária* mede as variações que podem ocorrer dentro do laboratório, tais como dias diferentes de análise, diferentes analistas, diferentes equipamentos. A *reprodutibilidade* expressa a precisão entre laboratórios diferentes e é testada através de estudos colaborativos.
- O **limite de detecção** mede a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado através de cálculos matemáticos.
- O **limite de quantificação** mede a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Este parâmetro é determinado através de cálculos matemáticos.
- A **exatidão** de um método analítico mede a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. Deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja,

três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

- A **robustez** de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

3.5 Determinação da estabilidade química

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005). Atualmente, uma das exigências para o registro de medicamentos fitoterápicos é o prazo de validade dos mesmos, onde devem constar resultados do estudo de estabilidade acelerada acompanhado dos estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2004).

O estudo de estabilidade acelerado é o estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (BRASIL, 2005).

A maioria dos métodos de estudo de estabilidade acelerada fundamenta-se na medida da velocidade de degradação a temperaturas superiores que a normal, para logo fazer inferências do que aconteceria à temperatura ambiente. Estão embasados em princípios físico-químicos e para tanto se torna necessário conhecimentos básicos em cinética química a fim de poder interpretar os resultados (NUDELMAN, 1975).

A estabilidade de isoflavonas em extratos (em solução) de trevo-vermelho foi estudada por RIJKE *et al.* (2001) que observaram que os extratos podem ser

armazenados por pelo menos 1 - 2 semanas a - 20 °C sem perda dos malonatos de biochanina A e formononetina. Entretanto, foi demonstrado que a amostra guardada em temperatura ambiente e, também armazenada seca a -20 °C, a degradação começa quase que imediatamente, sendo, sob estas condições o grupo malonato perdido, mas os glicosídeos permanecem intactos. Esta diminuição da concentração dos malonatos em amostras secas foi atribuída como sendo consequência da evaporação incompleta do eluente da solução.

3.6 Melhoramento genético

O consumo de plantas medicinais está espalhado por todo o mundo e vem aumentando. Coletar estas plantas da natureza selvagem, a principal fonte deste tipo de material, está causando perda da diversidade genética e destruição do *habitat*. O cultivo é uma alternativa viável e oferece oportunidades para diminuir os problemas que são próprios de plantas medicinais: identificação incorreta, variabilidade genética e fenotípica, instabilidade, componentes tóxicos e contaminantes. Métodos tradicionais de melhoramento vegetal podem melhorar os aspectos agronômicos e medicinais (CANTER *et al.*, 2005).

O melhoramento de plantas é uma importante estratégia para o aumento da produtividade de forma sustentável e ecologicamente equilibrada. Inicialmente era uma arte, pois desde a época dos primeiros agricultores as sementes dos tipos mais desejáveis eram separadas para a propagação da espécie. Atualmente, os vastos conhecimentos científicos têm conduzido o melhorista a resultados previsíveis, acompanhando a evolução tecnológica e contribuindo para o bem estar da humanidade (BORÉM e MIRANDA, 2005).

O melhoramento de plantas é uma ciência biológica, o que significa que não existem métodos únicos para se atingirem objetivos específicos, ou seja, não há receita que possa ser generalizadamente prescrita para o desenvolvimento de novos cultivares. O melhorista deve, de forma crítica, avaliar cada situação e otimizar os recursos disponíveis para alcançar os objetivos dentro da melhor relação custo-benefício (BORÉM e MIRANDA, 2005).

A matéria-prima de um trabalho de melhoramento é a diversidade genética (ALLARD, 1971). Um programa de melhoramento deve manipular a variação existente entre plantas. Esta variabilidade pode ser obtida tanto por ecótipos locais, como por introduções de outras regiões e estas devem ser de regiões as mais variáveis possíveis quanto a solo e clima (PAIM, 1994). Uma das principais formas de acesso a variabilidade são as coleções de germoplasma, e estas têm por objetivo representar a variabilidade presente numa espécie. Os curadores são responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção de coleções de germoplasma *ex-situ* que servem ao duplo propósito de prover material para o melhoramento no presente e conservar diversidade genética para o futuro (FRANKEL e BROWN, 1995).

A coleção de germoplasma de trevo-vermelho do Sistema Nacional de Germoplasma de Plantas dos Estados Unidos (NPGS-USDA) é constituída por 800 acessos originários de 41 países. Uma coleção nuclear tem como objetivo representar a diversidade de toda a coleção em um limitado número de acessos. A coleção nuclear de trevo-vermelho contém 85 acessos de 41 países e representa a diversidade genética presente na espécie e é a fonte de variabilidade mais utilizada em programas de melhoramento vegetal. A coleção nuclear é baseada em: dados morfológicos já existentes no banco de dados da Rede de Informação de Fontes de Germoplasma (GRIN) (KOUAMÉ e QUESENBERRY, 1993).

Acesso é uma amostra de germoplasma de um indivíduo ou de vários indivíduos da população. Em caráter mais geral, qualquer registro individual constante de uma coleção de germoplasma (ex. selvagem, material de melhoramento, cultivar, etc.) (KOUAMÉ e QUESENBERRY, 1993).

Entre os diversos processos envolvidos na introdução e manutenção da divergência genética em espécies de plantas, está a polinização cruzada. Até agora tem sido observado que a formação de híbridos melhora o perfil genético das plantas, dando a elas uma melhor qualidade e rendimento na produção de materiais vegetais (BHARGAVA *et al.*, 2005).

FERGUS e HOLLOWEL (1960) afirmaram que até 1940 a maioria das características apresentadas pelas linhagens de trevo-vermelho foi resultado da seleção natural. WILSIE (1976) também percebeu a importância dessa última sobre

populações cultivadas por algum tempo em determinados lugares. O autor relatou que, em experimentos conduzidos em várias estações experimentais norte-americanas, algumas linhas locais produziram tanta forragem quanto as variedades desenvolvidas pelo melhoramento.

Vários programas de melhoramento de trevo-vermelho já foram implantados utilizando diversos métodos, sendo a seleção massal um dos mais usados. Neste método, plantas individuais são selecionadas com base no fenótipo, e as sementes, provenientes da fecundação cruzada, são reunidas para formar uma nova população (PAIM, 1994).

PAIM (1994) ainda afirmou que podem ser utilizados certos refinamentos nesse método, como a remoção de plantas indesejáveis antes da polinização, ou transplante dos indivíduos selecionados para uma área isolada, para interpolinização. O mesmo autor argumentou que pelos resultados experimentais, a seleção massal é muito eficiente para características com alta herdabilidade e facilmente identificadas em plantas individuais e, não tem sido efetiva, no entanto, para características com baixa herdabilidade, como rendimento de forragem.

Segundo TAYLOR e SMITH (1979), a maioria dos melhoristas concorda que a seleção massal é eficiente para modificar materiais não melhorados, mas que a seleção posterior deve se basear em testes de progênies. Para TAYLOR e QUESENBERRY (1996), no melhoramento genético de trevo-vermelho, o desempenho das plantas individuais não é tão importante quanto o desempenho de suas progênies.

Em espécies perenes, principalmente aquelas que apresentam auto-incompatibilidade, como é o caso do trevo-vermelho, testes de progênies de polinização aberta (meio-irmãos) são muito utilizados. Em caso de difícil propagação vegetativa da espécie, esses utilizam sementes de plantas individuais, embora a utilização de clones de plantas selecionadas para o estabelecimento de blocos de policruzamentos seja o procedimento mais comum (PAIM, 1994). Segundo o autor, progênies de polinização aberta de plantas individuais correspondem ao método chamado de linhas de seleção materna, pelo qual as melhores plantas das progênies superiores são intercruzadas para formar uma nova população, para novo

ciclo de seleção. Alternativamente, os melhores clones, de acordo com os testes de progênies, podem ser reunidos em blocos de policruzamentos para a posterior formação de cultivares sintéticas, que correspondem à grande maioria das cultivares de forrageiras perenes de fecundação cruzada.

Os trabalhos de melhoramento genético em trevo-vermelho encontram-se, principalmente, em melhoria de seus aspectos agronômicos, como o a produção e especialmente aumento da persistência, onde a resistência a doenças desempenha um papel decisivo (MONTARDO, 2002).

3.7 Atividades farmacológicas

Produtos naturais e preparações para alimentos e suplementos alimentares têm ganhado aumento de atenção atualmente. Neste contexto, há um crescimento de interesse nos efeitos benéficos à saúde de fitoestrógenos, com um foco especial nas isoflavonas. Estas são encontradas em muitos frutos, vegetais e grãos em concentrações variáveis, sendo as maiores concentrações encontradas em grãos de soja e trevo-vermelho (KROYER, 2004).

Grãos de soja e produtos feitos à base de soja são conhecidos como a fonte mais rica de duas isoflavonas estroginicamente ativas, genisteína e daidzeína (ADLERCREUTZ, 1995; REINLI e BLOCK, 1996). Entretanto, pesquisas recentes têm demonstrado que extratos de trevo-vermelho contêm quantidades significativamente altas das quatro principais isoflavonas com atividades estrogênicas: genisteína, daidzeína, biochanina A e formononetina. Isto indica o potencial de aplicação de preparações de trevo-vermelho para terapia de reposição hormonal alternativa (DORNSTAUDER *et al.*, 2001; NACHTIGALL, 2001).

Atualmente, além do interesse nesses compostos pelos benefícios relacionados aos problemas relacionados à menopausa, existem interessantes possíveis papéis de prevenção destes compostos no que diz respeito a câncer de mama e próstata, osteoporose, bem como doenças cardiovasculares (ZGÓRKA, 2009).

O trevo-vermelho é usado na medicina tradicional como expectorante, analgésico, antisséptico, para o tratamento da psoríase, eczemas e constipação

(SABUDAK e GULER, 2009). Na Homeopatia, segundo a matéria médica Clarke, as principais indicações para o *Trifolium pratense* são: câncer, constipação, tosse, caxumba, pâncreas, dor de garganta, entre outros (PARVU, 2004).

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 Mediciniais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, e dentro desta listagem destaca-se o *Trifolium pratense*. A Relação Nacional de Plantas Mediciniais 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, 2009).

Aos flavonoides são atribuídos muitos efeitos biológicos, incluindo atividades antibacterianas, antivirais, anti-inflamatória, antialérgica e ação vasodilatadora. Estes compostos também inibem a lipoperoxidação, agregação plaquetária, permeabilidade capilar, e atividades de sistemas enzimáticos, incluindo cicloxigenase e lipoxigenase. Estes metabólitos manifestam estes efeitos como antioxidantes, sequestradores de radicais livres e queladores de cátions divalentes (COOK e SAMMAN, 1996).

Os efeitos biológicos dos isoflavonoides são bastante diversificados, e aspectos específicos de suas atividades antimicrobianas, estrogênicas e inseticida já foram amplamente estudados. Uma das isoflavonas mais simples, a genisteína, que é a precursora dos 5-hidroxisoflavonoides, tem sido implicada em uma grande variedade de atividades biológicas. Estas incluem atividades estrogênicas e proestrogênicas, anti-hemolítica, antioxidante e anti-câncer; bem como a inibição de diversas enzimas, incluindo a catecol O-metiltransferase, DOPA descarboxilase, dopamina β -hidroxilase, histidina descarboxilase e lipase (TAHARA e IBRAHIM, 1995). A atividade estrogênica do trevo-vermelho é principalmente devido às isoflavonas e em menor parte aos cumestanos (BECK *et al.*, 2005).

As isoflavonas ocorrem principalmente na forma conjugada com açúcares, e sua absorção depende da hidrólise do resíduo de açúcar por β -glucosidases. Depois

da absorção pelo trato digestório, as isoflavonas e seus metabólitos bacterianos seguem via veia porta para o fígado, onde ocorrerá o metabolismo de fase I e II. Do fígado, os metabólitos entram na circulação sistêmica e são finalmente eliminados pelos rins e pela bile. Considerando as numerosas transformações metabólicas que as isoflavonas são submetidas, é evidente que as substâncias disponíveis para os receptores hormonais não são as mesmas que as originais encontradas nas plantas. Genisteína e daidzeína podem derivar da demetilação de seus precursores diretos, biochanina A e formononetina, respectivamente, através de enzimas presentes no trato gastrointestinal. E as isoflavonas são ainda metabolizadas a muitos metabólitos específicos, como equol e *p*-etilfenol. A atividade estrogênica dos metabólitos das isoflavonas podem ser maiores do que a estrogenicidade das isoflavonas naturais (ADLERCREUTZ *et al.*, 1987; KNIGHT e EDEN, 1996; THAM *et al.*, 1998; BECK *et al.*, 2005; PFITSCHER *et al.*, 2008).

Estudos recentes destacam os efeitos de proteção das isoflavonas nas respostas inflamatórias no endotélio vascular. Por exemplo, as isoflavonas daidzeína e genisteína diminuem significativamente a secreção de proteína quimioatraente de monócitos-1 induzida por fator de necrose de tumor- α em células endoteliais da veia umbilical humana. Também foi demonstrado que a genisteína inibe a adesão de monócitos nas células endoteliais da aorta humana e células endoteliais da veia umbilical humana estimuladas por citocinas através da ativação do receptor ativado por proliferador de peroxisomo- γ (anti-inflamatório) (LEE e LEE, 2008).

As isoflavonas atuam como antioxidantes, direta ou indiretamente, pelo aumento da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase. Alguns estudos demonstram que as isoflavonas da soja podem melhorar a atividade cognitiva em humanos e ratos. Além disto, estas substâncias são consideradas boas alternativas para a terapia de doenças dependentes de hormônios e aquelas relacionadas à idade (MONTEIRO *et al.*, 2007)

3.7.1 Estudos biológicos realizados com trevo-vermelho

Trifolium pratense é uma planta rica em isoflavonas, fitoestrógenos que têm sido assunto para um considerável número de pesquisas científicas nos últimos

anos. A maioria dos estudos biológicos realizados com trevo-vermelho está relacionada a problemas relacionados à menopausa. Um estudo realizado por BECK *et al.* (2003) comparou a atividade hormonal (estrogênica, androgênica e progestogênica) de extratos de plantas padronizados usados em grande escala para Terapia de Reposição Hormonal (TRH). Foram utilizados extratos de trevo-vermelho (*Trifolium pratense*), grão de soja (*Glycine max*) e cimicifuga (*Cimicifuga racemosa*). Testados *in vitro* todos os extratos, derivados de trevo-vermelho e de soja demonstraram clara atividade estrogênica para os receptores estrogênicos α (RE α) e β (RE β), afinidade pelo receptor de progesterona (RP) e também para o receptor androgênico (RA), enquanto que os testes realizados com cimicifuga não demonstraram estas atividades nos receptores. Estes resultados foram comprovados com testes utilizando isoflavonas sintéticas tais como biochanina A, daidzeína, genisteína e formononetina. Estas tiveram afinidade pelos RP e RA na faixa de 0,39 – 110 mM. Os produtos com trevo-vermelho demonstraram maior afinidade ao RA e RP quando comparado aos produtos de soja, o que pode ser explicado pela maior quantidade de isoflavonas presentes.

JERI (2002) demonstrou que a ingestão de um comprimido de um suplemento alimentar (Promensil[®]) composto de isoflavonas (40 mg de isoflavonas padronizadas) derivadas do trevo-vermelho por um grupo de 15 mulheres pelo período de 16 semanas foi suficiente para redução da frequência e da severidade dos fogachos. Sendo, esta, uma alternativa efetiva para aliviar os sintomas vasomotores em mulheres pós-menopausa.

ATKINSON *et al.* (2004) realizaram um estudo para determinar os efeitos do consumo de um suplemento alimentar com isoflavonas derivadas do trevo-vermelho (em uma dose diária contendo 26 mg de biochanina A, 16 mg de formononetina, 1 mg de genisteína e 0,5 mg de daidzeína) por 1 ano para avaliar a Densidade Mineral dos Ossos (DMO) e o Conteúdo Mineral dos Ossos (CMO) da espinha lombar e do quadril, e também avaliar os marcadores de formação de ossos. O estudo foi realizado com mulheres (n=177) com idade entre 49 – 65 anos. Neste trabalho, a perda do CMO da espinha lombar e da DMO foram significativamente menores nas mulheres que tomaram o suplemento de isoflavonas comparado com as que tomaram placebo. Não houve efeitos significativos do tratamento no CMO e na DMO

do quadril. Os marcadores de formação dos ossos foram significativamente aumentados no grupo tratado.

KRENN e PAPER (2009) realizaram um estudo onde avaliaram o efeito angiogênico de um extrato de trevo-vermelho, usado como suplemento alimentar para complicações da menopausa, e das principais isoflavonas em um sistema *in vivo*. Uma dosagem de 250 $\mu\text{g/pellet}$ de extrato de trevo-vermelho demonstrou excelente inibição da angiogênese. A atividade antiangiogênica das isoflavonas não metiladas daidzeína e genisteína foram superiores aos compostos metilados formononetina e biochanina A. Os resultados demonstraram que o extrato de trevo-vermelho não é apenas adequado para as complicações da menopausa, mas também pode ser um poderoso agente quimiopreventivo contra as doenças crônicas, que possuem uma grande incidência especialmente em mulheres idosas.

OCCHIUTO e colaboradores (2008) testaram os efeitos neuroprotetivos de uma mistura de isoflavonas de trevo-vermelho em neurônios do córtex humano mantido em cultura. Os resultados deste experimento indicam que estes fitoestrógenos exercem uma significativa e dose-dependente redução no marcador de dano da membrana plasmática, a liberação de lactato desidrogenase, e um aumento significativo da viabilidade de mitocôndrias neuronais.

CHEN e colaboradores (2008) estudaram o efeito de proteção de cinco isoflavonas (formononetina, daidzeína, pratenseína, calicosina e irilona) de trevo-vermelho em neurodegeneração dopaminérgica induzida por lipopolissacarídeo. Os resultados demonstraram que as cinco isoflavonas atenuaram a diminuição de lipopolissacarídeo na captação de dopamina e no número de neurônios dopaminérgicos de uma maneira dose-dependente. Além disso, elas também inibiram significativamente a ativação induzida por lipopolissacarídeos da microglia e produção de tumores de necrose fator- α , óxido nítrico e superóxido nas culturas de neurônios-glia mesencefálicas e culturas enriquecidas de microglia. Este estudo sugeriu que todas as cinco isoflavonas protegeram os neurônios dopaminérgicos contra lesões causadas pela indução de lipopolissacarídeos através da inibição da ativação da microglia e da geração de fatores proinflamatórios.

KROYER (2004) demonstrou que extrato de folhas de trevo-vermelho além de ser uma fonte rica em isoflavonas, possui significativas quantidades de polifenóis (153 mg/g de extrato de trevo-vermelho e 114 mg/g de suplemento alimentar à base de trevo-vermelho), quantidades superiores às encontradas em extratos de soja (18 mg/g de extrato de soja). Utilizando o método do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), que é reduzido na presença de substâncias com atividade antioxidante. Os extratos de material vegetal de trevo-vermelho (folhas) e o suplemento alimentar de trevo-vermelho possuem maior potencial antioxidante quando comparados ao extrato de soja, sendo a concentração efetiva (CE_{50}) para extrato de trevo-vermelho 0,32 mg/mL, para o suplemento alimentar de trevo-vermelho a CE_{50} 0,50 mg/mL, e para o extrato de soja a CE_{50} 1,19 mg/mL.

4.1 Material

4.1.1 Material Vegetal

A coleção de germoplasma de trevo-vermelho do “National Plant Germplasm System of The United States Department of Agriculture” (NPGS-USDA) é composta de cerca de 800 acessos oriundos de 41 países (KOUAMÉ e QUESENBERRY, 1993). Para facilitar a conservação e o uso efetivo de coleções de germoplasma, BROWN (1989) propôs a formação de coleções nucleares que contêm um menor número de acessos e que representam igualmente a variabilidade genética presente numa espécie. A coleção nuclear de trevo-vermelho foi formada por KOUAMÉ e QUESENBERRY (1993) através da análise de 463 acessos da coleção de germoplasma de trevo-vermelho utilizando dados de 15 medidas morfológicas presentes no banco de dados do NPGS-USDA. Esta coleção nuclear é formada por 85 acessos provenientes de 41 países (KOUAMÉ e QUESENBERRY, 1993).

Para o presente estudo, folhas de 77 acessos, pertencentes à coleção nuclear de trevo-vermelho, obtidos no USDA, e uma população brasileira (EEA/UFRGS) (**Tabela 1**) foram cultivados na Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Também uma população local denominada Nova Santana, obtida na região de Ijuí, RS, cultivada na Estação Experimental Agronômica da UFRGS foi utilizada, para preparação do extrato seco e posterior utilização deste nos ensaios biológicos e teste de estabilidade acelerada.

4.1.2 Solventes e reagentes

Os solventes empregados nos procedimentos fitoquímicos deste trabalho foram: água destilada, metanol, ácido clorídrico, diclorometano, etanol, acetona, ácido trifluoroacético. Os solventes foram utilizados com grau p.a. (para análise), exceto aqueles utilizados em CLAE que se apresentavam adequados para esta técnica.

Tabela 1: Dados dos acessos de trevo-vermelho (*Trifolium pratense*).

Número	Acesso	Origem	Nome	Tipo
1	PI 237705	Dinamarca	Hinderupgaard III	cultivar
2	PI 196424	Dinamarca	N° 9500	incerto
3	PI 217507	Dinamarca	Early otofte III	cultivar
4	PI 237714	Dinamarca	Otofte III	cultivar
5	PI 235847	Suécia	HEBY	variedade local
6	PI 235854	Suécia	Labberud	variedade local
7	PI 235870	Suécia	Svanvik	variedade local
8	PI 229799	Finlândia	Tammisto	cultivar
9	PI 236455	Finlândia	Mynskylä	cultivar
10	PI 310459	Suíça	Dettenbuhl	cultivar
11	PI 266047	Polônia	Wielkolistna	cultivar
12	PI 384058	Polônia	Viola	cultivar
13	PI 294481	Áustria	Reichersbersger rotklee	cultivar
14	PI 318888	Hungria	Cigandi	variedade local
15	PI 315522	Itália	G 17210	incerto
16	PI 249870	Grécia	N 17109	selvagem
17	PI 253583	Espanha	K 2086	selvagem
18	PI 188680	França	G 13945	material cultivado
19	PI 207972	França	NSL 060134	incerto
20	PI 201191	Holanda	NSL 060106	incerto
21	PI 204506	Turquia	N° 292	incerto
22	PI 204507	Turquia	N° 382	incerto
23	PI 371959	Bulgária	SOFIA 52	cultivar
24	PI 294797	Bulgária	ARSAN	variedade local
25	PI 251564	Iugoslávia	19660	material cultivado
26	PI 207520	Afganistão	N° 12623	incerto
27	PI 228160	União Soviética	Zazersk	cultivar
28	PI 345675	Rússia	Kirovskij 159	material cultivado
29	PI 419550	Japão	TENDA-Selection	material de melhoramento
30	PI 184960	Austrália	NSL 060086	Incerto
31	PI 187284	Reino Unido	Aberystwyth s 151	cultivar
32	PI 306188	Reino Unido	Drewitts	cultivar
33	PI 315534	Canadá	Memmos	cultivar
34	PI 295355	Estados Unidos	Rahn Redclover	variedade local
35	PI 230229	Estados Unidos	N° 55-7	variedade local
36	PI 302421	Colômbia	Trebol rojo	cultivar
37	PI 304842	Chile	Quinekeli	cultivar
38	PI 226952	Etiópia	N° 363	selvagem
39	-	Brasil	EEA/UFRGS	material de melhoramento
40	PI 314840	Noruega	JRIPO F81	cultivar
41	PI 188905	Suécia	Merkur	cultivar
42	PI 235867	Suécia	Sorby Okna	variedade local
43	PI 310465	Suíça	G15485	incerto
44	PI 179146	Suíça	Perennial Bernois	material cultivado
45	PI 234925	Suíça	N° 16213	selvagem
46	PI 239696	Suíça	N 150	incerto
47	PI 632214		G 21245	incerto
48	PI 255894	Polônia	Hruszowska ciemna	cultivar
49	PI 225119	Alemanha	NSL 060146	cultivar
50	PI 187008	Alemanha	N° 1687	material cultivado
51	PI 234836	Alemanha	N° 8	selvagem
52	PI 318887	Hungria	Bakonyi	variedade local
53	PI 418889	Itália	296	selvagem
54	PI 419294	Grécia	122	selvagem
55	PI 220856	Portugal	NSL 060141	incerto
56	PI 311492	Espanha	M-193	incerto
57	PI 307948	Espanha	N° 942	selvagem
58	PI 189174	Holanda	Groninger	cultivar
59	PI 187224	Bélgica	Oudenaerdse	cultivar
60	PI 234448	Bélgica	N° 16104	cultivar
61	PI 205313	Turquia	N 642a	incerto

Continuação Tabela 1: Dados dos acessos de trevo-vermelho (*Trifolium pratense*).

Número	Acesso	Origem	Nome	Tipo
62	PI 120105	Turquia	BN9466-59	variedade local
63	PI 171870	Turquia	N° 6948	incerto
64	PI 314487	Geórgia	N° 188	selvagem
65	PI 315533	Bulgária	Sofia 66	cultivar
66	PI 228365	Irã	N 14849	incerto
67	PI 250899	Irã	K 1689	selvagem
68	PI 401469	Romênia	Perena	cultivar
69	PI 232941	Hungria	Fertodi	cultivar
70	PI 440737	Rússia	D-1600	selvagem
71	PI 419565	Japão	SV-0116	material de melhoramento
72	PI 376880	Nova Zelândia	Grasslands Hamua	cultivar
73	PI 306185	Reino Unido	Berrys	cultivar
74	PI 286116	Canadá	Redon	cultivar
75	PI 286222	Canadá	CAN 5027	cultivar
76	PI 306677	Equador	N° A-1847	variedade local
77	PI 449326	Chile	Trebol rosado	variedade local
78	PI 271627	Índia	N° 1214	incerto

4.2 Métodos

4.2.1 Estudos químicos

4.2.1.1 Preparo das amostras de trevo-vermelho

As amostras das plantas de trevo-vermelho de número 1 ao 39 (apresentados na **Tabela 1**) foram preparadas pelo Método 1. Neste método, as plantas tiveram suas folhas coletadas entre 07 – 08:30 h da manhã, imediatamente cortadas, secas em estufa por 1 hora a 100 °C, e trituradas em um gral com auxílio de pistilo. Cada acesso foi preparado em triplicata. Foram pesados 10 mg das folhas secas e trituradas (em gral com auxílio de pistilo), em balança analítica, adicionando-se 4 mL de ácido clorídrico 6N, mantendo-se por 15 minutos em banho-maria com água fervente sob aquecimento com agitação magnética. Filtrou-se a solução com papel filtro. Após, esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL sendo ajustado seu volume. Este extrato foi filtrado com membrana filtrante hidrofóbica (Millipore; 0,45 µm, 13 mm) para posteriormente ser analisado por CLAE. O método de preparo das demais amostras deste trabalho, foram preparadas conforme está descrito no próximo parágrafo.

Todas as plantas (com exceção dos trevos-vermelhos de número 1 ao 39, apresentados na **Tabela 1**) foram preparadas empregando modificações no Método 1, chamado Método 2, descrito a seguir. As folhas do trevo-vermelho foram sempre coletadas entre 07 – 08:30 h da manhã, imediatamente cortadas, secas em estufa

por 1 hora a 100 °C, e trituradas em um gral com auxílio de pistilo. Cada acesso foi preparado em triplicata. Foram pesados 10 mg das folhas secas e trituradas e adicionados 4 mL de ácido clorídrico 6N, mantendo-se por 15 minutos em banho-maria com água fervente sob aquecimento com agitação magnética. Após esfriamento e filtração sobre algodão, o filtrado é extraído com diclorometano (3 X 15 mL). A parte orgânica foi evaporada em evaporador rotatório (água em temperatura de 50 °C) e o resíduo ressuspendido em metanol 10,0 mL. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e seu volume ajustado. Este extrato foi filtrado com membrana filtrante hidrofóbica (Millipore; 0,45 µm, 13 mm) para posterior análise por CLAE, sendo realizadas três determinações para cada amostra.

4.2.1.2 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada utilizando os parâmetros descritos na **Tabela 2**, a seguir. O sistema utilizado foi no modo gradiente, o qual encontra-se descrito na **Tabela 3**.

Tabela 2: Parâmetros para análise cromatográfica de trevo-vermelho (*Trifolium pratense*).

Características	Descrição
Cromatógrafo	Cromatógrafo Waters Alliance 2695
Detector	UV/VIS Waters 2487
Coluna	Nova-Pak (R) C18 ¹ Lote: E6015A
Pré-coluna	Lichrospher Merck ²
Sistema de eluição	Gradiente
Fase móvel	A: Acetonitrila:Água:Ácido Trifluoroacético (20:80:0,01; v/v/v) B: Acetonitrila:Ácido Trifluoroacético (100:0,1; v/v)
Fluxo	0,7 mL/min
Volume de injeção	10,0 µL
Comprimento de onda	260nm
Sensibilidade de detecção	0,05 AUFS

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

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

Tabela 3: Sistema gradiente utilizado para a análise por CLAE de trevo-vermelho (*Trifolium pratense*).

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,01	100	0
10,0	60	40
11,0	60	40
12,0	0	100

4.2.1.3 Validação do método de análise por CLAE

O método foi validado para os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

A especificidade foi determinada através da avaliação da pureza dos picos das isoflavonas de interesse de uma amostra de trevo-vermelho utilizando detector PDA (cromatógrafo Waters Alliance 2690, detector Fotodiodos Waters 996).

A linearidade entre a área do pico e a concentração das isoflavonas foi testada pela obtenção de três curvas de calibração construídas em três dias diferentes com soluções padrão de daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em seis concentrações diferentes para cada uma delas, variando de 0,01 a 0,2 µg/mL para daidzeína, 0,05 a 0,5 µg/mL para genisteína, 4 a 40 µg/mL para formononetina e 2 a 20 µg/mL para biochanina A.

A exatidão do método foi determinada pela análise de amostras de trevo-vermelho que foram adicionadas de concentrações conhecidas de soluções padrão das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, e realizou-se nove determinações (três concentrações, três soluções de cada).

A precisão foi avaliada em dois níveis: precisão intra-dias e precisão inter-dias. A precisão intra-dias foi determinada após a injeção de três amostras (três vezes cada) em um mesmo dia. A precisão inter-dias foi avaliada pela análise de três amostras (três vezes cada) durante três dias consecutivos.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados a partir de três amostras de cada isoflavona (a menor concentração da curva de calibração), as quais produziram uma relação sinal ruído.

A robustez foi avaliada pela injeção de seis soluções de amostra no sistema cromatográfico determinado e neste com pequenas alterações (diferente lote da coluna cromatográfica, pH da fase móvel modificado, diferente fluxo da fase móvel).

4.2.1.4 Análise dos acessos da coleção nuclear de trevo-vermelho

Os acessos descritos na **Tabela 1** foram preparados conforme item **4.2.1.1** e analisados conforme o item **4.2.1.2**. As concentrações das isoflavonas foram determinadas a partir da área do pico, utilizando a equação da reta determinada para cada uma das isoflavonas.

Para a análise estatística a Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada, nos dados de todos acessos e em todas isoflavonas utilizando o PROC GLM do *software* SAS (SAS Institute, 2001). O programa NTSYS versão 2.1 (ROHLF, 2000) foi usado para realizar a análise de componentes principais (ACP) no grupo de 78 acessos usando-se os valores de média padronizados das isoflavonas exibindo um efeito significativo da população.

4.2.1.5 Análise sazonal

A análise da variação dos teores das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A conforme diferentes estações do ano foi realizada com três acessos de trevo-vermelho. As coletas foram realizadas entre o trigésimo e o quadragésimo quinto dia após o começo da estação. Foram feitas coletas sempre das mesmas plantas de cada acesso. As amostras foram preparadas conforme item **4.2.1.1** e analisadas conforme o item **4.2.1.2**.

Usando o PROC GLM do *software* SAS (SAS Institute, 2001), a análise de variância para todas isoflavonas foi realizada em cada um dos três acessos comparando os dados para todas as estações. As concentrações de isoflavonas em cada estação foram comparadas através do teste de Tukey (5%).

4.2.1.6 Preparo do extrato seco de trevo-vermelho

O extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas foi obtido através de extrações repetidas com etanol a 40%, método clássico de maceração. Primeiramente coletou-se o material vegetal e o mesmo foi seco em estufa a 60°C por 7 dias, esta temperatura foi utilizada, pois a estufa usada não permitia aumento da temperatura. As folhas foram separadas do restante e trituradas. Após, realizou-se a maceração das folhas com etanol 40% por 3 dias, sendo filtrado e retirado o

solvente. Essa operação foi repetida por mais 2 vezes. O solvente filtrado foi evaporado em evaporador rotatório para a diminuição do volume. O restante obtido após a evaporação foi extraído 3 vezes com diclorometano (1:1), sendo a fração diclorometano reservada e posteriormente concentrada em evaporador rotatório até a evaporação total do solvente. O resíduo da evaporação foi ressuscitado em água:etanol (95:5, v/v), congelado e seco em liofilizador.

4.2.1.7 Estabilidade química acelerada

As amostras, extrato seco obtido a partir de folhas de *Trifolium pratense* (população Nova Santana), foram submetidas à análise em triplicata. As condições preconizadas para este tipo de estudo, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – na Resolução de n. 1 do ano de 2005 (BRASIL, 2005), são temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa, avaliando-se os pontos P0, P1 e P2, respectivamente, inicial, 90, 180 dias em câmara climática (NOVA ÉTICA, MODELO 420 LCD).

Doseamento: Injetou-se as respectivas amostras de cada ponto em CLAE, sendo possível verificar se ocorreu ou não degradação das isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A). As amostras foram preparadas conforme item 4.2.1.1, Método 2 (pesando-se 5mg de extrato seco, e sem a necessidade da etapa de secagem) e analisadas conforme o item 4.2.1.2.

Cálculos da velocidade de degradação (k), dos tempos de vida útil ($t_{90\%}$) e meia vida ($t_{1/2}$): Com base na análise dos coeficientes de correlação, calculados através de regressão linear dos dados obtidos para o tratamento, é possível verificar se a reação é de ordem zero, primeira ou segunda ordem. Por conseguinte, torna-se viável calcular a velocidade de degradação (k) e os tempos de vida útil ($t_{90\%}$) e meia-vida ($t_{1/2}$). As equações utilizadas para os devidos cálculos foram extraídas de NUDELMAN (1975).

4.2.1.8 Melhoramento genético

Empregou-se o método de seleção massal de plantas individuais, com adaptações, baseado em POEHLMAN e SLEPER (1995). Na seleção massal a população original é avaliada e um número de plantas é selecionada com base no

fenótipo. A semente de polinização aberta das plantas selecionadas é agrupada para dar origem à próxima geração. O ciclo de seleção pode ser repetido uma ou mais vezes para aumentar a frequência de alelos favoráveis.

Foram analisadas individualmente plantas dos 15 acessos que demonstraram maiores teores de isoflavonas (do primeiro bloco de acessos analisados). As melhores plantas foram colocadas para cruzamento natural, ao ar livre. As sementes de cada planta foram colhidas individualmente, e as suas progênies foram avaliadas em relação ao conteúdo de isoflavonas (as amostras foram preparadas conforme item 4.1.2.1.1, e analisadas conforme o item 4.1.2.1.2). Baseado nos resultados, as melhores plantas foram cruzadas visando um aumento na concentração de isoflavonas, que foi então comparado com os acessos originais.

4.2.2 Estudos biológicos

4.2.2.1 Atividade anti-inflamatória *in vitro*

Empregou-se a técnica descrita por SUYENAGA (2002), utilizando o ensaio da câmara de Boyden, modificada por ZIGMOND e HIRSCH (BOYDEN, 1962; ZIGMOND e HIRSCH, 1973; MELLO *et al.*, 1992), através da avaliação da inibição da migração dos leucócitos polimorfonucleares, processo chamado quimiotaxia. A câmara de BOYDEN modificada é composta por duas placas de acrílico (0,5 mL de capacidade cada) dispostas uma sobre a outra: o compartimento inferior foi preenchido com uma solução contendo o fator quimiotático, e o compartimento superior com a amostra dispersa em suspensão de neutrófilos peritoneais, separados por um filtro de nitrocelulose com 13 mm de diâmetro e poros de 8 µm de diâmetro. Dessa forma, pôde-se avaliar a migração das células através do filtro, no gradiente de concentração do fator quimiotático, que se estabeleceu entre os dois compartimentos.

4.2.2.1.1 Animais de experimentação: para a realização deste experimento, foram utilizados animais fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ratos Wistar machos, saudáveis, pesando de 180 a 200 g, mantidos em caixas plásticas contendo no máximo seis animais com livre acesso à água e ração. Passaram por um período de adaptação de 72 horas no Biotério de Passagem da Faculdade de Farmácia – UFRGS, com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), controle

de claro/escuro de 12 horas e umidade monitorada. A manipulação animal foi realizada seguindo princípios éticos para a experimentação animal e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética desta Universidade (Protocolo número 2007723, **Anexo 1**).

4.2.2.1.2 Material biológico: O plasma utilizado foi coletado de ratos Wistar, machos, adultos, sadios, com peso entre 180-220 g, que foram provindos do Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com livre acesso à água e ração, no Biotério de Passagem da Faculdade de Farmácia – UFRGS, com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), controle de claro/escuro de 12 horas e umidade monitorada. Antes da realização dos ensaios os animais foram adaptados ao novo ambiente durante 72 horas.

4.2.2.1.3 Obtenção do Fator Quimiotático: O fator quimiotático foi obtido pela incubação de uma solução de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), na concentração de 65 $\mu\text{g/mL}$, em plasma de ratos, por 30 minutos a 37°C . A presença de antígenos como o LPS no plasma ativa a formação de quimiocinas, desencadeando eventos envolvidos no processo inflamatório responsáveis pela atração dos leucócitos até o local da lesão. Após a incubação, o plasma foi diluído (v/v) em solução tampão de Hanks a 4%.

4.2.2.1.4 Coleta e Preparo de Suspensões de Leucócitos: Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos quatro horas após a injeção de 20 mL de uma solução de glicogênio a 1% em salina. Para a coleta das células, os animais foram sacrificados por exposição ao éter etílico, injetando-se, a seguir, na cavidade peritoneal 60 mL de solução de Hanks contendo 1UI/mL de heparina. As células obtidas foram lavadas com solução de Hanks, promovendo-se, subsequentemente, a lise de hemácias com choque hipotônico. Realizou-se duas novas lavagens em solução de Hanks. E as células foram diluídas até uma contagem de $1,5 \times 10^6$ células em câmara de Neubauer. O extrato seco de trevo-vermelho foi dissolvido na solução de neutrófilos (em concentrações finais de 100,0, 50,0, 25,0, 10,0, 5,0 $\mu\text{g/mL}$), as soluções obtidas ficaram sob agitação em banho-maria (37°C) durante 30 minutos, bem como as células controle, ou seja, aquelas em que não foi

adicionada qualquer substância. Por fim, 0,5 mL destas soluções foram adicionadas aos compartimentos superiores da câmara.

4.2.2.1.5 Determinação da Atividade Migratória de Leucócitos: As câmaras foram preparadas em duplicata e incubadas a 37 °C durante 1 hora em atmosfera úmida. Os filtros foram, a seguir, removidos, fixados, corados, diafanizados por 12 horas em xilol e montados entre lâmina e lamínula. A leitura dos filtros foi realizada sob microscopia ótica, utilizando-se ampliação de 40 vezes. Com o foco no plano superior do filtro aprofundou-se o plano de observação microscópico até que apenas duas células fossem visíveis em foco. A distância, medida em micrômetros, entre o plano superior do filtro e o dessas duas células em foco, permitiu avaliar a capacidade migratória dos neutrófilos (ZIGMOND e HIRSH, 1973). A leitura foi realizada em cinco campos de cada filtro e o resultado expresso como a média.

4.2.2.1.6 Análise estatística: Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm) e analisados estatisticamente por ANOVA seguida pelo teste “t” de *Student* (SNEDECOR e COCHRAN, 1974).

4.2.2.1.7 Soluções Utilizadas:

Solução salina de Hanks

Solução estoque	
NaCl40 g
KCl2,0 g
Na ₂ HPO ₄0,5 g
KH ₂ PO ₄0,5 g
Água q.s.p.500 mL

Solução Tris 1M (hidróxi-aminoetano)

Tris121 g
Água1000 mL
Acerta-se o pH a 7,3 com HCl	

Solução de CaCl₂ (1,1 M)

CaCl ₂12 g
Água100 mL

Solução de MgSO₄. 7H₂O

MgSO ₄ . 7H ₂ O9,9 g
Água100 mL

No Momento da utilização

Solução estoque100 mL
Solução Tris 1M2,75 mL
Solução de CaCl ₂170 µL
Solução de MgSO ₄200 µL
Água q.s.p.1000 mL

Acerta-se o pH em 7,35 com HCl 0,1N e adiciona-se 200 mg de dextrose

Reagentes utilizados na coloração dos filtros (por ordem de uso)

a) Etanol absoluto5 minutos
b) Água2 minutos
c) Solução de hematoxilina45-60 segundos
d) Água2 minutos
e) Solução de <i>Tap-Water</i> *10 minutos
f) Etanol (70%)10 minutos
g) Etanol (95%)10 minutos
h) Butanol + etanol (4:1, v/v)10 minutos
i) XilolPor no mínimo 12 horas

*Solução de *Tap-Water*: sobrenadante de uma solução saturada de carbonato de lítio a 1 % em água.

4.2.2.2 Atividade anti-inflamatória *in vivo*

A reação inflamatória desenvolvida em edema de pata de rato, com adição prévia de agente flogístico pode ser transformada em teste quantitativo pela medida do diâmetro da pata ou pela medida do volume da pata através de pletismômetro. Os resultados de redução do edema são calculados em relação ao aumento percentual do volume das patas traseiras dos animais controle e tratados, antes e após a injeção do agente flogístico (SUYENAGA, 2002).

A atividade antiedematogênica foi avaliada de acordo com método descrito por WINTER *et al.* (1962), no qual utilizou-se para a indução do edema uma injeção de carragenina na pata dos ratos. Foram analisados dois grupos – controle e tratado, sendo que o grupo controle foi subdividido em controle positivo e negativo. O primeiro recebeu indometacina na dose de 10 mg/kg de peso corporal via oral e o segundo, solução salina via oral. Nos animais tratados, o extrato seco obtido das folhas de *Trifolium pratense*, foi ressuscitado em água, foi administrado via oral, por sonda de gavagem, nas doses de 100 e 50 mg/kg. Depois de anestesiados, utilizando pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg de peso corporal (após 1 hora

dos tratamentos), foi induzido o edema, através da injeção de 0,1 mL de uma suspensão de carragenina em solução salina (5 mg/mL) na aponervose subplantar da pata traseira esquerda dos ratos. As patas traseiras direitas receberam 0,1 mL de solução salina e serviram como controle. O volume das patas foi medido em triplicata, nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do agente flogístico, utilizando pletismômetro Ugo Basile modelo 7140 (SUYENAGA, 2002).

4.2.2.2.1 Material biológico: O plasma utilizado foi coletado de ratos Wistar, machos, adultos, sadios, com peso entre 180-220 g, que foram provindos do Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com livre acesso à água e ração, no Biotério de Passagem da Faculdade de Farmácia – UFRGS, com temperatura controlada (23 ± 2 °C), controle de claro/escuro de 12 horas e umidade monitorada. Antes da realização dos ensaios os animais foram adaptados ao novo ambiente durante 72 horas.

4.2.2.2.2 Cálculo do tamanho da amostra: o tamanho da amostra foi calculado como 8 animais por grupo (foi utilizado 7 grupos, 2 controles e 5 tratamentos com doses diferentes de extrato de folhas de trevo-vermelho (50 e 100 mg/kg, escolhidas aleatoriamente) utilizando-se o programa estatístico Sigma Stat® (Jandel Scientific) considerando-se os parâmetros determinados para indometacina 10 mg/kg (diferença mínima esperada igual a 8,2%; desvio padrão de 3,1%) publicados por SCHAPOVAL *et al.* (1994). Foram considerados um poder de 0,9 e o nível de significância 0,01.

4.2.2.2.3 Método de morte e descarte do material biológico: após a realização dos experimentos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Estes animais foram envoltos em sacos plásticos e armazenados em freezer, especialmente destinado para este fim, até serem coletados pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Porto Alegre.

4.2.2.3 Detecção de inibidores da acetilcolinesterase

O método enzimático autobiográfico desenvolvido por MARSTON *et al.*, 2002, é simples e rápido. Este ensaio é realizado em placas de cromatografia, e serve de

ensaio preliminar da inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase por extratos de plantas. A atividade da enzima é detectada por uma conversão do naftil acetato à naftol e a formação da coloração púrpura com o *Fast Blue B Salt*. Inibidores das colinesterases produzem manchas brancas no fundo colorido da placa cromatográfica.

4.2.2.3.1 Método: Dissolveu-se a acetilcolinesterase (1000 U) em 150 mL de tampão Tris-ácido clorídrico 0,05M a pH 7,8. Após, foi adicionada albumina de soro bovino (150 mg) à solução para estabilizar a enzima durante o bioensaio. A solução de estoque foi mantida a 4 °C. Foi depositada (aplicada) uma solução metanólica de extrato seco de trevo-vermelho sobre a placa de camada delgada (CCD) nas concentrações de 1000,0; 100,0; 50,0; 25,0; 10,0; 5,0; 1,0 µg/mL; também foram aplicadas amostras de padrões (100,0 µg/mL) de daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A. Utilizou-se galantamina como controle no experimento. Após, as placas foram imediatamente secas para completa remoção do solvente. As placas para cromatografia em CCD foram eluídas (fase móvel: tolueno:acetato de etila:metanol, 45:45:10, v/v/v), e secas imediatamente antes de seu uso. Também foram aplicadas as amostras por deposição direta na placa cromatográfica; a placa foi seca para a completa remoção do solvente. A placa foi, então, nebulizada com a solução estoque e imediatamente seca novamente. Para incubação da enzima, a placa foi deixada sobre uma tampa sobre um tanque, contendo um pouco de água. Desta forma, a água não esteve diretamente em contato com a placa, mas a atmosfera permanece úmida. A tampa foi colocada no tanque e incubada a 37 °C durante 20 minutos. A enzima apresenta uma estabilidade satisfatória nestas condições. Para detecção da enzima, uma solução de 1-naftil acetato (250 mg) em etanol (100 mL) e de *Fast Blue B salt* (400 mg) em água destilada (160 mL) foram preparadas imediatamente antes do uso (a fim de prevenir decomposição). Após incubação da placa de CCD, 10 mL da solução de naftil acetato e 40 mL da solução de *Fast Blue B salt* foram misturadas e, em seguida, nebulizadas na placa, ocorrendo o desenvolvimento de coloração púrpura após 1-2 minutos (MARSTON *et al.*, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo das amostras de trevo-vermelho

O método de preparo das amostras foi inicialmente desenvolvido para se realizar a análise de 39 plantas (acessos 1 ao 39, **Tabela 1**), Método 1. Com o aumento do número de plantas a serem analisadas neste trabalho, o modo de preparo teve que ser alterado com a finalidade de se prevenir maiores danos que a injeção sucessiva de amostras contendo elevado teor de HCl poderia causar ao sistema cromatográfico. O Método 1 sofreu, então, um aperfeiçoamento em que acrescentou-se uma etapa de extração com solvente orgânico (diclorometano), logo após a hidrólise, para se retirar o ácido (Método 2). Com o método aperfeiçoado realizamos o preparo de todas as demais amostras deste trabalho.

Como parte dos acessos da coleção nuclear de trevo-vermelho (acessos 1 ao 39, **Tabela 1**), já havido sido preparado pelo Método 1, e as demais plantas da coleção foram preparadas pelo Método 2, foi realizado um teste comparativo entre os dois métodos para se verificar a possibilidade de todos os acessos da coleção serem analisados estatisticamente em conjunto.

Para se realizar o comparativo dos métodos, preparou-se, a partir de uma mesma amostra de trevo-vermelho, amostras em triplicatas de cada um dos métodos, e após os resultados (média de cada método) foram comparados e verificou-se que o desvio padrão entre os métodos estava dentro do aceitável neste trabalho (15%) (**Tabela 4**). Sendo assim, os 78 acessos da coleção nuclear de trevo-vermelho foram analisados estatisticamente juntos.

Tabela 4: Análise comparativa dos métodos de preparo das amostras de trevo-vermelho.

Isoflavonas	Método 1 (mg/g de Planta seca)	Método 2 (mg/g de Planta seca)	Desvio Padrão entre os Métodos (%)
Daidzeína	0,05	0,06	13,52
Genisteína	0,12	0,16	14,10
Formononetina	12,69	13,54	3,22
Biochanina A	3,95	3,82	1,73
Total de Isoflavonas	16,80	17,58	2,28

5.2 Validação do método de análise por CLAE

5.2.1 Linearidade

O valor do coeficiente de regressão bem como a equação da reta e o gráfico de linearidade para cada uma das isoflavonas de interesse neste estudo estão apresentados nas **Figuras 5, 6, 7 e 8**.

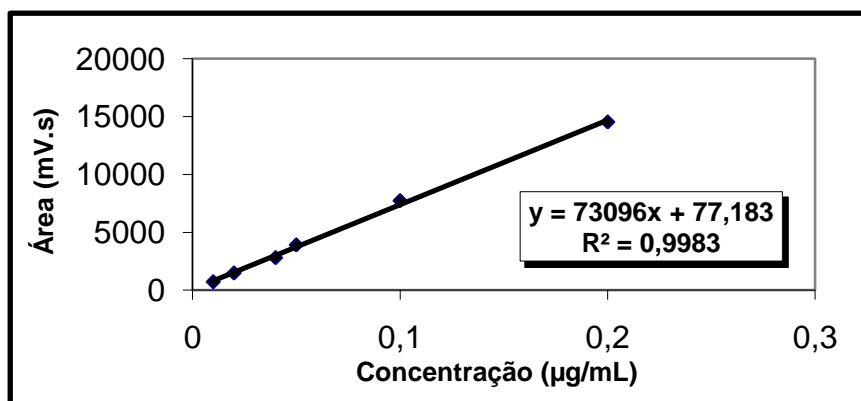


Figura 5: Representação gráfica da reta apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão para daidzeína.

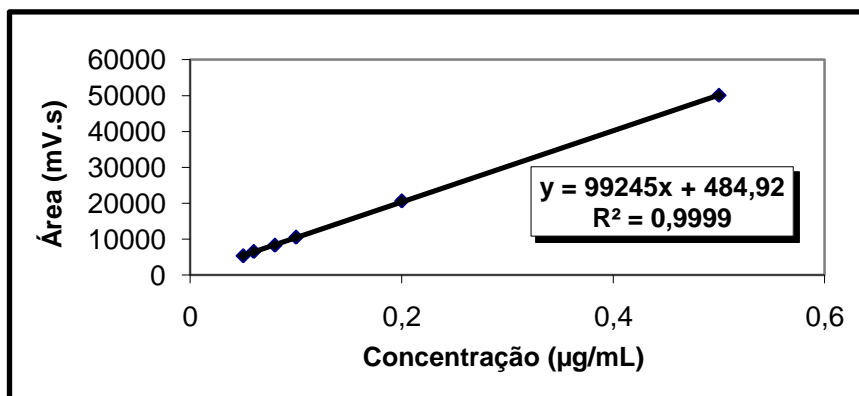


Figura 6: Representação gráfica da reta apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão para genisteína.

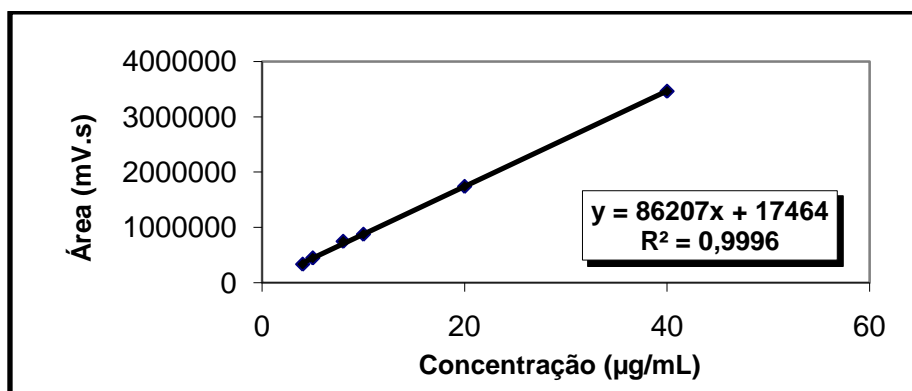


Figura 7: Representação gráfica da reta apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão para formononetina.

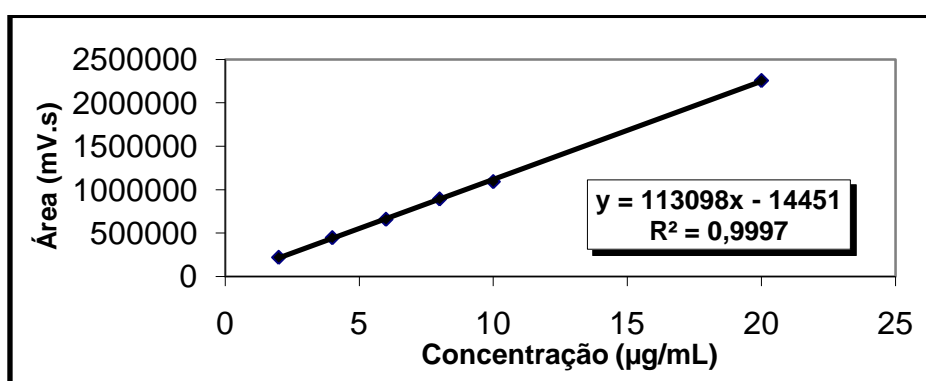


Figura 8: Representação gráfica da reta apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão para biochanina A.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados do estudo de linearidade estão apresentados nas **Tabelas 5, 6, 7 e 8**.

Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da daidzeína.

	GI	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	13464481651	13464481651	2396,8955*	$1,04147 \times 10^{-06}$
Resíduo	4	22469869	5617467		
Total	5	13486951520			

* Significativo $p < 0,05$; GI= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados das médias; MQ= média quadrada da soma dos quadrados.

Tabela 6: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da genisteína.

	GI	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1469071372	1469071372	42647,87*	$3,30 \times 10^{-09}$
Resíduo	4	137786	34447		
Total	5	1469209158			

* Significativo $p < 0,05$; GI= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados das médias; MQ= média quadrada da soma dos quadrados.

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da formononetina.

	GI	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	6874645340369	6874645340369	27496,54*	$7,93 \times 10^{-09}$
Resíduo	4	1000074397	250018599		
Total	5	6875645414766			

* Significativo $p < 0,05$; GI= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados das médias; MQ= média quadrada da soma dos quadrados.

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da biochanina A.

	GI	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2600879956920	2600879956920	12191,75*	$4,03443 \times 10^{-08}$
Resíduo	4	853324632	213331158		
Total	5	2601733281551			

* Significativo $p < 0,05$; GI= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados das médias; MQ= média quadrada da soma dos quadrados.

A partir dos dados obtidos com a análise de variância constata-se que as isoflavonas apresentam diferenças significativas entre as diluições, em suas respectivas curvas padrão, regressão linear ($p < 0,05$) e desvio de linearidade não significativos.

5.2.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada com a determinação dos parâmetros repetibilidade e precisão intermediária da solução extrativa. O desvio padrão foi determinado e analisado através da medida das áreas das isoflavonas de interesse para este estudo presentes na amostra, de um total de 9 injeções e está apresentado na **Tabela 9**.

Tabela 9: Resultados da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária da solução amostra de *Trifolium pratense* por CLAE.

Isoflavonas	Repetibilidade; média* \pm DPR%	Precisão intermediária; média* \pm DPR%
Daidzeína	2715 \pm 0,84	2645 \pm 4,99
Genisteína	23879 \pm 2,54	24520 \pm 7,22
Formononetina	510458 \pm 2,44	517277 \pm 5,23
Biochanina A	1180999 \pm 7,28	1199143 \pm 6,02

* os valores médios ($n=9$) correspondem a área de marcador em mV.s.

Para validação de método com matéria-prima vegetal, mesmo para fitoterápicos, não existem limites máximos estabelecidos para precisão. Entretanto, como trata-se de matrizes complexas, os valores de coeficientes de correlação podem ser maiores que os estabelecidos para medicamentos ($\leq 5\%$) (BRASIL, 2003). Para este trabalho, estabeleceu-se como coeficiente de variação 15%. Sendo assim, analisando-se os resultados obtidos observa-se que os valores de DPR

obtidos indicam uma boa precisão do método de análise estabelecido para quantificação de daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A para amostras de *Trifolium pratense*.

5.2.3 Exatidão

Os resultados obtidos após realização dos testes de exatidão foram submetidos à **Equação 1** que expressa o percentual de recuperação das isoflavonas de interesse (daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A) adicionadas às soluções de referência (SR).

Equação 1: Cálculo utilizado para determinação do percentual de recuperação das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A.

$$R\% = [(C_F - C_A) / C_P] \times 100$$

Onde: C_F = concentração do extrato adicionado de substância de referência (mg/mL);
 C_A = concentração do extrato determinado neste método (mg/mL);
 C_P = concentração da solução padrão adicionada (mg/mL).

O método por CLAE mostrou-se exato quanto ao teor de daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, exibindo valores médios de recuperação de 85,6%, 100,0%, 101,0% e 97,7%, respectivamente, para análise realizada com *Trifolium pratense* (**Tabela 10**).

5.2.4 Especificidade

A especificidade do método foi comprovada pela análise da pureza do pico verificada nos cromatogramas obtidos, utilizando cromatógrafo com detector de arranjo de fotodiodos.

Tabela 10: Resultados da análise de exatidão em CLAE para a amostra de *Trifolium pratense*.

Isoflavona	Amostra *	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
		Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)		
Daidzeína	SR 1	0,16	0,14	87,5	85,6
	SR 2	0,21	0,18	85,7	
	SR 3	0,25	0,21	84,0	
Genisteína	SR 1	0,15	0,15	100,0	100,0
	SR 2	0,23	0,23	100,0	
	SR 3	0,40	0,40	100,0	
Formononetina	SR 1	6,21	6,37	102,6	101,0
	SR 2	15,53	15,88	102,3	
	SR 3	31,07	30,50	98,2	
Biochanina A	SR 1	3,34	3,18	95,2	97,7
	SR 2	7,79	7,56	97,0	
	SR 3	13,36	13,46	100,8	

* n= 3

O cromatograma da amostra para a análise da especificidade é apresentado nas **Figuras 9, 10, 11 e 12** com os respectivos espectros de UV das isoflavonas de interesse (daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A).

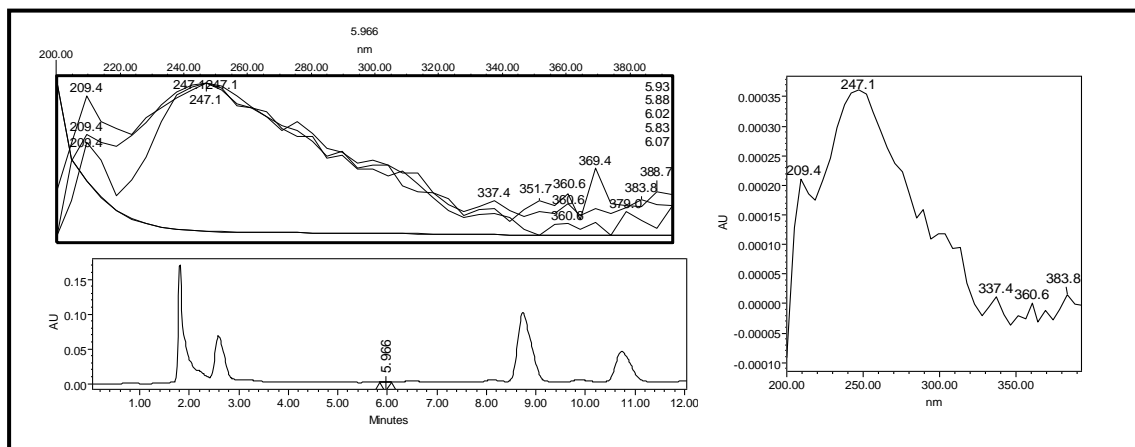


Figura 9: Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação à isoflavona daidzeína.

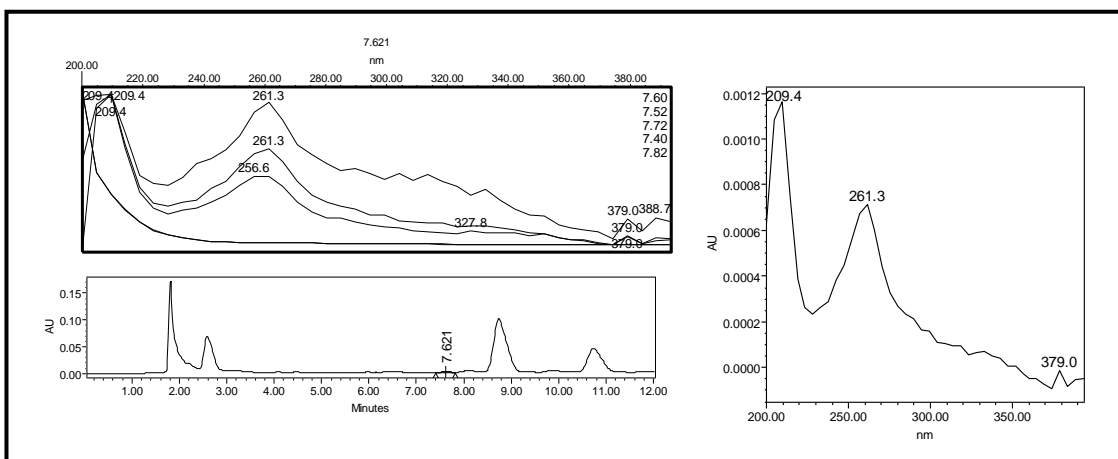


Figura 10: Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação à isoflavona genisteína.

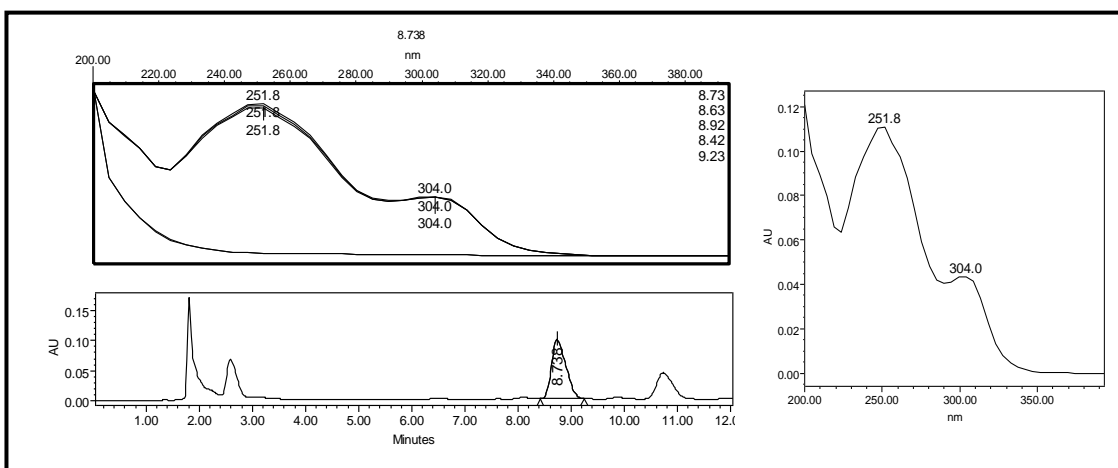


Figura 11: Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação à isoflavona formononetina.

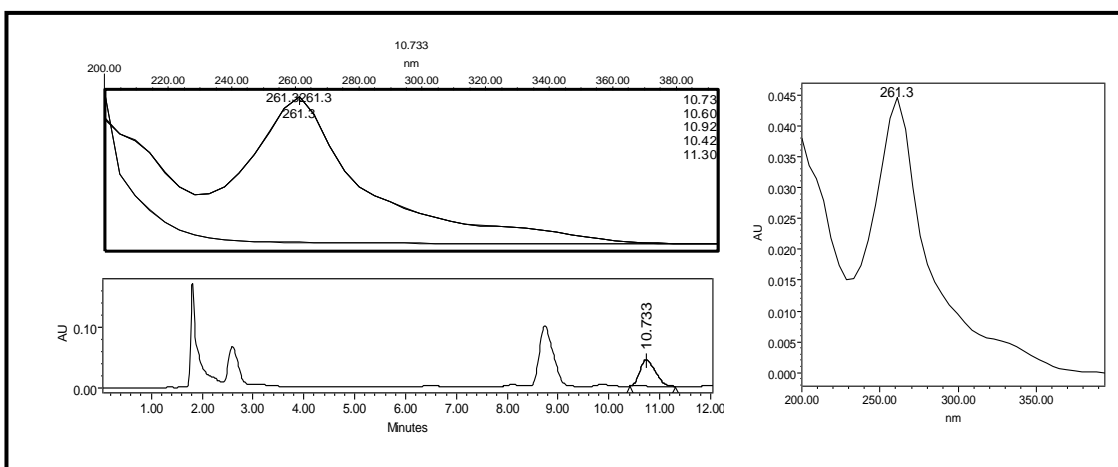


Figura 12: Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação à isoflavona biochanina A.

Avaliando-se os picos referentes às isoflavonas de interesse neste estudo nos cromatogramas da especificidade, pode-se considerar o método proposto específico, pois em todas as faixas analisadas os picos das isoflavonas não apresentaram variação nos seus máximos de absorvância e ausência de impurezas em diferentes regiões como indica a análise empregando-se CLAE/PDA.

5.2.5 Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para as substâncias utilizadas como referência, foram calculados pela relação sinal-ruído. Os resultados obtidos foram: para daidzeína LD = 0,0015 µg/mL e LQ = 0,005 µg/mL; para genisteína LD = 0,0164 µg/mL e LQ = 0,0547 µg/mL; para formononetina LD = 0,0183 µg/mL e LQ = 0,0609 µg/mL; e para biochanina A LD = 0,0117 µg/mL e LQ = 0,0389 µg/mL. Estes valores baixos de LD e LQ demonstraram a boa sensibilidade do método analítico desenvolvido.

5.2.6 Robustez

Os resultados dos testes de robustez do método cromatográfico constam na **Tabela 11**.

Em relação ao teste de robustez, as mudanças estabelecidas não alteraram significativamente o cromatograma, observando-se apenas ligeira alteração no tempo de retenção de cada uma das isoflavonas de interesse, quando comparado ao método estabelecido. Desta maneira, é possível afirmar que o método desenvolvido é capaz de suportar as mudanças estabelecidas.

O método desenvolvido mostrou características de performance apropriadas, sendo adequadas para a análise das isoflavonas, daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em amostras de *Trifolium pratense*. Com o método validado, torna-se possível garantir a confiabilidade nos resultados.

A validação do método de preparo da amostra (Método 1) e análise por CLAE foram publicados na revista *Chromatographia* (ano 2008; volume 6; páginas 125 – 129). O artigo encontra-se em anexo (**Anexo 2**).

Tabela 11: Avaliação do parâmetro robustez para a solução amostra de *Trifolium pratense* por CLAE.

Parâmetro	Isoflavona	Tempo de Retenção (min.)
Condições normais	Daidzeína	5,966
	Genisteína	7,621
	Formononetina	8,738
	Biochanina A	
Alteração da Fase Móvel A	Daidzeína	6,082
	Genisteína	7,711
	Formononetina	8,817
	Biochanina A	10,774
Aumento do fluxo	Daidzeína	5,302
	Genisteína	6,878
	Formononetina	7,960
	Biochanina A	9,909
Redução do fluxo	Daidzeína	6,573
	Genisteína	8,275
	Formononetina	9,416
	Biochanina A	11,419
Mudança de coluna	Daidzeína	6,675
	Genisteína	8,481
	Formononetina	9,652
	Biochanina A	11,772

Na **Figura 13** é apresentado um cromatograma dos padrões das isoflavonas, e na **Figura 14** um cromatograma de uma amostra de *Trifolium pratense*.

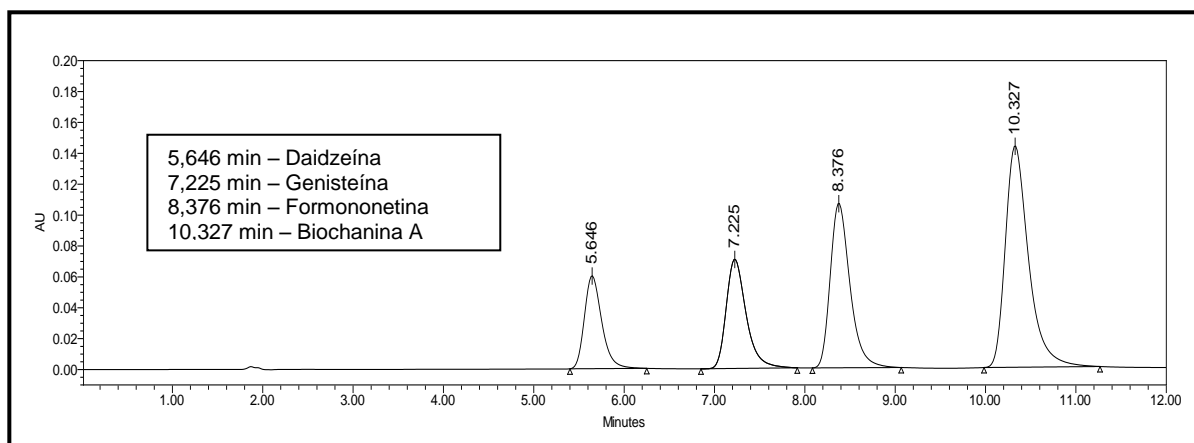


Figura 13: Cromatograma de uma solução dos padrões das isoflavonas daidzeína (10,92 µg/mL), genisteína (10,91 µg/mL), formononetina (18,54 µg/mL) e biochanina A (22,72 µg/mL).

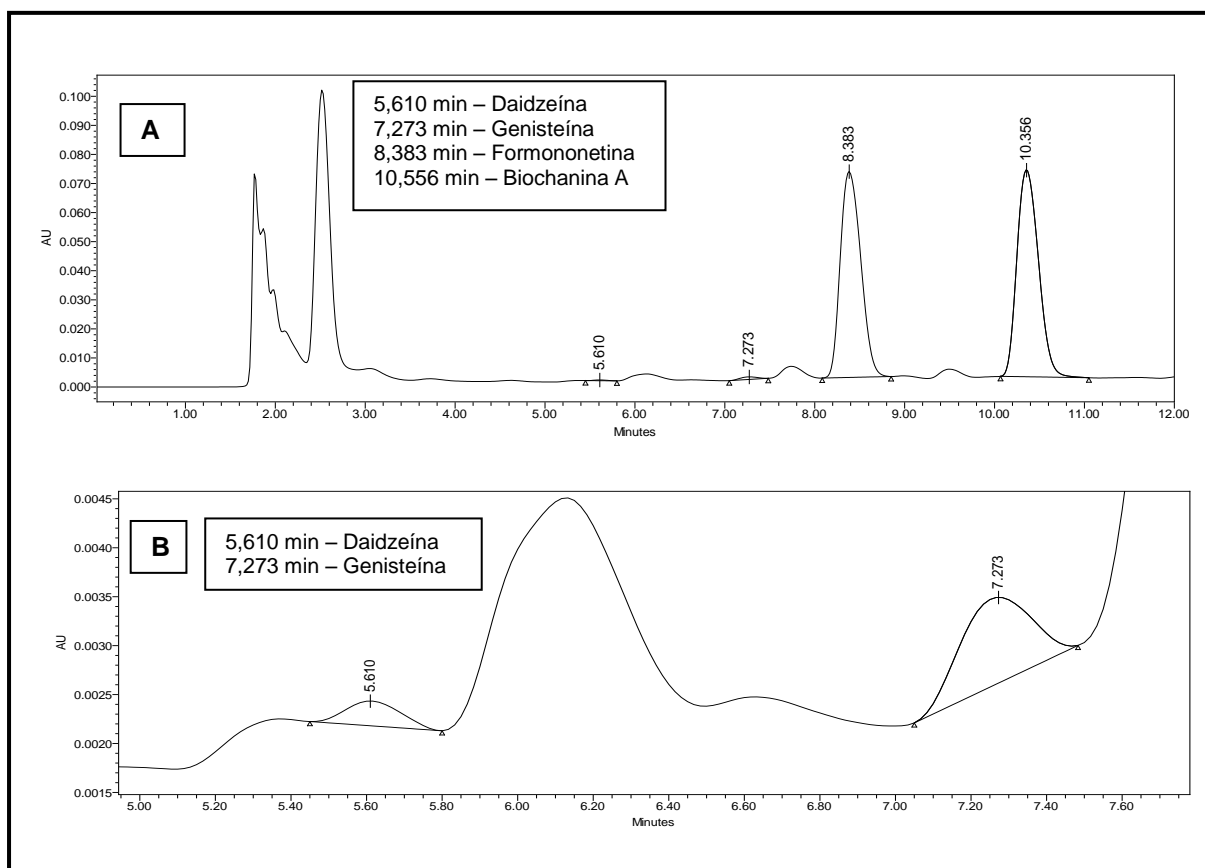


Figura 14: Cromatograma de uma amostra de *Trifolium pratense*, demonstrando os picos das isoflavonas de interesse para este trabalho. Em **A**: daidzeína (33,08 $\mu\text{g/g}$ de planta seca), genisteína (104,06 $\mu\text{g/g}$ de planta seca), formononetina (12632,00 $\mu\text{g/g}$ de planta seca) e biochanina A (10337,33 $\mu\text{g/g}$ de planta seca); **B**: Demonstra uma aproximação dos picos cromatográficos da daidzeína (5,610 minutos) e genisteína (7,273 minutos).

5.3 Análise dos acessos da coleção nuclear de trevo-vermelho

Setenta e sete acessos da coleção nuclear de trevo-vermelho do NPGS-USDA e uma população cultivada no Brasil (**Tabela 1**) foram analisados. A maioria das isoflavonas do trevo-vermelho é encontradas na forma de malonatos e glicosídeos com uma pequena porcentagem da forma aglicona (EDWARDS *et al.*, 1997; TOEBES *et al.*, 2005; SIVESIND e SEGUIN, 2005). Entretanto, a quantificação das isoflavonas no presente trabalho representa o total da concentração de isoflavonas, incluindo as formas malonil, glicosídeos e agliconas; pois como as amostras foram hidrolisadas, todas as formas conjugadas ficaram na forma de agliconas. A concentração das agliconas de cada isoflavona (**Tabela 12**) variou de 0,00 a 137,91 $\mu\text{g/g}$ de planta seca (PS) para daidzeína, 14,70 a 516,91 $\mu\text{g/g}$ de PS para genisteína, 452,97 a 28 548,65 $\mu\text{g/g}$ de PS para formononetina e 2 199,02 a 15

670,39 µg/g de PS para biochanina A. O total da concentração de isoflavonas (que é a soma da concentração de daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A) variou de 9,81 e 36,36 mg/g de PS.

A faixa de concentração das isoflavonas relatadas neste trabalho esta de acordo com os resultados encontrados por SIVESIND e SEGUIN (2005), que relataram similares concentrações totais de isoflavonas em dez cultivares de trevo-vermelho cultivadas em Quebec (Canadá), variando de 8 923 a 12 753 µg/g de PS. BOOTH *et al.* (2006) também encontraram concentrações totais de isoflavonas similares quando analisaram apenas uma variedade de trevo-vermelho.

A menor concentração total de isoflavonas foi encontrada em uma variedade local da Húngria (N° 14- PI318888) enquanto que a maior concentração total foi encontrada em uma variedade local dos Estados Unidos (N° 35- PI230229) (**Tabela 12**). Um dado interessante observado é que os dois acessos classificados pelo NPGS como tetraplóides (N° 40- PI314840 e N°11- PI266047) não apresentaram diferenças no total de isoflavonas quando comparados aos diplóides. Resultados similares foram encontrados por TSAO *et al.* (2006) quando comparou a concentração total de isoflavonas em cultivares diplóides e tetraplóides.

É importante notar que a concentração individual das isoflavonas e a concentração total de isoflavonas variou consideravelmente entre os acessos usados no trabalho. Esta variabilidade é muito importante, pois através dela pode-se selecionar os acessos com teores mais elevados que podem ser usados pela indústria farmacêutica, e os acessos com teores reduzidos para serem usados como planta forrageira. Esta variação da concentração das isoflavonas pode ser explicada pelo fato destas em leguminosas serem controladas por fatores genéticos e ambientais. As isoflavonas são constitutivas em legumes, mas suas concentrações geralmente aumentam em resposta à estresses bióticos e abióticos (SIVESIND e SEGUIN, 2005).

Tabela 12: Concentração das isoflavonas de 78 acessos da Coleção Nuclear de trevo-vermelho^a.

Acesso	Daidzeína ^b	Genisteína ^b	Formononetina ^b	Biochanina A ^b	Total de Isoflavonas ^c
1	23,72 ± 5,53	202,72 ± 2,53	9 785,96 ± 3,31	2 499,55 ± 4,10	12,43
2	34,67 ± 8,86	14,70 ± 6,41	9 061,74 ± 3,93	3 751,38 ± 5,04	12,85
3	32,54 ± 1,36	30,38 ± 7,47	12 200,17 ± 5,46	3 591,37 ± 7,59	15,84
4	41,46 ± 7,78	155,03 ± 1,99	12 598,38 ± 0,77	7 539,74 ± 0,44	20,27
5	22,02 ± 3,72	231,87 ± 4,66	7 176,57 ± 3,74	9 135,45 ± 3,82	16,48
6	28,76 ± 8,86	188,90 ± 4,26	10 970,80 ± 6,58	4 691,05 ± 6,65	15,81
7	70,39 ± 1,39	102,10 ± 4,00	15 621,64 ± 0,98	8 804,96 ± 1,30	24,56
8	10,55 ± 3,25	120,72 ± 6,20	6 568,33 ± 2,59	3 806,78 ± 3,34	10,46
9	29,75 ± 3,09	148,63 ± 1,02	8 018,49 ± 1,22	8 710,42 ± 1,23	16,85
10	28,63 ± 9,92	182,51 ± 6,04	10 163,32 ± 1,47	9 505,79 ± 0,88	19,81
11	32,36 ± 5,87	177,60 ± 3,57	14 076,68 ± 2,44	6 838,78 ± 0,26	21,05
12	12,21 ± 7,97	92,05 ± 2,64	6 479,65 ± 3,57	3 466,56 ± 5,18	10,01
13	26,24 ± 6,75	76,46 ± 7,45	7 907,60 ± 3,81	8 129,54 ± 2,05	16,11
14	9,75 ± 4,93	52,12 ± 7,84	5 595,14 ± 0,66	4 178,28 ± 7,03	9,81
15	35,72 ± 12,40	132,30 ± 0,92	11 410,87 ± 4,22	4 869,87 ± 4,36	16,40
16	0,00	153,73 ± 6,21	578,22 ± 7,17	10 813,49 ± 6,29	11,49
17	0,00	231,23 ± 3,79	5 243,77 ± 10,71	7 755,45 ± 3,74	13,15
18	0,00	335,97 ± 3,02	9 368,94 ± 3,96	11 432,91 ± 3,61	21,02
19	29,92 ± 5,79	79,67 ± 11,36	9 234,70 ± 3,75	4 717,85 ± 2,01	14,03
20	29,78 ± 3,30	26,46 ± 8,38	9 460,43 ± 4,02	4 004,19 ± 5,54	13,50
21	34,59 ± 6,18	201,14 ± 6,45	13 867,67 ± 3,39	9 923,49 ± 5,04	23,95
22	5,71 ± 3,52	118,19 ± 9,84	8 724,34 ± 4,88	3 725,11 ± 8,74	12,53
23	23,97 ± 8,63	61,39 ± 8,49	9 781,59 ± 5,81	4 109,10 ± 5,14	13,95
24	56,02 ± 3,62	247,26 ± 4,90	8 970,84 ± 0,83	6 073,66 ± 5,47	15,25
25	25,36 ± 6,71	71,47 ± 6,09	9 805,80 ± 1,66	4 330,47 ± 3,95	14,20
26	97,49 ± 3,04	60,44 ± 3,29	452,97 ± 1,43	15 670,39 ± 1,41	16,24
27	28,63 ± 8,06	116,95 ± 2,24	8 451,93 ± 0,76	5 340,85 ± 0,01	13,89
28	50,90 ± 0,90	194,41 ± 1,79	14 916,18 ± 3,83	5 977,54 ± 1,86	21,06
29	95,64 ± 3,16	349,08 ± 5,31	25 026,62 ± 5,91	9 272,23 ± 7,59	34,60
30	90,58 ± 8,26	197,64 ± 7,81	16 160,09 ± 8,86	11 478,19 ± 8,25	27,83
31	30,97 ± 4,96	516,91 ± 5,98	14 167,54 ± 2,07	12 591,14 ± 3,65	27,12
32	44,33 ± 0,79	160,66 ± 5,55	12 632,00 ± 5,34	10 337,33 ± 6,17	23,11
33	27,23 ± 4,96	318,77 ± 6,11	9 268,17 ± 2,84	2 199,02 ± 3,61	11,69
34	122,37 ± 0,14	121,52 ± 5,36	23 461,82 ± 5,37	9 950,20 ± 1,76	33,58
35	137,91 ± 7,96	113,60 ± 6,57	28 548,65 ± 3,04	7 612,77 ± 2,98	36,36
36	28,68 ± 2,54	429,83 ± 2,34	11 672,11 ± 2,16	14 908,10 ± 0,15	26,88
37	72,06 ± 9,20	264,69 ± 3,36	18 023,39 ± 2,14	11 247,64 ± 2,75	29,50
38	57,10 ± 8,48	117,45 ± 7,77	18 338,64 ± 7,15	9 417,67 ± 8,05	27,87
39	49,29 ± 2,29	214,00 ± 6,96	16 376,52 ± 3,04	11 144,73 ± 4,28	27,70
40	5,31 ± 5,96	124,72 ± 5,71	13126,22 ± 1,78	3708,69 ± 1,14	16,96
41	6,73 ± 3,67	315,21 ± 5,43	13726,68 ± 8,84	5045,36 ± 7,11	19,09
42	32,01 ± 9,90	160,31 ± 5,89	10713,98 ± 4,88	2948,10 ± 9,05	13,85
43	3,19 ± 14,10	516,80 ± 8,80	19234,79 ± 11,05	4974,13 ± 9,28	24,73
44	4,03 ± 14,24	286,93 ± 4,21	18602,98 ± 7,58	5020,09 ± 6,04	23,91
45	6,11 ± 4,11	239,24 ± 8,33	11325,43 ± 2,10	5610,23 ± 11,71	17,18
46	10,07 ± 7,69	327,15 ± 1,00	8345,16 ± 9,14	9344,65 ± 7,27	18,03
47	25,55 ± 3,82	160,51 ± 3,12	16181,23 ± 1,31	5446,30 ± 2,71	21,81
48	11,42 ± 9,68	156,20 ± 13,17	9838,78 ± 14,46	1967,64 ± 8,23	11,97
49	22,40 ± 3,23	153,65 ± 3,65	11778,49 ± 13,35	3180,85 ± 4,67	15,14

^a Os resultados representam a média da concentração das isoflavonas por acesso analisado em triplicata ± Desvio Padrão (%)

^b Concentração em µg/g de PS

^c Concentração em mg/g de PS

Continuação da Tabela 12: Concentração das isoflavonas de 78 acessos da Coleção Nuclear de trevo-vermelho^a.

Acesso	Daidzeína ^b	Genisteína ^b	Formononetina ^b	Biochanina A ^b	Total de Isoflavonas ^c
50	29,04 ± 10,98	380,90 ± 9,78	12836,81 ± 3,86	4487,31 ± 5,20	17,73
51	21,31 ± 2,61	347,44 ± 10,32	12348,43 ± 3,37	7608,48 ± 3,93	20,33
52	9,44 ± 11,47	195,38 ± 1,12	10774,09 ± 9,45	2796,69 ± 10,52	13,78
53	14,33 ± 7,20	161,14 ± 11,15	10292,76 ± 5,68	4633,65 ± 5,40	15,10
54	54,74 ± 10,67	108,65 ± 13,15	10198,99 ± 8,84	3988,89 ± 8,55	14,35
55	11,72 ± 13,32	179,57 ± 1,76	12948,83 ± 1,08	5515,34 ± 3,16	18,66
56	0,55 ± 14,66	329,70 ± 2,07	2705,39 ± 12,35	20145,27 ± 9,37	23,18
57	28,21 ± 12,78	312,28 ± 10,38	6466,00 ± 10,11	5200,73 ± 12,50	12,01
58	8,15 ± 6,10	164,62 ± 0,38	9682,74 ± 11,97	4751,97 ± 11,75	14,61
59	54,52 ± 10,64	261,88 ± 6,53	14894,87 ± 7,94	7778,15 ± 8,60	22,99
60	53,26 ± 9,07	298,56 ± 3,16	8172,88 ± 4,01	4214,03 ± 5,22	12,74
61	24,18 ± 1,35	190,98 ± 6,10	16674,89 ± 1,29	6584,11 ± 3,62	23,47
62	46,10 ± 2,83	305,74 ± 1,97	10991,52 ± 0,85	11478,19 ± 8,25	22,82
63	6,09 ± 5,83	166,61 ± 2,72	12849,86 ± 4,63	4382,20 ± 6,72	17,40
64	20,84 ± 3,77	124,24 ± 6,35	9080,60 ± 3,95	6596,83 ± 3,55	15,82
65	13,37 ± 13,15	136,49 ± 3,57	8946,91 ± 8,27	3484,12 ± 12,96	12,58
66	40,74 ± 12,32	119,71 ± 0,25	8727,61 ± 12,28	3562,58 ± 12,25	12,45
67	73,84 ± 10,09	406,60 ± 14,59	9429,42 ± 11,14	3501,50 ± 10,89	13,41
68	19,63 ± 1,37	186,01 ± 10,17	8242,93 ± 5,70	5097,21 ± 9,15	13,55
69	47,43 ± 14,40	192,41 ± 9,14	8857,70 ± 10,11	5019,37 ± 5,45	14,12
70	35,91 ± 13,07	339,56 ± 2,69	7969,84 ± 5,04	8421,07 ± 8,87	16,77
71	23,99 ± 10,91	143,87 ± 13,07	9252,61 ± 4,18	5601,70 ± 3,47	15,02
72	40,25 ± 1,19	87,03 ± 7,70	7539,25 ± 0,26	2781,34 ± 0,79	10,45
73	31,71 ± 11,87	151,53 ± 4,94	12465,50 ± 1,15	4518,29 ± 2,32	17,17
74	16,43 ± 14,03	70,47 ± 9,20	15956,81 ± 11,18	7039,93 ± 14,19	23,08
75	33,00 ± 7,36	292,36 ± 13,15	15302,95 ± 6,99	8504,21 ± 12,01	24,13
76	32,41 ± 11,80	89,27 ± 10,31	9122,64 ± 7,74	4089,31 ± 4,80	13,33
77	41,71 ± 3,74	134,96 ± 11,23	10858,07 ± 3,79	6455,88 ± 2,05	17,49
78	30,66 ± 6,90	100,67 ± 2,60	9243,96 ± 7,53	3319,91 ± 7,94	12,70

^a Os resultados representam a média da concentração das isoflavonas por acesso analisado em triplicata ± Desvio Padrão (%)

^b Concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ de PS

^c Concentração em mg g^{-1} de PS

Análise de variância indica diferença significativa para as quatro isoflavonas entre os 78 acessos (**Tabela 13**). A análise de componentes principais, realizado com a média das quatro isoflavonas para todos acessos, indicou que as duas primeiras dimensões são responsáveis por 99,96% da variação encontrada (**Figura 15**). O gráfico destas duas dimensões visualmente indicam a formação de quatro grupos (**Figura 15**). A **Tabela 14** resume a média da concentração das isoflavonas em cada grupo.

Tabela 13: Análise de variância de 78 acessos de trevo-vermelho. Todas médias foram significativas ($p \leq 0,05$)

Isoflavona	Média	DP	População	Erro	F
Daidzeína	29,21	21,3	1413,47	11,73	120,5
Genisteína	163,69	106,87	33811,84	362,24	93,3
Formononetina	11353,29	4745,3	6660180,1	735872,1	90,5
Biochanina A	6568,8	3434,1	35186422,8	254157,1	138,3

Tabela 14: Média da concentração das quatro isoflavonas e do total de isoflavonas em cada grupo

Grupo	Daidzeína ^a	Genisteína ^a	Formononetina ^a	Biochanina A ^a	Total ^b
I	94,53	126,13	25679,03	8945,07	34,84
II	30,41	197,81	14703,11	8938,33	23,87
III	23,23	149,31	9529,22	4761,46	14,46
IV	24,43	156,14	1245,53	15543,05	16,97

^a Concentração em µg/g de PS

^b Concentração em mg/g de PS

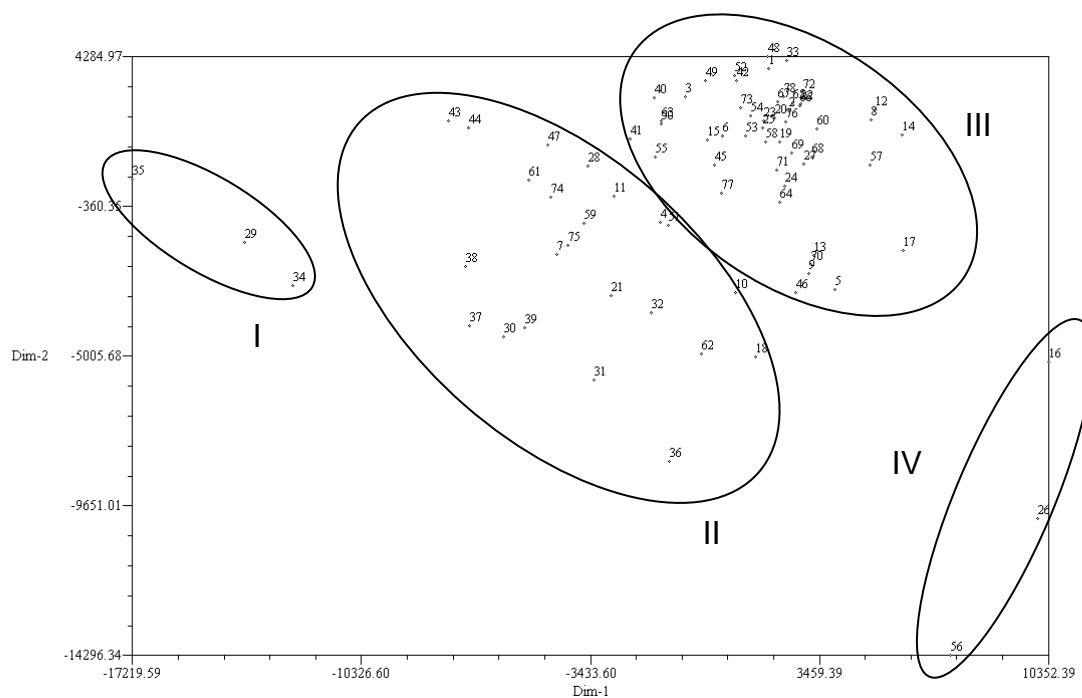


Figura 15: Representação bidimensional da relação bioquímica entre 77 acessos da coleção nuclear de trevo-vermelho e uma população cultivada no Brasil. As primeiras duas dimensões são responsáveis por 99,96% da variação. Os círculos indicam os quatro grupos formados.

O Grupo I foi composto por três acessos que se mostraram com o maior conteúdo de daidzeína e formononetina e apresentaram a menor concentração de genisteína (**Tabela 14**). Este grupo também foi caracterizado por ter a maior concentração total de isoflavonas. É relevante o fato de que estes três acessos são classificados pelo NPGS-USDA como variedades locais (N°34- PI295355 and N°34- PI230229) e como materiais de melhoramento (N°29 - PI419550). Isto poderia ser inesperado, sendo que estes materiais deveriam apresentar teores reduzidos de isoflavonas, uma vez que passaram por programas de melhoramento para uso forrageiro. Todavia, estes programas de melhoramento não levam em conta o teor de isoflavonas.

O Grupo II foi composto por 23 acessos, a maioria deles é cultivar ou material cultivado que mostraram a maior concentração de genisteína, e o segundo com maior concentração total de isoflavonas (**Tabela 14**).

O Grupo III contém o maior número de acessos (49) caracterizados pelo menor conteúdo de daidzeína, biochanina A e total de isoflavonas (**Tabela 14**). Entre estes acessos estão 10 cultivares de floração tardia da Europa, de altas latitudes (N°1, 2, 3, 8, 9, 12, 13, 40, 41, 48), que também foram agrupados como encontrado em recente estudo, quando a coleção nuclear de trevo-vermelho foi analisada usando marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares (DIAS *et al.*, 2008a; DIAS *et al.*, 2008b). TAYLOR e SMITH (1995) descreveram que tipos distintos de plantas de trevo-vermelho foram envolvidas através de seleção natural e na Europa estes tipos estão amplamente distribuídos de acordo com a latitude, com os tipos de floração tardia mais comuns no norte com 60° de latitude e as que florescem mais cedo são predominantes no sul da Europa com 50° de latitude. A maioria dos acessos classificados como selvagens pelo NPGS (N°17, 45, 53, 54, 57, 64, 67, 70) também está presente neste grupo.

Finalmente, o Grupo IV foi composto por três acessos que possuem a concentração mais alta de biochanina A e a menor concentração de formononetina (**Tabela 14**).

Quando comparamos a quantidade total de isoflavonas entre os grupos (**Tabela 14**), não existe nenhuma separação clara relacionada à origem geográfica, tipo de material (cultivar, selvagem, variedade local, etc) ou tempo de floração. Tipos de floração tardia e precoce de trevo-vermelho estão presentes em todos agrupamentos.

A composição de isoflavonas foi similar entre diferentes cultivares de trevo-vermelho. Entretanto, a concentração total de isoflavonas difere significativamente entre as cultivares (SIVESIND e SEGUIN 2005, TSAO *et al.*, 2006). A coleção nuclear de trevo-vermelho é formada principalmente por cultivares e material cultivado. Deste modo, o alto nível de variação na concentração total de isoflavonas entre cultivares pode explicar esta ausência de estruturação relacionada ao tipo de material. Cultivares e material cultivado estão presentes nos Grupos I e III, que representam respectivamente a maior e menor concentração total de isoflavonas (**Tabela 14**).

Uma vez que todos acessos de trevo-vermelho foram plantados em casa de vegetação sob as mesmas condições ambientais, as diferenças entre os acessos na concentração total de isoflavonas poderiam ser explicada por diferenças genéticas. A variação genética tem sido apontada como um papel importante na produção de isoflavonas em trevo-vermelho (SIVESIND e SEGUIN, 2005; TSAO *et al.*, 2006).

PAPADOPOULOS *et al.* (2006) também demonstraram em seu estudo que a concentração total e as isoflavonas individuais no trevo-vermelho possuem uma variabilidade genética entre cultivares, e sugere que a seleção individual de fenótipos com teores altos de formononetina e biochanina A seria altamente efetiva para o desenvolvimento de cultivares. Recomendações específicas de cultivares poderiam, deste modo, serem feitas levando em consideração concentrações a serem maximizadas ou minimizadas dependendo da intenção de uso (SIVESIND e SEGUIN, 2005). Alguns acessos avaliados poderiam ser selecionados por programas de melhoramento vegetal com o objetivo de produzir cultivares para uso forrageiro ou farmacêutico, uma vez que os resultados encontrados aqui destacam os acessos de trevo-vermelho com baixo e alto teor de isoflavonas.

TSAO *et al.* (2006) demonstraram que a concentração e composição das isoflavonas são diferentes em diferentes partes da planta de trevo-vermelho, e o tempo de colheita também pareceu ser importante. A concentração das isoflavonas foi maior após a floração, e as folhas são a parte da planta com maior concentração dessas substâncias.

Os resultados apresentados aqui são importantes para a seleção e melhoramento genético de novas variedades com maiores ou menores teores de isoflavonas.

5.4 Análise Sazonal

Os acessos utilizados, selecionados por critério aleatório, para a avaliação sazonal foram: PI 179146 (número 44), PI 376880 (número 72) e PI 419550 (número 29). Estes acessos foram preparados conforme o item **4.2.1.1** e analisados conforme o item **4.2.1.2**. As **Tabelas 15, 16 e 17** apresentam os resultados das análises das

isoflavonas. Os resultados demonstram que não existem muitas diferenças significativas entre as estações.

Os resultados da avaliação sazonal demonstram que o estágio vegetativo é o melhor período para se coletar plantas de trevo-vermelho, pois neste período a planta possui teores mais elevados de isoflavonas, assim como também não é necessário se esperar até o período de floração das plantas, o que levaria mais tempo de cultivo.

Tabela 15: Concentração das isoflavonas do acesso PI179146 analisado em diferentes estações do ano*.

	Daidzeína**	Genisteína**	Formononetina**	Biochanina A**	Total Isoflavonas**
Verão	0,03 ± 11,6 ^a	0,11 ± 0,71 ^a	8,52 ± 4,74 ^a	6,60 ± 12,64 ^a	15,28 ^a
Outono	0,00 ^b	0,13 ± 2,64 ^a	8,94 ± 11,08 ^a	4,75 ± 10,87 ^b	13,82 ^a
Inverno	0,00 ^b	0,20 ± 6,78 ^b	11,26 ± 7,02 ^b	5,76 ± 6,96 ^a	17,22 ^a
Primavera	0,00 ^b	0,07 ± 12,02 ^a	7,27 ± 5,65 ^a	5,28 ± 8,79 ^a	12,63 ^a

* Os resultados representam a média da concentração das isoflavonas do acesso analisado em triplicata ± Desvio Padrão (%).

** Concentração em mg/g de PS, médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%, resultados analisados por ANOVA e teste de Tukey 5%.

Tabela 16: Concentração das isoflavonas do acesso PI 376880 analisado em diferentes estações do ano*.

	Daidzeína**	Genisteína**	Formononetina**	Biochanina A**	Total Isoflavonas**
Verão	0,02 ± 11,27 ^a	0,09 ± 3,07 ^a	8,85 ± 0,98 ^a	6,11 ± 2,88 ^a	15,07 ^a
Outono	0,00 ^b	0,25 ± 3,65 ^b	9,99 ± 11,24 ^b	4,65 ± 14,62 ^b	14,90 ^a
Inverno	0,00 ^b	0,23 ± 2,63 ^c	13,23 ± 7,36 ^c	2,87 ± 14,13 ^c	16,33 ^a
Primavera	0,00 ^b	0,30 ± 3,40 ^b	6,84 ± 7,76 ^b	3,33 ± 5,23 ^c	10,47 ^b

* Os resultados representam a média da concentração das isoflavonas do acesso analisado em triplicata ± Desvio Padrão (%).

** Concentração em mg/g de PS, médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%, resultados analisados por ANOVA e teste de Tukey 5%.

Tabela 17: Concentração das isoflavonas do acesso PI 419550 analisado em diferentes estações do ano*.

	Daidzeína**	Genisteína**	Formononetina**	Biochanina A**	Total Isoflavonas**
Verão	0,00 ^a	0,13 ± 5,24 ^a	10,81 ± 9,24 ^a	3,76 ± 8,04 ^a	14,69 ^a
Outono	0,00 ^a	0,16 ± 7,31 ^b	9,86 ± 4,64 ^a	2,52 ± 4,66 ^b	12,54 ^b
Inverno	0,00 ^a	0,26 ± 1,02 ^c	10,12 ± 4,51 ^a	2,94 ± 2,34 ^{bc}	13,33 ^{ab}
Primavera	0,05 ± 4,36 ^b	0,06 ± 8,30 ^d	9,22 ± 2,41 ^a	3,27 ± 1,88 ^c	12,60 ^b

* Os resultados representam a média da concentração das isoflavonas do acesso analisado em triplicata ± Desvio Padrão (%).

** Concentração em mg/g de PS, médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%, resultados analisados por ANOVA e teste de Tukey 5%.

5.5 Estabilidade Química Acelerada

As amostras do extrato seco de trevo-vermelho foram analisadas de acordo com as condições preconizadas pela Resolução n. 1 do ano de 2005 (BRASIL, 2005).

Os resultados do estudo da estabilidade química acelerada (**Tabela 18**), não demonstraram um decaimento proporcional nas concentrações das isoflavonas, nem no total das isoflavonas, portanto não foi possível calcular a cinética de degradação das substâncias. Mas, foi possível observar que a concentração total de isoflavonas, na forma de agliconas, ao final de 6 meses permaneceu inalterada em 95,24%.

Tabela 18: Concentração das isoflavonas do extrato seco analisado em diferentes períodos.

Isoflavonas	P0 ^a	P1 (3 meses) ^a	P2 (6 meses) ^a
Daidzeína	0,01 ± 7,37	3,85 ± 7,54*	6,48 ± 4,87*
Genisteína	5,32 ± 4,23	5,75 ± 8,34	5,57 ± 8,87
Formononetina	94,83 ± 3,98	70,73 ± 5,78	78,59 ± 8,63
Biochanina A	101,15 ± 6,94	70,56 ± 14,41	104,09 ± 6,09
Total Isoflavonas	201,31	150,89	191,73

^a Os resultados representam a média da concentração das isoflavonas do acesso analisado em triplicata (mg/g de extrato seco) ± Desvio Padrão (%), * indica diferença significativa de $p \leq 0,05$, em relação ao P0

Aglicona é a forma mais estável de uma isoflavona. Isto pode ser observado pelos resultados que demonstraram uma permanência inalterada nos teores desta substância. O aumento significativo na concentração de daidzeína pode ser atribuído à uma possível conversão de outras isoflavonas neste composto, como por exemplo a formononetina que é a forma metilada desta. Ou ainda, ser atribuído à erro de amostragem.

5.6 Melhoramento Genético

A partir das concentrações encontradas nos primeiros 39 acessos de trevo-vermelho analisadas (número 1 ao 39 da **Tabela 1**), foram selecionados três que possuíam maiores concentrações totais de isoflavonas e que ainda estavam vivos até o período de floração. Estes, foram selecionados e denominados de plantas mães, pois deram origem às outras gerações.

Os resultados da análise das Plantas Mães (PM) encontram-se descritos na **Tabela 19**.

As quinze plantas mãe (PM) foram cruzadas entre si naturalmente, através de insetos polinizadores presentes na área. As sementes produzidas por estas plantas deram origem às progênies, plantas filhas 1 (F_1).

Foram plantadas dez sementes de cada F_1 (nem todas as plantas produziram o número de sementes suficiente) selecionada e no final foram analisadas as plantas que resistiram até o período de colheita para análise.

Os resultados da análise das plantas filhas 1 (F_1) encontram-se descritos na **Tabela 20**.

As plantas F_1 selecionadas, as que possuíam maiores concentrações totais de isoflavonas, foram também cruzadas entre si naturalmente, através de insetos polinizadores presentes na área. As sementes produzidas por estas plantas deram origem às progênes, plantas filhas 2 (F_2).

Finalmente, foram plantadas cinco sementes de cada F_2 (nem todas as plantas produziram o número de sementes suficiente) selecionada e no final foram analisadas as plantas que resistiram até o período de colheita para análise.

Os resultados da análise das plantas filhas 2 (F_2) encontram-se descritos na **Tabela 21**.

A média geral da concentração do total de isoflavonas para todas as plantas iniciais (PM) foi de 11,35 mg/g PS, e a média das plantas PM selecionadas foi de 10,98 mg/g PS (esta foi um pouco menor, pois nem todas as plantas que foram primeiramente selecionadas estavam vivas no período reprodutivo). A média geral da concentração do total de isoflavonas para as plantas F_1 foi de 9,41 mg/g PS, e a média das F_1 selecionadas foi de 14,73 mg/g PS. A média geral da concentração do total de isoflavonas para as plantas F_2 foi de 16,91 mg/g PS, e a média das F_2 selecionadas, as que possuíam maiores concentrações totais de isoflavonas, foi de 29,25 mg/g PS, observou-se que as F_2 eram plantas mais saudáveis e com maior conteúdo de massa (dados observados visualmente). Quando comparou-se as plantas selecionadas, na F_2 observou-se um percentual de aumento na concentração total de isoflavonas de 266,39% em comparação com as plantas mães.

Tabela 19: Concentração das isoflavonas dos acessos analisados para escolha das plantas mãe.

Acesso (código melhoramento)	Daidzeína^a	Genisteína^a	Formononetina^a	Biochanina A^a	Total de Isoflavonas^a
PI 237714 (1.1)	0,02	0,10	8,01	2,85	10,99
PI 237714 (1.2)	0,00	0,07	2,98	1,07	4,12
PI 237714 (1.3)	0,00	0,16	7,46	1,41	9,03
PI 235847 (2.1)	0,00	0,10	8,09	6,89	15,08
PI 235847 (2.2)*	0,00	0,03	6,89	3,37	10,29
PI 235847 (2.3)	0,07	0,15	9,55	8,09	17,86
PI 235870 (3.1)	0,01	0,10	5,13	3,15	8,39
PI 235870 (3.2)*	0,03	0,09	8,16	2,95	11,23
PI 235870 (3.3)	0,02	0,13	8,21	3,10	11,45
PI 310459 (4.1)*	0,01	0,09	7,86	2,25	10,21
PI 310459 (4.2)	0,01	0,09	3,85	1,33	5,27
PI 310459 (4.3)*	0,01	0,15	6,75	7,94	14,85
PI 266047 (5.1)	0,01	0,11	10,89	1,92	12,93
PI 266047 (5.2)	0,01	0,04	11,43	2,57	14,04
PI 266047 (5.3)	0,00	0,10	6,37	2,02	8,50
PI 315522 (6.1)*	0,00	0,02	1,86	1,03	2,90
PI 315522 (6.2)*	0,00	0,28	4,20	9,38	13,86
PI 315522 (6.3)*	0,00	0,06	6,95	1,98	8,98
PI 188680 (7.1)	0,00	0,10	8,93	6,27	15,30
PI 188680 (7.2)*	0,00	0,06	7,01	2,43	9,50
PI 188680 (7.3)	0,03	0,05	1,62	5,51	7,20
PI 204506 (8.1)	0,00	0,07	7,75	2,45	10,27
PI 204506 (8.2)	0,01	0,19	10,64	7,12	17,96
PI 204506 (8.3)	0,00	0,16	5,35	1,78	7,30
PI 345675 (9.1)*	0,00	0,05	5,45	2,50	8,00
PI 345675 (9.2)	0,00	0,07	6,39	2,46	8,92
PI 345675 (9.3)*	0,00	0,07	8,03	3,47	11,58
PI 419550 (10.1)	0,00	0,13	11,66	4,01	15,80
PI 419550 (10.2)*	0,01	0,03	13,84	3,09	16,98
PI 419550 (10.3)	0,00	0,29	1,95	1,02	3,26
PI 184960 (11.1)	0,06	0,16	9,29	4,96	14,47
PI 184960 (11.2)	0,03	0,15	13,17	4,60	17,95
PI 184960 (11.3)*	0,00	0,09	2,62	3,95	6,65
PI 306188 (12.1)	0,01	0,64	8,31	2,00	10,95
PI 306188 (12.2)	0,00	0,07	4,58	2,26	6,91
PI 306188 (12.3)	0,05	0,10	8,63	6,42	15,20
PI 302421 (13.1)	0,00	0,53	6,94	3,21	10,67
PI 302421 (13.2)	0,00	0,37	7,47	6,32	14,16
PI 302421 (13.3)*	0,01	0,05	11,89	2,87	14,81
PI 304842 (14.1)*	0,00	0,04	5,71	2,67	8,42
PI 304842 (14.2)	0,00	0,00	5,57	1,19	6,76
PI 304842 (14.3)	0,00	0,06	12,08	4,65	16,79
EEA/UFRGS (15.1)*	0,00	0,03	9,16	4,22	13,41
EEA/UFRGS (15.2)	0,00	0,07	10,41	10,70	21,18
EEA/UFRGS (15.3)	0,00	0,03	7,44	2,70	10,18

^a Concentração em mg/g de PS

* Plantas selecionadas

Tabela 20: Concentração das isoflavonas das plantas filhas 1 (F₁).

Código melhoramento	Daidzeína^a	Genisteína^a	Formononetina^a	Biochanina A^a	Total de Isoflavonas^a	%^b
2.2.1	0,00	0,00	6,52	0,03	6,55	-36,35
2.2.2	0,00	0,00	10,45	2,76	13,21	28,38
2.2.3	0,00	0,00	6,91	2,07	8,99	-12,63
2.2.4	0,27	0,00	13,93	1,74	15,94	54,91
2.2.5	0,20	0,00	9,21	2,89	12,30	19,53
2.2.6	0,11	0,00	3,63	0,71	4,45	-56,75
2.2.7	0,06	0,00	4,88	2,86	7,80	-24,20
2.2.8*	0,02	0,00	5,88	6,70	12,60	22,45
2.2.9	0,01	0,00	3,41	0,76	4,18	-59,38
2.2.10	0,03	0,00	4,41	1,99	6,42	-37,61
3.2.1	0,03	0,00	2,77	3,22	6,01	-46,48
3.2.2	0,03	0,02	4,52	2,87	7,44	-33,75
3.2.3	0,06	0,03	4,17	1,54	5,79	-48,44
3.2.4	0,01	0,02	1,56	3,97	5,57	-50,40
4.1.1	0,06	0,00	6,39	3,22	9,68	-5,19
4.1.2	0,00	0,00	5,05	2,63	7,68	-24,78
4.1.3	0,05	0,00	2,09	1,95	4,09	-59,94
4.1.4	0,11	0,00	4,15	1,61	5,88	-42,41
4.1.5	0,09	0,00	5,44	5,56	11,10	8,72
4.1.6	0,04	0,08	5,60	3,15	8,87	-13,12
4.1.7*	0,13	0,05	13,94	5,44	19,56	91,58
4.1.8	0,12	0,01	6,98	1,32	8,43	-17,43
4.1.9	0,24	0,06	6,13	6,43	12,87	26,05
4.3.1	0,04	0,07	3,47	4,29	7,88	-46,94
4.3.2	0,22	0,10	5,18	2,56	8,06	-45,72
4.3.3	0,13	0,05	3,83	3,13	7,15	-51,85
4.3.4	0,13	0,06	1,96	5,88	8,04	-45,86
4.3.5*	0,18	0,03	8,41	3,46	12,09	-18,59
6.1.1	0,21	0,03	2,56	0,62	3,43	18,28
6.1.2	0,00	0,05	3,09	4,41	7,55	160,34
6.1.3	0,01	0,13	1,90	1,67	3,71	27,93
6.1.4	0,04	0,08	3,18	2,46	5,75	98,28
6.1.5	0,05	0,12	7,62	9,84	17,62	507,59
6.1.6	0,04	0,19	4,05	5,25	9,52	228,28
6.1.7	0,00	0,00	2,60	0,72	3,32	14,48
6.1.8	0,00	0,03	3,01	5,44	8,48	192,41
6.1.9	0,11	0,00	4,94	4,75	9,80	237,93
6.1.10	0,02	0,00	5,58	4,16	9,75	236,21
6.2.1	0,00	0,07	6,09	10,79	16,95	22,29
6.2.2*	0,00	0,01	7,92	4,62	12,55	-9,45
6.2.3	0,10	0,05	4,27	3,46	7,88	-43,15
6.2.4*	0,03	0,07	7,68	6,06	13,85	-0,07
6.2.5	0,00	0,03	6,22	4,52	10,77	-22,29
6.2.6	0,00	0,00	4,29	0,73	5,01	-63,85
6.3.1	0,02	0,08	4,39	2,30	6,78	-24,50
6.3.2	0,00	0,00	2,92	1,24	4,15	-53,79
6.3.3	0,03	0,01	5,79	3,42	9,25	3,01
6.3.4	0,00	0,05	5,53	4,72	10,29	14,59
7.2.1	0,00	0,03	7,58	2,26	9,88	4,00
7.2.2	0,06	0,02	5,34	1,80	7,22	-24,00
7.2.3	0,08	0,00	5,28	0,36	5,72	-39,79
7.2.4	0,18	0,01	8,30	1,33	9,83	3,47
7.2.5	0,06	0,04	2,84	1,90	4,84	-49,05
7.2.6	0,06	0,04	2,50	3,39	5,99	-36,95
7.2.7	0,06	0,02	3,54	3,13	6,75	-28,95
7.2.8	0,06	0,00	3,21	1,02	4,28	-54,95
7.2.9	0,02	0,06	2,61	1,00	3,70	-61,05
7.2.10	0,00	0,02	2,66	1,46	4,14	-56,42

^a Concentração em mg/g de PS^b Percentual de aumento em relação à concentração total de isoflavonas da Planta Mãe

* Plantas selecionadas

Continuação Tabela 20: Concentração das isoflavonas das plantas filhas 1 (F₁)

Código melhoramento	Daidzeína^a	Genisteína^a	Formononetina^a	Biochanina A^a	Total de Isoflavonas^a	%^b
9.1.1	0,00	0,03	3,10	3,13	6,26	-21,75
9.1.2	0,00	0,00	7,49	2,00	9,49	18,63
9.1.3	0,00	0,07	4,81	6,91	11,80	47,50
9.1.4	0,00	0,07	5,22	1,18	6,47	-19,13
9.1.5	0,11	0,03	12,14	2,49	14,77	84,63
9.1.6	0,06	0,00	4,26	1,23	5,55	-30,63
9.1.7	0,00	0,06	2,01	8,22	10,29	28,63
9.1.8	0,00	0,00	3,48	1,77	5,25	-34,38
9.3.1	0,04	0,02	7,88	1,82	9,76	-15,72
9.3.2	0,00	0,03	4,10	9,57	13,70	18,31
9.3.3	0,13	0,02	9,33	4,29	13,78	19,00
9.3.4	0,00	0,00	4,82	0,05	4,87	-57,94
9.3.5	0,00	0,00	7,66	0,83	8,49	-26,68
9.3.6*	0,00	0,00	10,53	3,93	14,46	24,87
9.3.7	0,00	0,00	8,18	1,27	9,45	-18,39
9.3.8	0,02	0,01	3,37	1,38	4,77	-58,81
9.3.9*	0,01	0,00	7,73	4,25	11,98	3,45
9.3.10	0,00	0,01	3,64	3,31	6,96	-39,90
10.2.1	0,00	0,01	8,67	4,59	13,27	-21,85
10.2.2	0,00	0,00	7,78	0,81	8,59	-49,41
11.3.1*	0,00	0,04	8,70	3,17	11,92	79,25
11.3.2*	0,00	0,03	13,42	5,73	19,18	188,42
11.3.3	0,00	0,02	4,26	5,09	9,37	40,90
11.3.4	0,00	0,02	6,80	2,88	9,71	46,02
11.3.5	0,00	0,20	2,61	5,55	8,36	25,71
11.3.6*	0,00	0,00	9,29	4,76	14,05	111,28
11.3.7*	0,00	0,00	7,90	7,91	15,81	137,74
11.3.8	0,01	0,03	2,09	3,47	5,60	-15,79
11.3.9*	0,00	0,01	8,49	7,09	15,59	134,44
11.3.10	0,00	0,00	3,03	5,14	8,17	22,86
13.3.1	0,04	0,04	5,04	1,46	6,57	-55,64
13.3.2	0,01	0,01	7,75	1,40	9,18	-38,01
13.3.3	0,00	0,00	1,77	2,04	3,81	-74,27
13.3.4	0,00	0,00	7,33	2,73	10,06	-32,07
13.3.5*	0,00	0,20	10,94	5,08	16,22	9,52
13.3.6	0,00	0,00	5,34	0,80	6,14	-58,54
13.3.7	0,00	0,00	7,04	0,37	7,41	-49,97
14.1.1	0,00	0,02	8,07	3,40	11,50	36,58
14.1.2	0,00	0,04	5,05	4,78	9,86	17,10
14.1.3*	0,00	0,01	7,06	4,80	11,87	40,97
14.1.4	0,00	0,02	5,61	5,43	11,07	31,47
14.1.5*	0,00	0,01	8,28	3,68	11,97	42,16
14.1.6*	0,00	0,05	9,78	9,21	19,05	126,25
14.1.7	0,00	0,00	6,50	4,86	11,37	-4,21
15.1.1	0,00	0,01	7,44	4,03	11,48	-14,39
15.1.2	0,00	0,02	7,38	4,66	12,07	-9,99
15.1.3	0,00	0,00	5,31	1,62	6,94	-48,25
15.1.4*	0,00	0,01	5,51	6,71	12,23	-8,80
15.1.5*	0,19	1,05	10,79	8,13	20,17	50,41
15.1.6	0,00	0,00	8,47	2,94	11,41	-14,91
15.1.7	0,00	0,01	7,08	2,24	9,32	-30,50
15.1.8	0,01	0,00	5,53	3,34	8,88	-33,78
15.1.9	0,00	0,00	7,32	3,71	11,03	-17,75

^a Concentração em mg/g de PS^b Percentual de aumento em relação à concentração total de isoflavonas da Planta Mãe

* Plantas selecionadas

Tabela 21: Concentração das isoflavonas das plantas filhas 2 (F₂).

Código melhoramento	Daidzeína^a	Genisteína^a	Formononetina^a	Biochanina A^a	Total de Isoflavonas^a	%^b	%^c
2.2.8.1	0,00	0,24	8,73	10,30	19,26	87,17	52,88
2.2.8.2	0,00	0,26	9,17	3,16	12,59	22,36	-0,06
2.2.8.3*	0,00	8,13	6,36	12,52	27,01	162,45	114,37
2.2.8.4	0,00	3,74	7,33	12,08	23,16	125,03	83,81
2.2.8.5	0,00	0,05	5,45	5,14	10,64	3,45	-15,50
4.1.7.1	0,01	0,08	14,07	6,00	20,16	97,50	3,09
4.1.7.2	0,00	0,03	11,08	5,41	16,52	61,78	-15,55
4.1.7.3	0,00	0,02	9,59	6,65	16,26	59,28	-16,86
4.1.7.4	0,02	0,08	9,92	7,85	17,87	74,99	-8,66
4.1.7.5	0,00	0,01	9,73	5,31	15,04	47,35	-23,09
4.3.5.1	0,00	0,05	9,70	8,25	18,00	21,23	48,92
4.3.5.2	0,02	0,01	7,94	3,22	11,19	-24,67	-7,47
4.3.5.3	0,02	0,02	12,18	7,85	20,07	35,17	66,04
4.3.5.4	0,00	0,01	12,76	5,36	18,14	22,13	50,02
4.3.5.5	0,00	0,20	12,16	9,88	22,25	49,81	84,03
6.2.2.1	0,00	0,06	5,58	3,42	9,05	-34,72	-27,91
6.2.2.2	0,00	0,03	9,32	4,49	13,84	-0,13	10,29
6.2.2.3	0,00	0,08	16,67	6,31	23,07	66,43	83,79
6.2.2.4	0,15	0,26	3,88	2,85	7,13	-48,58	-43,21
6.2.4.1	0,00	0,08	7,50	5,40	12,98	-6,34	-6,26
6.2.4.2	0,05	0,20	6,93	6,59	13,77	-0,67	-0,59
6.2.4.3	0,76	0,53	7,95	4,60	13,85	-0,10	-0,02
6.2.4.4	0,00	0,12	6,54	12,98	19,63	41,66	41,78
9.3.6.1	0,25	0,28	9,24	4,86	14,63	26,36	1,20
9.3.6.2	0,04	0,13	6,04	4,63	10,83	-6,46	-25,09
9.3.6.3	0,00	0,04	5,80	3,38	9,23	-20,30	-36,17
9.3.6.4	0,02	0,09	3,49	1,82	5,43	-53,14	-62,48
9.3.6.5	0,26	0,17	11,68	6,08	18,20	57,15	25,86
9.3.9.1	0,00	0,03	6,44	7,33	13,81	19,22	15,24
9.3.9.2	0,00	0,04	11,15	4,75	15,94	37,68	33,08
9.3.9.3	0,00	0,05	10,34	6,92	17,31	49,48	44,49
9.3.9.4	0,00	0,02	7,57	5,27	12,86	11,08	7,38
9.3.9.5	0,00	0,03	10,40	4,99	15,42	33,19	28,74
11.3.1.1	0,00	0,04	11,82	7,90	19,76	197,21	65,83
11.3.1.2	0,00	0,08	5,46	2,91	8,44	26,93	-29,18
11.3.1.3	0,00	0,14	11,83	5,94	17,91	169,34	50,27
11.3.1.4	0,00	0,01	10,42	4,31	14,74	121,64	23,66
11.3.1.5	0,00	0,04	9,88	5,22	15,14	127,67	27,03
11.3.2.1	0,00	0,02	9,25	2,53	11,80	77,41	-38,48
11.3.2.2	0,00	0,02	6,18	3,74	9,94	49,51	-48,16
11.3.6.1	0,22	0,24	8,44	3,30	12,19	83,29	-13,24
11.3.6.2	0,06	0,04	14,58	6,40	21,09	217,09	50,09
11.3.6.3	0,03	0,02	10,84	3,42	14,31	115,18	1,85
11.3.6.4	0,00	0,11	9,02	10,55	19,68	195,98	40,10
11.3.6.5	0,00	0,04	7,60	7,31	14,95	124,81	6,41
11.3.7.1*	0,00	0,39	13,54	15,99	29,92	349,95	89,25
11.3.7.2	0,00	0,15	6,85	14,68	21,68	225,95	37,10
11.3.7.3	0,00	0,07	9,54	6,07	15,69	135,87	-0,79
11.3.7.4*	0,00	0,29	11,61	14,88	26,78	302,71	69,38
11.3.7.5	0,00	0,10	9,42	9,39	18,91	184,37	19,60
11.3.9.1	0,00	0,05	10,86	6,48	17,39	161,49	11,51
11.3.9.2	0,00	0,05	13,01	6,60	19,65	195,51	26,01
11.3.9.3*	0,00	0,17	13,31	10,27	23,75	257,19	52,32
13.3.5.1	0,00	0,11	6,48	4,78	11,37	-23,24	-29,90
13.3.5.2*	0,00	0,14	14,64	15,79	30,56	106,38	88,49
13.3.5.3	0,00	0,94	7,58	7,36	15,88	7,23	-2,06
13.3.5.4*	0,00	0,20	15,39	14,95	30,54	106,20	88,33
13.3.5.5	0,00	0,11	9,75	7,59	17,45	17,85	7,63

^a Concentração em mg/g de PS^b Percentual de aumento em relação à concentração total de isoflavonas da Planta Mãe^c Percentual de aumento em relação à concentração total de isoflavonas da F₁; * Plantas selecionadas

Continuação Tabela 21: Concentração das isoflavonas das plantas filhas 2 (F₂).

Código melhoramento	Daidzeína ^a	Genisteína ^a	Formononetina ^a	Biochanina A ^a	Total de Isoflavonas ^a	% ^b	% ^c
14.1.3.1	0,00	0,01	7,17	2,54	9,72	15,48	-18,09
14.1.3.2	0,00	0,04	13,52	6,25	19,81	135,32	66,92
14.1.3.3*	0,00	0,18	19,10	17,50	36,79	336,89	209,90
14.1.3.4	0,00	0,07	9,77	6,59	16,42	95,03	38,34
14.1.3.5	0,00	0,01	5,01	1,89	6,91	-17,88	-41,75
14.1.5.1	0,00	0,04	5,65	2,42	8,11	-3,67	-32,22
14.1.5.2	0,00	0,02	12,71	4,47	17,20	104,26	43,72
14.1.5.3	0,00	0,18	12,23	5,29	17,70	110,20	47,91
14.1.5.4	0,00	0,04	7,52	2,84	10,41	23,58	-13,05
14.1.5.5	0,00	0,05	9,73	5,63	15,41	83,06	28,81
14.1.6.1	0,00	0,04	10,06	2,91	13,01	54,52	-31,69
14.1.6.2	0,00	0,68	8,12	10,67	19,47	131,28	2,25
14.1.6.3	0,00	0,02	3,86	1,20	5,08	-39,63	-73,31
14.1.6.4	0,00	0,04	8,33	3,24	11,61	37,88	-39,05
14.1.6.5	0,00	0,06	5,89	3,58	9,53	13,14	-49,98
15.1.4.1	0,00	0,03	11,30	3,79	15,13	12,80	23,66
15.1.4.2	0,00	0,05	10,88	5,97	16,90	26,00	38,13
15.1.4.3	0,00	0,07	14,86	7,49	22,42	67,21	83,31
15.1.4.4	0,00	0,13	7,32	4,08	11,53	-14,03	-5,76
15.1.4.5*	0,05	0,10	14,96	15,61	30,72	129,06	151,11
15.1.5.1	0,32	0,35	13,04	6,81	20,52	53,02	1,75
15.1.5.2*	0,00	0,30	15,22	17,48	33,00	146,09	63,64
15.1.5.3*	0,00	0,07	15,25	8,07	23,40	74,46	16,01
15.1.5.4	0,00	0,09	8,44	8,49	17,02	26,92	-15,60
15.1.5.5	0,00	0,13	10,84	9,88	20,85	55,50	3,40

^a Concentração em mg/g de PS^b Percentual de aumento em relação à concentração total de isoflavonas da Planta Mãe^c Percentual de aumento em relação à concentração total de isoflavonas da F₁

* Plantas selecionadas

A Tabela 22 apresenta a comparação das médias do conteúdo de isoflavonas nas três gerações. Os dados demonstraram que houve um incremento significativo na concentração de isoflavonas na geração F₂ devido à seleção.

Tabela 22: Análise estatística para as médias das gerações do melhoramento vegetal

Geração	Número de repetições	Médias*	Significância 5%**
PM	45	11,34	a
F ₁	111	9,41	b
F ₂	83	16,90	c

*Médias expressas em mg/g de PS

**Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

Para se cultivar as plantas medicinais as técnicas de melhoramento vegetal tradicionais ou de biotecnologia podem ser aplicadas ao nível genético para melhorar o rendimento e a homogeneidade, e para modificar potência e toxicidade. Apesar do alvo principal para manipulação das características de plantas medicinais ser o conteúdo de compostos ativos, são importantes para o desenvolvimento da cultura as características básicas agrônômicas relacionadas à uniformidade, estabilidade, crescimento e desenvolvimento, e resistência à estresses bióticos e abióticos, que também devem ser melhorados (CANTER *et al.*, 2005).

5.7 Estudos biológicos

A inibição da atividade anti-inflamatória pode ser avaliada por modelos *in vitro* (ex. quimiotaxia) e *in vivo* (ex. indução de edema em pata de ratos, pleurisia e microcirculação *in situ*). Um dos métodos *in vivo* mais utilizados é o ensaio de indução de edema em pata de rato induzido por carragenina, descrito inicialmente por WINTER *et al.* (1962). A obtenção dos resultados neste experimento é feita com o auxílio de pletismômetro, no qual as patas são imersas em uma solução apropriada, e o volume deslocado (mL) corresponde ao inchaço provocado pelo agente flogístico, quando comparado com um controle. O edema produzido pelo mesmo agente flogístico também pode ser avaliado pela determinação do diâmetro (mm) da pata do rato na altura da articulação tíbio-társica (SCHAPOVAL *et al.*, 1994; SCHAPOVAL *et al.*, 1998; SUYENAGA, 2002).

A necessidade de tornar mais objetivas e menos dispendiosas as pesquisas por constituintes químicos de plantas, animais e microrganismos levou ao desenvolvimento de numerosas técnicas de ensaios químicos e bioquímicos para monitoramento e seleção de extratos, frações de extratos e substâncias puras bio/farmacologicamente úteis. Quanto à busca de inibidores de acetilcolinesterase, dois testes bioautográficos em cromatografia em camada delgada foram recentemente desenvolvidos (VIEGAS JR *et al.*, 2004). MARSTON *et al.* (2002) utilizaram corante azóico para identificar a atividade da acetilcolinesterase sobre o acetato de 1-naftila; em outro, RHEE *et al.* (2001) preconizaram a utilização de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (reagente de Ellmann) para a visualização da atividade enzimática.

5.7.1 Atividade anti-inflamatória *in vitro*

A atividade anti-inflamatória do extrato seco de trevo-vermelho foi avaliada pelo método *in vitro* do ensaio da câmara de Boyden (ZIGMOND E HIRSCH, 1973). Este método é baseado em uma câmara contendo dois compartimentos preenchidos separados por uma membrana microporosa. Em geral as células são colocadas no compartimento superior e migram através dos poros da membrana para o compartimento inferior, onde encontram-se os agentes quimiotáticos. Após o tempo de incubação adequado a membrana entre os dois compartimentos é fixada e

corada, e o número de células que migraram para a porção inferior é determinada com o auxílio de um microscópio.

O ensaio de inibição da quimiotaxia permite avaliar a eficácia da amostra frente a uma situação de inflamação induzida fora do organismo de um ser vivo, onde se verifica a ação da amostra diretamente sobre os leucócitos isolados. Através dos resultados verificou-se a inibição da migração leucocitária nas concentrações de 100,0, 50,0, 25,0, 10,0 e 5,0 µg/mL de extrato seco de trevo-vermelho (constituído de aproximadamente 200 mg de isoflavonas por grama de extrato seco) (**Tabela 23**). As médias e o erro padrão foram calculados e os dados foram submetidos à análise estatística por ANOVA (Análise de Variância), seguido por teste-t de Student, usando intervalo de confiança 95%.

Tabela 23: Resposta quimiotóxica *in vitro* de neutrófilos tratados com extrato de trevo-vermelho (contendo 200mg/g de planta seca de total de isoflavonas).

Amostra	Distância migrada (µm) ± epm	% inibição
Controle	121,4 ± 1,90	0
100µg/mL	6,4 ± 1,84*	94,73
50µg/mL	5,6 ± 1,58*	95,39
25µg/mL	6,4 ± 1,58*	94,73
10µg/mL	18,6 ± 2,74* ^{#+a}	84,68
5µg/mL	25,8 ± 2,74* ^{#+ab}	78,75

*p ≤ 0,001 em relação ao controle

+p ≤ 0,001 em relação a concentração de 100µg/mL

#p ≤ 0,001 em relação a concentração de 50µg/mL

^ap ≤ 0,001 em relação a concentração de 25µg/mL

^bp ≤ 0,001 em relação a concentração de 10µg/mL

O tratamento dos neutrófilos com 100,0, 50,0, 25,0, 10,0 e 5,0 µg/mL de extrato seco de trevo-vermelho reduziu, em todas concentrações, significativamente (p ≤ 0,001) a migração deles através da câmara preenchida com plasma tratado com lipopolissacarídeo. O percentual de inibição para as concentrações descritas acima foram, respectivamente, 94,73%, 95,39%, 94,73%, 84,68%, 78,75%, em comparação ao controle. Quando comparamos as concentrações entre elas verificou-se que houve diferença significativa (p ≤ 0,001) entre todas as concentrações quando se compara com as concentrações de 5 e 10 µg/mL; não existindo diferença significativa entre as concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL.

Neutrófilos são leucócitos altamente especializados que desempenham um papel chave na defesa contra invasão de bactérias, fungos e protozoários. Uma vez expostos a produtos derivados de micróbios, os compostos inflamatórios, como

neutrófilos são rapidamente ativados e migram através da corrente sanguínea ao tecido inflamado, onde agirão contra os agentes infecciosos através da secreção de antipeptídeos/enzimas hidrolíticas e fagocitose. A abundância de neutrófilos no sangue e a eficácia de seu recrutamento e suas ações antimicrobianas fazem destas células uma defesa de primeira linha no sistema imunológico inato. Entretanto, desregulações na ativação e transmigração dos neutrófilos também são atributos fundamentais para a inflamação, disfunções teciduais e injúrias que frequentemente reforçam os processos patofisiológicos e sintomas de doenças. Para entender o mecanismo molecular que regula a ativação dos neutrófilos, transmigração e funções antitumorais, muitos estudos têm sido desenvolvidos e importantes descobertas têm sido reveladas. Quando um neutrófilo na corrente sanguínea é exposto a mediadores inflamatórios, tais como interleucinas, fator de necrose tumoral, lipopolissacarídeos bacterianos, e lipoproteínas, rotas múltiplas de sinalizações intracelulares são iniciadas que permitem modificações sequenciais dos neutrófilos, incluindo exocitose celular (também denominada degranulação), mobilização do íon cálcio, liberação de espécies reativas de oxigênio, etc. (LIU *et al.*, 2004; ZEN *et al.*, 2006).

As respostas inflamatórias agudas e crônicas ocorrem através de reação celulares mediadas por fatores químicos, tais como: citocinas, quimioquinas, prostaglandinas, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, leucotrienos, etc., que são produzidos em respostas aos estímulos pró-inflamatórios. Em animais, a resposta inflamatória a vários agentes infecciosos envolve uma forte estimulação dos neutrófilos polimorfonucleares que liberam espécies reativas de oxigênio e mieloperoxidases (CASTRO *et al.*, 2008).

Os processos inflamatórios constituem a resposta de um tecido vivo a um estímulo lesivo, compreendendo uma série de eventos vasculares e celulares que objetivam o reparo da lesão. Uma das principais etapas da inflamação é a liberação de leucócitos (neutrófilos) da corrente sanguínea para o local da lesão, migração conhecida como diapedese ou quimiotaxia (RANG *et al.*, 2004).

Quimiotaxia é um fenômeno onde a direção da locomoção da célula é determinada por um gradiente de substâncias químicas extracelulares. A quimiotaxia tem um papel crítico em muitos processos fisiológicos, incluindo o recrutamento de

leucócitos para locais de infecção, tráfico de linfócitos através do corpo humano, e padronização das células neuronais no desenvolvimento do sistema nervoso. Por causa dos papéis essenciais da quimiotaxia no desenvolvimento e fisiologia, células indevidamente guiadas podem causar diversas patologias, incluindo crescimento de tumores, metástase de câncer e doenças inflamatórias, tais como asma, artrite e arterosclerose. Muitos componentes celulares envolvidos na quimiotaxia de células eucariotas já foram descobertos. Em mamíferos, os sinais extracelulares que guiam a migração de leucócitos são basicamente peptídeos curtos, chamados quimioquinas, que exercem seus efeitos de ligação a membros de uma grande família de receptores de proteínas-G (JIN *et al.*, 2008).

A atividade anti-inflamatória relacionada aos flavonoides é bastante conhecida e estudada. Esta atividade é resultado principalmente da inibição de algumas enzimas chaves envolvidas na inflamação e/ou nas rotas de sinalização celular tais como cicloxigenase (COX) onde alguns flavonoides, como o canferol, por exemplo, atuaria inibindo as enzimas COX e 5-lipoxigenase, como a quercetina que atuaria inibindo seletivamente a enzima 5-lipoxigenase, envolvida na formação dos leucotrienos a partir do ácido araquidônico, ou ainda, a proteína quinase C. (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003; SELLOUM *et al.*, 2003).

5.7.2 Atividade anti-inflamatória *in vivo*

Os resultados da administração oral, de uma suspensão em água do extrato seco de trevo-vermelho, sobre a inibição do edema da pata de ratos induzido pela carragenina podem ser observados na **Tabela 24**. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (epm). Os dados foram submetidos à análise por ANOVA (Análise de Variância), seguido por teste-t de Student, usando intervalo de confiança 95%.

Tabela 24: Efeito da administração v.o. de extrato de trevo-vermelho sobre o edema em pata de ratos induzido pela carragenina (n= 7 animais).

Tratamento	volume do edema de pata (mL) ± epm (% inibição)			
	1h	2h	3h	4h
Controle	1,46 ± 0,23	1,64 ± 0,27	2,27±0,10	1,98 ± 0,20
Indometacina (10 mg/kg)	0,732 ± 0,23** (50%)	0,997 ± 0,22** (40%)	0,864 ± 0,22* (62%)	0,604 ± 0,13* (70%)
Trevo-vermelho (50 mg/kg)	0,655 ± 0,13* (55%)	0,754 ± 0,11** (54%)	0,770 ± 0,07* (66%)	0,960 ± 0,18* (51%)
Trevo-vermelho (100 mg/kg)	0,474 ± 0,09* (68%)	0,431 ± 0,08*# (74%)	0,672 ± 0,15* (70%)	0,625 ± 0,12* (69%)

*p ≤ 0,001 em relação ao controle

**p ≤ 0,01 em relação ao controle

p ≤ 0,05 em relação à indometacina

+ p ≤ 0,05 entre doses

Neste estudo trabalhou-se com ratos machos, uma vez que se trata de estudos preliminares, e queríamos eliminar o fator hormonal que ocorre quando se trabalha com animais do sexo feminino.

O extrato seco de trevo-vermelho é constituído aproximadamente de 200 mg de isoflavonas por grama de extrato seco. Na **Tabela 24** estão apresentados os resultados obtidos juntamente ao controle negativo e à indometacina. Observou-se que o extrato demonstrou atividade antiedematogênica significativa, já na primeira hora após a administração da suspensão, para as duas doses testadas. A dose de 100 mg/kg após duas horas demonstrou diferença significativa quando comparada à indometacina. Após duas horas da administração das doses também foi possível verificar diferença entre elas. O extrato demonstrou atividade antiedematogênica significativa em todas as doses e tempos testados.

A atividade antiedematogênica logo após a primeira hora de administração da dose do extrato pode ser explicada pelo fato de que a absorção das agliconas é mais rápida e mais extensiva do que a dos glicosídeos (IZUMI *et al.*, 2000; BECK *et al.*, 2005). Considerando-se que o extrato seco de trevo-vermelho, utilizado para o preparo da suspensão, é constituído majoritariamente de isoflavonas, sugere-se que a atividade demonstrada esteja relacionada a estes compostos, ou ainda do sinergismo destes compostos majoritários entre eles ou ainda com outros presentes em concentrações inferiores.

O edema da pata do rato, é um modelo padrão para inflamação aguda (SELLOUM *et al.*, 2003). A inflamação aguda em pata de rato é caracterizada pela migração de células inflamatórias dentro do sistema microvascular e fluídos que entram no tecido intersticial. Estes eventos são induzidos por mediadores que se ligam à receptores específicos nas células inflamatórias e endoteliais. Estudos sugerem que a migração de células inflamatórias ocorrem através de pelo menos dois eventos sequenciais. O primeiro evento é um rápido enrijecimento destas células, que ocorrem durante os primeiros minutos, depois um mediador inflamatório entra na corrente sanguínea. O segundo evento é uma adesão firme mediada por moléculas CD11/CD18 e outras moléculas de adesão, que são necessárias para manter as células inflamatórias sequestradas dentro dos capilares. Esta adesão firme é seguida por migração trans-endotelial dentro do tecido da pata, levando a uma lesão celular tecidual mediada (ALBERTINI *et al.*, 2007).

Uma variedade de estímulos induzem a migração de neutrófilos para o tecido da pata. Modelos experimentais de inflamação aguda induzida por carragenina produzem uma série de respostas inflamatórias, devido ao aumento na resposta a quimioatraentes aumentando a migração dos neutrófilos aos sítios de inflamação (FAN e MALIK, 2003). Durante inflamação aguda induzida por carragenina, vários mediadores inflamatórios são lançados dentro do tecido da pata do rato, tais como prostaglandinas (PGE₂), leucotrienos (LTD₄), interleucinas (IL1 e IL6), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio. Estes mediadores inflamatórios tem potenciais para continuar estimulando a resposta inflamatória e sua perpetuação (GUAY *et al.*, 2004).

SUYENAGA (2002) demonstrou em modelo de quimiotaxia que as isoflavonas genisteína e daidzeína inibiram a migração leucocitária. Entretanto, não observou esta atividade em isoflavonas que possuem grupos metoxila (biochanina A e formononetina), em meio contendo albumina, pois os grupamentos metoxilas presentes nestas substâncias possuem alta afinidade com proteínas plasmáticas, em especial com albumina.

Evidências sugerem que o tratamento com medicamentos anti-inflamatórios não esteroides pode estar associado com um baixo risco de desenvolver doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. Estas descobertas são evidências

robustas que a resposta inflamatória no cérebro pode estar envolvida nas disfunções vasculares endoteliais e podem desempenhar um importante papel na patogênese de doenças neurodegenerativas (LEE e LEE, 2008).

Observações epidemiológicas bem como estudos em animais e algumas pesquisas clínicas em humanos sugerem que uma dieta rica em fitoestrógenos possui um elevado potencial na prevenção das “Doenças Ocidentais” como aterosclerose, osteoporose, doenças cardiovasculares, diversos tipos de câncer e os sintomas da menopausa (BECK *et al.*, 2005; KRENN *et al.*, 2002).

Através dos resultados analisados, evidenciou-se a atividade anti-inflamatória do extrato seco de trevo-vermelho, e sugere-se que mais estudos nesta área sejam desenvolvidos, pois os resultados obtidos foram promissores.

5.7.3 Detecção de inibidores da acetilcolinesterase

No ensaio autobiográfico realizado, o resultado apresentado pelas sete soluções metanólicas de extrato seco de trevo-vermelho (1000,0, 100,0, 50,0, 25,0, 10,0, 5,0, 1,0 µg/mL) migradas ou aplicadas, e pelas quatro soluções de isoflavonas (daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, todas na concentração de 100,0 µg/mL) testadas, foi negativo, pois nenhuma mancha branca contra o fundo púrpura foi visualizada.

A acetilcolinesterase é uma serina hidrolase que desempenha um importante papel na sinapse colinérgica. A hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, neurotransmissor predominante no hipocampo e no córtex cerebral, áreas relacionadas à memória e aprendizado, no sistema nervoso pela acetilcolinesterase é conhecida como uma das mais eficientes reações enzimáticas catalíticas (NUNES-TAVARES *et al.*, 2002).

Na junção neuromuscular, o neurotransmissor acetilcolina se liga ao receptor de acetilcolina induzindo uma mudança conformacional que abre o canal de íon. Esta curta abertura é seguida por um estado de fechamento, onde a acetilcolina se dissocia do receptor e é hidrolisada por uma enzima específica chamada acetilcolinesterase. Uma vez que a acetilcolinesterase tem um papel importante na

neurotransmissão colinérgica, sua atividade é de grande interesse (MONTEIRO *et al.*, 2007).

A diversidade estrutural dos inibidores da acetilcolinesterase conhecidos e a possibilidade de se explorar modos de ação distintos têm estimulado o estudo químico de várias espécies vegetais e de microorganismos que possam fornecer novos modelos de substâncias anticolinesterásicas. Neste sentido, vários exemplares da biodiversidade têm sido estudados em decorrência de sua utilização popular ou de dados etnobotânicos. Um dos exemplos mais difundidos como fitomedicamentos são os extratos de *Ginkgo*. Aparentemente, muitos dos efeitos protetores do SNC associados ao uso prolongado de extratos de *Ginkgo biloba* estão relacionados à presença de constituintes terpênicos e flavonoides com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Estas substâncias podem atuar de diferentes formas, contribuindo para a integridade do tecido neuronal: (a) inibindo a atividade das enzimas superóxido-dismutase e monoamino-oxidase, que contribuem para a geração de radicais livres no cérebro e no corpo; (b) sequestrando radicais livres que poderiam causar danos aos neurônios e, conseqüentemente, retardar as mudanças associadas à idade no cérebro e (c) reduzindo a liberação de ácido araquidônico, um co-produto tóxico do metabolismo lipídico, que aparece no cérebro logo após o episódio isquêmico (GOLD *et al.*, 2002).

ISODA *et al.* (2002) expuseram células de feocromocitoma da linhagem PC12 de ratos a diferentes concentrações de genisteína e daidzina para determinar o efeito destas substâncias na atividade da acetilcolinesterase da células. Estes autores verificaram que os fitoestrógenos podem aumentar a atividade da acetilcolinesterase, e que este fato pode ter implicações em casos médicos envolvendo deficiência de acetilcolinesterase, bem como na fisiologia de animais e insetos.

MONTEIRO *et al.* (2007) verificaram em seu estudo que o tratamento *in vivo* com vitaminas E mais C reverteu significativamente a ação da ovariectomia na atividade das Na⁺, K⁺-ATPase e da acetilcolinesterase em hipocampo de ratos fêmeas adultos. Reciprocamente, uma dieta de soja rica em isoflavonas foi capaz de reverter apenas o aumento da atividade da acetilcolinesterase. Estes compostos

juntos podem ter um papel de proteção contra o dano cerebral causado pela perda de estrogênio durante a menopausa.

Nos testes *in vitro* não é possível verificar atividade de inibição das isoflavonas, mas a atividade poderia estar relacionada com metabólitos destas substâncias que são absorvidos pelo sistema digestivo (como por exemplo o equol), e então atuarem na melhora de funções cognitivas. É bem provável que as isoflavonas atuem de uma maneira reguladora na atividade da acetilcolinesterase, mas o mecanismo de ação das mesmas na atividade da enzima acetilcolinesterase ainda não está bem elucidada. Assim, mais estudos são necessários para elucidar o exato mecanismo de ação.

A utilização de plantas como fonte de medicamentos para o tratamento das mais diversas doenças que acometem o homem, remota aos primórdios da humanidade. Muito provavelmente, a terapêutica moderna não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio das plantas.

O uso cada vez mais difundido da medicina tradicional para o tratamento das necessidades primárias de saúde envolvendo o uso de plantas medicinais, e a consequente maior entrada de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos no mercado brasileiro, tem tornado mais claro, ainda, a necessidade de se buscar parâmetros para o controle de qualidade destes produtos.

Os avanços crescentes assumidos pelas técnicas analíticas de controle de qualidade tem contribuído muito para a padronização e a estabilização de matérias-primas vegetais, estas, que podem sofrer inúmeras variações no conteúdo de princípios ativos, sob a influência de diversos fatores, como: clima, solo, transporte, armazenamento, e muitos outros.

Trifolium pratense (trevo-vermelho) é uma importante planta forrageira e contém as isoflavonas formononetina e biochanina A, e em menores concentrações daidzeína e genisteína. Estes compostos são os principais metabólitos secundários vegetais encontrados em plantas ou extratos fitoestrogênicos, eles tem ganhado muito interesse devido à seus benefícios à saúde humana. Recentemente, no ano de 2009, esta espécie foi incluída na lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS) que contém plantas medicinais com potencial de gerar produtos para serem produzidos e distribuídos pelo SUS.

No mercado brasileiro podemos encontrar um medicamento fitoterápico constituído de extrato de trevo-vermelho, Climadil[®], fabricado pela Marjan Ind. e Com. LTDA, e tem como indicação o alívio aos sintomas da menopausa. Mas é importante destacar que não existem estudos de quantificação de isoflavonas em plantas de trevo-vermelho cultivados no Brasil, um dos temas abordados neste trabalho.

Para quantificar as isoflavonas em folhas e extrato seco de trevo-vermelho foi importante desenvolver um método de preparo da amostra que garantisse completa

hidrólise das isoflavonas, pois estas se encontram no trevo-vermelho majoritariamente em forma de glicosídeos e malonato, foi então que o Método 1 foi proposto. Logo após, este método foi aperfeiçoado para que a quantidade excessiva de ácido clorídrico não prejudicasse o sistema cromatográfico, sendo, então, este método denominado Método 2. O método cromatográfico proposto possui um tempo de análise de apenas 12 minutos, enquanto os métodos cromatográficos que encontramos na literatura costumam possuir mais de 30 minutos para analisar as mesmas quatro isoflavonas estudadas aqui.

O método cromatográfico foi validado, para os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Com o método de preparo da amostra adequado e método cromatográfico validado foi dada continuidade ao trabalho e analisar as plantas e o extrato seco.

Com a análise dos 77 acessos de trevo-vermelho e de uma população cultivada no Brasil foi possível, a partir dos grupos formados, selecionar as plantas de maior interesse para a indústria farmacêutica, e selecionar as plantas para melhoramento genético, com finalidade de se obter uma população com elevados teores de isoflavonas e que se adaptasse bem às nossas condições de clima e solo. A diferença entre os teores das isoflavonas nos diferentes acessos, pode-se atribuir a diferenças genéticas, uma vez que as plantas foram cultivadas nas mesmas condições.

No melhoramento genético foi possível atingir o objetivo de aumentar o teor das isoflavonas através de cruzamento de plantas selecionadas. Todavia, para se concluir este trabalho seria necessário ainda, verificar a persistência das população formadas, a fim de verificar se o teor se mantém em diferentes ciclos de plantio, e para se registrar uma cultivar, seriam, ainda, necessários outros estudos ainda mais aprofundados.

O melhoramento também é importante para se desenvolver um método de cultivo sustentável da planta, e este também terá suas características conhecidas. No caso de coleta de material selvagem, este pode envolver a destruição de toda a planta ou de seus órgãos reprodutivos, dependendo do farmacógeno, e assim é inevitável a degradação das populações selvagens. Não se pode usar plantas

medicinais em grande escala sem se modificar as características das populações disponíveis para nós, sejam elas selvagens ou domesticadas. Se as plantas medicinais são levadas a cultivo, então nós podemos utilizar de condições controladas, e ao mesmo tempo conservar as populações selvagens.

No estudo sazonal não se verificou diferenças significativas entre as estações do ano.

O preparo do extrato seco de folhas de trevo-vermelho foi satisfatório para os experimentos que foram realizados, mas caso se queira produzir em uma escala maior, a fabricação deste deve ser otimizada. E o resultado da estabilidade do extrato seco, demonstrou que este é muito estável, no período de tempo e nas condições testadas.

A escolha das atividades biológicas a serem testadas partiram de um artigo de PERRY e colaboradores (2003) que propõe que as atividades antioxidante, anti-inflamatória, estrogênica e depressora do sistema nervoso central são indicativos para que um fármaco que possa ser empregado para o tratamento da Doença de Alzheimer. Na época em o trabalho iniciou-se (2005), artigos já relatavam atividades antioxidante e estrogênicas para o trevo-vermelho, e ainda não existiam estudos quanto a atividade anti-inflamatória para esta espécie, apenas constatações de que esta planta poderia apresentar essa atividade devido a presença de isoflavonas. Sendo assim, incluiu-se testes de atividade anti-inflamatória e de inibição da enzima acetilcolinesterase *in vitro*.

Os resultados da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*, foram muito promissores. O tratamento *in vitro* (quimiotaxia) de extrato seco de trevo-vermelho reduziu, em todas as concentrações testadas, significativamente a migração dos neutrófilos através da câmara de Boyden. Quando comparam-se as concentrações entre elas mesmas verificou-se que existiu diferença significativa entre as todas as doses quando comparadas com as doses de 5 e 10 µg/mL; não existindo diferença significativa entre as doses de 100, 50 e 25 µg/mL. Sendo assim, não existe a necessidade de se utilizar doses superiores a 25 µg/mL. No tratamento *in vivo* (inibição do edema em pata de rato) pode-se observar que o extrato seco de trevo-

vermelho demonstrou atividade antiedematogênica significativa, já na primeira hora após a administração da suspensão, para as duas doses testadas.

No teste da inibição da acetilcolinesterase o extrato seco de trevo-vermelho não demonstrou atividade, mas esta falta de atividade pode ser devida ao teste ter sido desenvolvido *in vitro*, uma vez que outros trabalhos já demonstraram esta atividade para isoflavonas, em testes *in vivo*. Desta forma, sugere-se a realização de atividade de inibição da acetilcolinesterase utilizando testes *in vivo*, pois podem ser os metabólitos das isoflavonas os responsáveis por esta atividade.

O método analítico desenvolvido por CLAE para a quantificação de daidzeína, genisteína formononetina e biochanina em amostras de *Trifolium pratense* mostrou-se adequado;

- A partir dos resultados obtidos para a validação de metodologia analítica empregada pode-se afirmar que o método de CLAE foi devidamente validado apresentando, linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez;
- As isoflavonas (daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A) quantificadas em 78 acessos de trevo-vermelho, tiveram seus conteúdos de agliconas (expressos em $\mu\text{g/g}$ de planta seca) variando entre 0,00 a 137,91 para daidzeína; 14,70 a 516,51 para genisteína; 452,97 a 28548,65 para formononetina; e 1967,64 a 20145,27 para biochanina A, e a concentração total de isoflavonas variou entre 9,81 e 36,36 mg/g;
- O estudo sazonal mostrou que a concentração total das isoflavonas do trevo-vermelho não é estatisticamente significativo em diferentes estações do ano;
- O estudo preliminar de estabilidade acelerada demonstrou que a amostra de extrato seco de trevo-vermelho permaneceu com o teor de isoflavonas totais em 95,24% do inicial após 180 dias;
- No estudo de melhoramento vegetal foi possível observar um aumento na concentração total de isoflavonas de 266,39% entre PM e F₂, verificando-se de que é possível se aumentar os teores totais de isoflavonas de trevo-vermelho por métodos tradicionais de melhoramento vegetal, e assim se pode obter matéria-prima vegetal para fabricação de fitoterápicos de alta qualidade;
- O extrato seco de trevo-vermelho demonstrou significativa inibição da migração dos leucócitos nas concentrações de 100,0 (94,73% de inibição), 50,0 (95,39% de inibição), 25,0 (94,73% de inibição), 10,0 (84,68% de inibição) e 5,0 (78,75% de inibição) $\mu\text{g/mL}$;

- O extrato seco de trevo-vermelho demonstrou efeito antiedematogênico significativo nas doses de 100 e 50 mg/kg, sendo o percentual médio de inibição do edema 63,37%;
- Ao testar-se a atividade anticolinesterásica constatou-se que os compostos testados não demonstraram esta atividade sugerindo que estudos complementares sejam realizados.

ADLERCREUTZ, C.H.; HOCKERSTEDT, K.; BANNWART, C. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). **Journal of Steroidal Biochemistry**, v. 27, p. 1135-1144, 1987.

ADLERCREUTZ, C.H. Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 103-112, 1995.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMBIRE, F.; SALGADO, M.A.C.; BJORDAL, J.M.; ALVES, L.P.; MUNIN, E.; COSTA, M.S. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLL) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, p. 50-55, 2007.

ALLARD, R.W. **Princípios de melhoramento genético de plantas**, Rio de Janeiro: USAID, 1971. 381 p.

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

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. v. 2, 1991, p. 15-100.

BECK, V.; UNTERRIEDER, E.; KRENN, L.; KUBELKA, W.; JUNGBAUER, A. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 84, p. 259-268, 2003.

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

BHARGAVA, R.; SHUKLA, A.K.; CHAUHAN, N.; VASHISHTHA, B.B.; DHANDAR, D.G. Impact of hybridity on flavonoid spectrum of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p.135-138, 2005.

BOOTH, N.L.; OVEK, C.R.; YAO, P.; TOTURA, S.; DENG, Y.; HEDAYAT, A.S.; BOLTON, J.L.; PAULI, G.F.; FARNSWORTH, N.R. Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) isoflavones and estrogenic activity. **Journal of Food and Agricultural Chemistry**, v. 54, p. 1277-1282, 2006.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.M. **Melhoramento de Plantas**, 4 ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2005. 525 p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003: Guia para a Validação de Métodos Analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 48 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 1 de 29 de julho de 2005: Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2005.

BROWN, A.H.D. Core collections: a practical approach to genetic resources management. **Genome**, v. 31, p. 818-824, 1989.

CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

CANTER, P.H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 180-185, 2005.

CASTRO, R.; LAMAS, J.; MORAIS, P.; SANMARTÍN, M.L.; ORALLO, F.; LEIRO, J. Resveratrol modulates innate and inflammatory responses in fish leucocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 9-19, 2008.

CHEN, H.Q.; WANG, X.J.; JIN, Z.Y.; XU, X.M.; ZHAO, J.W.; XIE, Z.J. Protective effect of isoflavones from *Trifolium pratense* on dopaminergic neurons. **Neuroscience Research**, v. 62, p. 123-130, 2008.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. 670 p.

DIAS, P.M.B.; JULIER, B.; SAMPOUX, J.P.; DALL'AGNOL, M. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. **Euphytica**, v. 160, p. 185- 205, 2008a.

DIAS, P.M.B.; PRETZ, V.F.; DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; ZUANAZZI, J.A. Analysis of genetic diversity in the core collection of red clover (*Trifolium pratense*) with isozyme and RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 202-211, 2008b.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, p. 337-353, 1999.

- DIXON, R.A.; STEELE, C.L. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 394-400, 1999.
- DIXON, R.A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205-211, 2002.
- DORNSTAUDER, E.; JISA, E.; KRENN, L.; KUBELKA, W.; JUNGBAUER, A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon) intended for large scale use in hormone replacement therapy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 78, n. 1, p. 67-75, 2001.
- EDWARDS, R.; TILLER, S.A.; PARRY, A.D. The effect of plant age and nodulation on the isoflavonoid content of red clover (*Trifolium pratense*). **Journal of Plant Physiology**, v. 150, p. 603-610, 1997.
- FAN, J.; MALIK, A.B. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. **Nature Medicine**, v. 9, p. 315–321, 2003.
- FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, *et al* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2003.
- FERGUS, E.N; HOLLOWELL, E.A. Red Clover. **Advances in Agronomy**, v. 12, n.1, p. 365-436, 1960.
- FRAME, J.; CHARLTON, J.F.L.; LAIDLAW, A.S. **Temperate forage legumes**, Reino Unido: Biddles, Guildford and King's Lynn. 1997, p. 181-189.
- FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H. **The conservation of plant biodiversity**. Reino Unido: Cambridge University Press. 1995, 113 p.
- GOLD, P. E.; CAHILL, L.; WENK, G.L. *Ginko biloba*: A cognitive enhancer? **Psychological Science in the Public Interest**, v.3, n. 1, p. 3-11, 2002.
- GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 24866–24872, 2004.
- HE, X.; LIN, L.; LIAN, L. Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 755, p. 127-132, 1996.
- INSTITUTE FOR ENVIRONMENT AND HEALTH. **Phytoestrogens in the human diet**; <http://www.sisoe.cranfield.ac.uk/ieh/pdf/w3.pdf> (acessado em maio de 2006), 2000.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Text on Validation of Analytical Procedures**. Switzerland: ICH, 1993.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. London: ICH, 1996.

ISODA, H.; TALORETE, T.P.N.; KIMURA, M.; MAEKAWA, T.; INAMORI, Y.; NAKAJIMA, N.; SEKI, H. Phytoestrogens genistein and daidzin enhance the acetylcholinesterase activity of the rat pheochromocytoma cell line PC12 by binding to the estrogen receptor. **Cytotechnology**, v. 40, p. 117-123, 2002.

IZUMI, T.; PISKULA, M.K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K., SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1695-1699, 2000.

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

JIN, T.; XU, X.; HERELD, D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. **Cytokine**, v. 44, p. 1-8, 2008.

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

KAPPEL, A. **Os trevos – espécies do gênero *Trifolium***. Secretaria da Agricultura – DPA, RS. p. 05-20, 1967.

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

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

KOUAMÉ, C.N.; QUESENBERRY, K.H. Cluster analysis of a world collection of red clover germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 40, p. 39-47, 1993.

KRENN, L.; PAPER, D.H. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). **Phytomedicine**, v.16, p. 1083-1088, 2009.

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

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

LANGE, O. **Caracterização isoenzimática de oito espécies do gênero *Trifolium* L., ocorrentes no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2001. 188f. Dissertação (Mestrado).

LAPČÍK, O. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2909-2916, 2007.

LEE, Y.W.; LEE, W.H. Protective effects of genistein on proinflammatory pathways in human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 819-825, 2008.

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

LIU, Y.; SHAW, S.K.; MA, S.; YANG, L.; LUSCINSKAS, F.W.; PARKOS, C.A. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 7-13, 2004.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC Bioautographic method for the detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v.13, p. 51-54, 2002.

MAZUR, W.M.; DUKE, J.A.; WÄHÄLÄ, K.; RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, p. 193-200, 1998.

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

MIKSICEK, R.J. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 49, p. 153-160, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, Espécies vegetais**. 2009. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em 21.08.2009.

MONTARDO, D.P. **Avaliação e melhoramento genético de trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) em duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2002. 173f. Tese (Doutorado).

MONTEIRO, S.C.; MATTOS, C.B.; SCHERER, E.B.S.; WYSE, A.T.S. Supplementation with vitamins E plus C or soy isoflavones in ovariectomized rats: effect on the activities of Na⁺, K⁺-ATPase and cholinesterases. **Metabolism Brain Diseases**, v. 22, p. 156-171, 2007.

MOSJIDIS, J.A.; KLINGLER, K.A. Genetic diversity in the core subset of the US red clover germplasm. **Crop Science**, v. 46, p. 758-762, 2006.

NACHTIGALL, L.E. Isoflavones in the management of menopause. **Journal of the British Menopause Society**, S1, p. 8-12, 2001.

NUDELMAN, N.S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975. 187 p.

NUNES-TAVARES, N.; DA MATTA, A.N.; SILVA, C.M.B.; ARAÚJO, G.M.N.; LOURO, S.R.W.; HASSÓN-VOLOCH, A. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 1071-1079, 2002.

OCCHIUTO, F.; ZANGLA, G.; SAMPERI, S.; PALUMBO, D.R.; PINO, A.; PASQUALE, R.D.; CIRCOSTA, C. The phytoestrogenic isoflavones from *Trifolium pratense* L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity. **Phytomedicine**, v. 15, p. 676-682, 2008.

PAIM, N.R. Melhoramento genético de leguminosas forrageiras. In: PEIXOTO A.M.; MOURA, J.C. DE; FARIA, V.P. **Pastagens Fundamentos da Exploração Racional**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 893-908.

PAPADOPOULOS, Y.A.; TSAO, R.; MCRAE, K.; MELLISH, A.E.; FILLMORE, S.A.E. Genetic variability of main isoflavones in red clover. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 1345-1347, 2006.

PARVU, E. *Trifolium pratense* for breast disease: a case series. **Homeopathy**, v. 93, p. 45-50, 2004.

PENG, Y.Y.; YE, J.N. Determination of isoflavones in red clover by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Fitoterapia**, v. 77, n. 3, p. 171-178, 2006.

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, p. 651-659, 2003.

PFITSCHER, A.; REITER, E.; JUNGBAUER, A. Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, p. 87-94, 2008.

POEHLMAN, J.M.; SLEPER, D.A. **Breeding Field Crops**, 4 ed. Ames: Iowa State University Press, 1995, 494p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

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

RHEE, I.K.; VAN DER MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer

chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p. 217-223, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27 (5), p. 771-780, 2004.

RIJKE, E.; GÓMEZ, A. Z.; ARIESE, F.; BRINKMAN, U.A.T.; GOOIJER, C. Determination of isoflavones glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts: quantification and stability studies. **Journal of Chromatography A**, v. 932, p. 55-64, 2001.

ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. [2.1] New York, Exeter Software, 2000.

SABUDAK, T.; GULER, N. *Trifolium* L. A review on its phytochemical and pharmacological profile. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 439-446, 2009.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: a textbook of pharmacognosy**, 4. ed. Estocolmo: Apotekarsocieteten, 1999, 551p.

SAS Institute. **SAS: STAT user's guide: Statistics**. NC State Univ. Press. Cary, NC. [8.02]. Cary, NC, SAS Institute, 2001.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L.; ALICE, C. B.; HENRIQUES, A. T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 137-142, 1994.

SCHAPOVAL, E. E. S.; VARGAS, M. R. W.; CHAVES, C. G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J. A.; HENRIQUES, A. T. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 53-59, 1998.

SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, p. 313-318, 2003.

SHARAPIN, N. **Fundamentos da tecnologia de fitoterápicos**. Bogotá: Cytec, 2000.

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

SIVESIND, E.; SEGUIN, P. Effects of foliar application of elicitors on red clover isoflavone content. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v. 192, p. 50-54, 2006.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology**. The Iowa State University Press Ames, Iowa, 1974.

SUYENAGA, E.S. **Avaliação da atividade antiinflamatória de flavonóides por ensaios *in vivo* e *in vitro***. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2002. 238f. Tese (Doutorado).

SUMNER, L.W.; PAIVA, N.L.; DIXON, R.A.; GENO, P. W. High-performance Liquid Chromatography/Continuous-flow Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry of Flavonoid Glycosides in Leguminous Plant Extracts. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, p. 472-485, 1996.

SWINNY, E.E.; MARKHAM, K.R. Applications of flavonoid analysis and identification techniques: Isoflavones (Phytoestrogens) and 3-deoxyanthocyanins. In: RICE-EVANS, C. A. & PACKER, L. (Ed.). **Flavonoids in Health and Disease**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003, cap. 4, p. 97-122.

TAHARA, S.; IBRAHIM, R.K. Prenylated isoflavonoids – An update. **Phytochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1073-1094, 1995.

TAYLOR, N.L.; QUESENBERRY, K.H. **Red Clover Science**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996, 226p.

TAYLOR, N.L.; SMITH, R.R. Red clover breeding and genetics. **Advances in Agronomy**, v. 31, n. 1, p. 125-153, 1979.

TAYLOR, N.L.; SMITH, R.R. Red clover. In: Barnes R.F., Miler D.A., Nelson C.J. (eds) **Forages**. Iowa State University, 1995. p. 217-226.

THAM, D.M.; GARDNER, C.D.; HASKELL, W.L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. **Journal of the Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 7, p. 2223-2235, 1998.

TOEBES, A.H.W.; DE BOER, V.; VERKLEIJ, J.A.C.; LINGEMAN, H.; ERNST, W.H.O. Extraction of isoflavone malonylglucosides from *Trifolium pratense* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4660-4666, 2005.

TSAO, R.; PAPADOPOULOS, Y.; YANG R.; YOUNG, J.C.; MCRAE, K. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5797-5805, 2006.

USP. The United States Pharmacopeia, The national formulary. NF 24. 29 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006. 3539p.

VETTER, J. Isoflavones in different parts of common *Trifolium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 106-108, 1995.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; FURIAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

WILSIE, C.P. Trebol rojo y trebol hibrido. In: HUGHES, H.D.; HEATH, M.E.; METCALFE, D.S. **Forrajes**. 6.ed. Cidade do México: Companhia Editorial Continental, 1976. p. 163-173.

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

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

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

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

ZEN, K.; REAVES, T.A.; SOTO, I.; LIU, Y. Response to genistein: Assaying the activation status and chemotaxis efficacy of isolated neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, v. 309, p. 86-98, 2006.

ZGÓRKA, G. Pressurized liquid extraction versus other extraction techniques in micropreparative isolation of pharmacologically active isoflavones from *Trifolium* L. species. **Talanta**, article in press, 2009.

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

ZUANAZZI, J. A.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, *et al* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2003.

9.1 Anexo 1: Carta de Aprovação do Comitê de Ética



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO**

pro*pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007723


Título : Estudo químico de diferentes acessos de Trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) e atividades biológicas

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
JOSE ANGELO SILVEIRA ZUANAZZI	PESQ RESPONSÁVEL	zuanazzi@farmacia.ufrgs.br	33085313
ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL	PESQUISADOR	elf@farmacia.ufrgs.br	33085218
GRAZIELE PEREIRA RAMOS	PESQUISADOR	00145118@ufrgs.br	
MIGUEL DALL AGNOL	PESQUISADOR	migueld@vortex.ufrgs.br	33087413

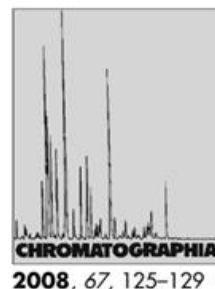
O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 10 , ata nº 90 , de 19/7/2007 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 26 de julho de 2007


LUIZ CARLOS BOMBASSARO
Coordenador do CEP-UFRGS

9.2 Anexo 2: Artigo publicado na Revista Chromatographia

LC Determination of Four Isoflavone Aglycones in Red Clover (*Trifolium pratense* L.)



Grazielle P. Ramos¹, Paula M. B. Dias³, Cláudia B. Morais², Pedro E. Fröhlich^{1,2}, Miguel Dall'Agnol³, José A. S. Zuanazzi^{1,2,✉}

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

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, CEP 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil; E-Mail: zuanazzi@farmacia.ufrgs.br

³ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Received: 17 May 2007 / Revised: 21 September 2007 / Accepted: 21 September 2007
Online publication: 15 November 2007

Abstract

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is an important forage plant that contains the isoflavones daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A. These compounds have been studied lately due to their human health benefits. The aim of this study was to develop and validate an HPLC method with simplified sample preparation to quantify daidzein, genistein, formononetin and biochanin A simultaneously in red clover leaves. The validation showed that the method is specific, accurate, precise and robust, not to mention that the sample preparation is easier and faster than those described earlier. The response was linear over a range of 0.01–0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for daidzein, 0.05–0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for genistein, 4–40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for formononetin and 2–20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for biochanin A. The range of recoveries was 85.6–101.0%. The RSD for intra- and inter-day precision were <2.54 and <7.22%, respectively. Five populations of red clover, from the National Plant Germplasm System-USDA were analyzed and the content of daidzein, genistein, formononetin and biochanin A ranged from 7.87–91.31, 51.60–131.30, 6568.33–23461.82, to 2499.55–10337.33 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried material, respectively.

Keywords

Column liquid chromatography
Red clover
Isoflavones
Validation

Introduction

The isoflavones have recently gained widespread attention as potential therapeutic agents, particularly in the area of women's health. They have estrogenic activity and they have been associated with prevention of breast and prostate cancer as well as cardiovascular disease [1]. Isoflavones are also of interest because of their effect in farm animals. Consumption of forages with high isoflavone concentrations may cause reproductive problems in sheep and cows [2].

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is a leguminosae that is used as grazing food for cattle and other livestock around the world and it contains some isoflavones also found and extensively studied in soybean, including aglycones and their glycoside and glycoside malonate derivatives [3]. In red clover, the main isoflavones are formononetin and biochanin A, with smaller concentrations of daidzein and genistein. Several methods to characterize the isoflavone

content in red clover using liquid chromatography using both ultraviolet and/or mass detectors, as well as capillary electrophoresis with electrochemical detection have been reported [3–10]. Qualitative studies using red clover leaves and flowers only led to the identification of numerous isoflavones [5, 11]. Other studies using HPLC methods focused on the composition of both original and acidic hydrolyzed fractions of red clover extracts [4, 6, 8, 9].

Most HPLC methods developed for the quantitation of isoflavones in red clover have disadvantages like the isolation of only three of them [12] or being very time consuming procedures [4, 6, 9, 13, 14].

The aim of this study was to develop and validate a simple, fast and affordable HPLC method with fast sample preparation to separate and quantify daidzein, genistein, formononetin and biochanin A in red clover leaves, after acidic hydrolysis.

Experimental

Plant Material

Five populations of red clover from the core subset collection of NPGS-USDA (National Plant Germplasm System—United States Department of Agriculture), that were cultivated in a greenhouse located in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (30°01'59 latitude, 51°13'48" longitude and elevation 10 m) were analyzed.

Extraction

Leaves were dried in an oven at 100 °C during 1 h. After that the plant material was ground with a mortar and pestle. Each population sample was prepared and analyzed in triplicate. Ten milligram of the powder was extracted with 4 mL of 6 M HCl and incubated in a water bath at 100 °C for 15 min with magnetic stirring. After cooling, the solution was filtered and the residue washed with 5 mL of methanol. The liquid was transferred to a 10 mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water. Before HPLC

injection the extracted was filtered again (0.45 µm membrane).

Chemicals and Reagents

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

Chromatographic Conditions

HPLC analysis was performed on a Waters Alliance 2695 chromatograph using a UV detector (UV/VIS Waters 2487) and a C18 reversed-phase column (Nova-Pak, 4 µm, 3.9 × 150 mm) with guard-column (C18). To evaluate the specificity a photodiode array detector (DAD) (UV/VIS Waters 996) was also used.

Elution of isoflavones was performed using a linear gradient system, and the mobile phases consisted of a mixture of acetonitrile:water:trifluoroacetic acid (20:80:0.01; v/v/v) (A) and acetonitrile:trifluoroacetic acid (100:0.1; v/v) (B). The gradient profile was: 0–10 min from 0 to 40% of B, 10–11 min 40% of B, 11–12 min from 40 to 100% of B. At the end of each analysis, 6 min of 100% A was used to restore the initial conditions. The flow-rate was 0.7 mL min⁻¹. The detection was at 260 nm.

Results and Discussion

Sample Preparation and Chromatographic Conditions

Most methods described to analyze red clover isoflavones in the literature have a very complex sample preparation, and running times in the HPLC longer than 40 min [1, 3, 5, 8–11, 15–17]. In order to develop a simpler and faster procedure, several conditions were tested. It was

noticed that the use of dried plant material is preferable as fresh leaves cannot be homogenized properly. It was already described that the pretreatment used (dry leaves in an oven at the temperature of 100 °C during 1 h) did not reduce the content of isoflavones, as observed in earlier paper [18]. After testing several acidic extraction procedures (data not shown) it was determined that 6 M HCl showed the best results. The extraction time was also evaluated, and no significant changes in concentration were observed after 15 min. Figure 1a shows a chromatogram of a standard solution containing the four main isoflavones found in red clover leaves.

Method Validation

Appropriate method validation according to well an established protocol is required by regulatory authorities [19]. This procedure is intended to ensure that an analytical method is specific, accurate, precise, linear and robust over a specified range [20].

Specificity

Purity of the chromatographic peaks obtained for daidzein, genistein, formononetin and biochanin A was evaluated using a DAD detector. The results showed that other compounds did not co-elute with them (graphics not shown).

Linearity

The linearity between peak area and concentration was analyzed using three calibration curves obtained in three different days with standard solutions of daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A at six different concentrations each, ranging from 0.01 to 0.2 µg mL⁻¹ for daidzein, 0.05–0.5 µg mL⁻¹ for genistein, 4–40 µg mL⁻¹ for formononetin and 2–20 µg mL⁻¹ for biochanin A. The linear equation and the determination coefficient (*r*²) for each isoflavone were respectively: $Y = 73096X + 77.183$, 0.9983 for daidzein; $Y = 99245X + 484.92$, 0.9999 for genistein; $Y = 86207X + 17464$, 0.9996 for formononetin; and

$Y = 113098X - 14451, 0.9997$ for biochanin A.

Accuracy

The accuracy of the method was accessed by analyzing samples of red clover that were spiked with known amounts of daidzein, genistein, formononetin and biochanin A standard solutions. The results for nine determinations (three concentrations, three solutions each) are shown in Table 1. Only daidzein showed a low recovery ($85.6 \pm 2.06\%$), but it is important to notice that the values obtained are very reproducible in all three concentrations evaluated and a correction factor could be applied in order to obtain the real daidzein content.

Precision

The precision was performed in two different levels: intra-day precision and inter-day precision. The intra-day precision of the method was determined after injecting three samples (three times each). The inter-day precision of the method was studied by analyzing three samples during three consecutive days, each sample was injected three times every day. The RSD for peak area for intra-day and inter-day precision are shown at Table 2.

Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

Both LOD and LOQ were calculated using the lowest concentration of the calibration curves ($0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ for daidzein, $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ for genistein, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ for formononetin and $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ for biochanin A). The peak height and the baseline noise were calculated by the Empower Software. The LOD was evaluated from three different samples of each isoflavone, which produced a signal to noise ratio of approximately three. The LOD obtained was $0.0003 \mu\text{g mL}^{-1}$ for daidzein, $0.0015 \mu\text{g mL}^{-1}$ for genistein, $0.0505 \mu\text{g mL}^{-1}$ for formononetin and $0.0215 \mu\text{g mL}^{-1}$ for biochanin A.

The LOQ is defined as the level at, or above, which the measurement precision is satisfactory for quantitative analysis. The LOQ was evaluated from three

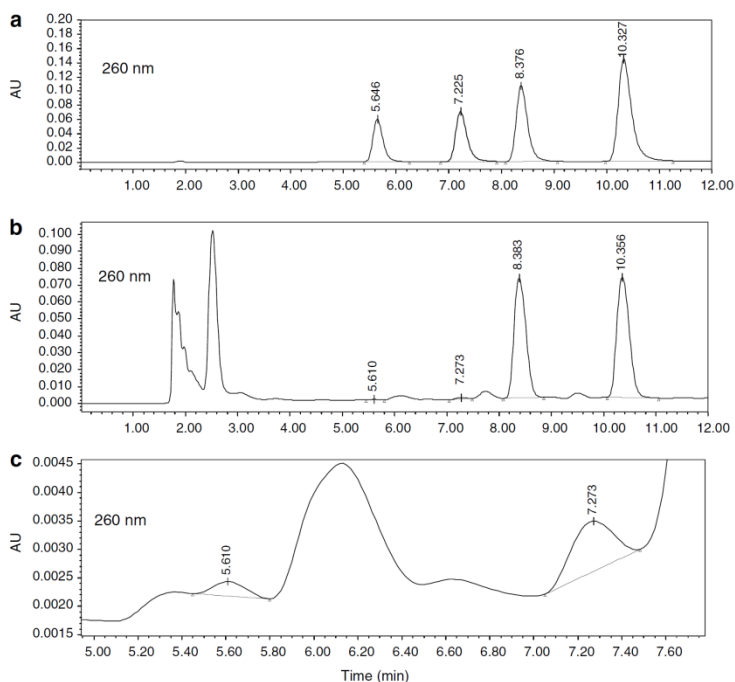


Fig. 1. **a** HPLC of a standard mixture containing daidzein ($10.92 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 5.646 min, genistein ($10.91 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 7.225 min, formononetin ($18.54 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 8.376 min and biochanin A ($22.72 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 10.327 min, respectively. **b** HPLC of a red clover leaf extract showing daidzein ($33.08 \mu\text{g g}^{-1}$ of DM) at 5.610 min, genistein ($104.06 \mu\text{g g}^{-1}$ of DM) at 7.273 min, formononetin ($12632.00 \mu\text{g g}^{-1}$ of DM) in 8.383 min and biochanin A ($10337.33 \mu\text{g g}^{-1}$ of DM) at 10.356 min, respectively. **c** Magnified part of the HPLC trace showing daidzein (5.610 min) and genistein (7.273 min), respectively

Table 1. Recoveries of daidzein, genistein, formononetin and biochanin A in red clover samples

Isoflavones	Sample	Concentration		Recovery (%)	Mean recovery (%) \pm RSD
		Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a		
Daidzein	S 1	0.16	0.14	87.5	85.6 ± 2.06
	S 2	0.21	0.18	85.7	
	S 3	0.25	0.21	84.0	
Genistein	S 1	0.15	0.15	100.0	100.0 ± 0.0
	S 2	0.23	0.23	100.0	
	S 3	0.40	0.40	100.0	
Formononetin	S 1	6.21	6.37	102.6	101.0 ± 2.4
	S 2	15.53	15.88	102.3	
	S 3	31.07	30.50	98.2	
Biochanin A	S 1	3.34	3.18	95.2	97.7 ± 2.9
	S 2	7.79	7.56	97.0	
	S 3	13.36	13.46	100.8	

^a $n = 3$

different samples of each isoflavone, which produced a peak height close to ten times the baseline noise. The LOQ was $0.0009 \mu\text{g mL}^{-1}$ for daidzein, $0.0050 \mu\text{g mL}^{-1}$ for genistein, $0.1683 \mu\text{g mL}^{-1}$ for formononetin and $0.0715 \mu\text{g mL}^{-1}$

Table 2. RSD for peak areas during intra and inter-day precision and robustness evaluation

	Isoflavones			
	Daidzein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
Precision				
Intra-day; peak area ^a ± RSD%	2715 ± 0.84	23879 ± 2.54	510458 ± 2.44	1180999 ± 1.21
Inter-day; peak area ^b ± RSD%	2645 ± 4.99	24520 ± 7.22	517277 ± 5.23	1199143 ± 6.02
Robustness				
Normal conditions	7668	12411	1932210	963691
Different column batch	4348	8087	2006036	724351
Flow 0.8 mL min ⁻¹	5279	7124	1701509	837128
Flow 0.6 mL min ⁻¹	8810	9015	2258779	1115037
Mobile phase A TFA 0.03%	7530	12351	1941709	960589

Peak areas

^a*n* = 3, ^b*n* = 9**Table 3.** Concentrations (µg g⁻¹ of dried material) of daidzein, genistein, formononetin and biochanin A ± standard deviation (%) in red clover samples

Red clover samples	Daidzein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
1	17.70 ± 5.53	131.30 ± 2.53	9785.96 ± 3.31	2499.55 ± 4.10
2	7.87 ± 3.25	78.19 ± 6.20	6568.33 ± 2.59	3806.78 ± 3.34
3	22.33 ± 5.79	51.60 ± 11.36	9234.70 ± 3.75	4717.85 ± 2.01
4	33.08 ± 0.79	104.06 ± 5.55	12632.00 ± 5.34	10337.33 ± 6.17
5	91.31 ± 0.14	78.71 ± 5.36	23461.82 ± 5.37	9950.20 ± 1.76

for biochanin A. It is important to note that all calculated LOQ values, based on the signal to noise ratio, were well below the necessary sensitivity for this method. This was consequently considered suitable as the isoflavone content found in red clover leaves were well above those levels.

Robustness

Robustness is defined as the capability of an analytical procedure to remain unaffected by small but deliberate changes in the method parameters. Six sample solutions were prepared and analyzed under the established conditions and by varying the following analytical parameters: chromatographic column batch, pH of the mobile phase and flow rate. The peak area was determined for each condition and the method showed to be robust (Table 2).

Analysis of Red Clover Samples

The native forms of isoflavones (the glycosides and the malonylglycosides)

can be affected by several factors, particularly how samples are harvested and stored before analysis. Considering the fact that most literatures suggest that aglycones are the biologically active form, the total isoflavone content (different isoflavones) was evaluated [21]. Five populations of red clover from the core subset collection of NPGS-USDA were analyzed. The concentrations were converted into their corresponding aglycones. Therefore, the values obtained in this study represent the total isoflavone concentration in red clover, including glucosylated and aglycone forms. The aglycone contents varied from 7.87 to 91.31 µg g⁻¹ of dried material (DM) to daidzein, 51.60–131.30 µg g⁻¹ of DM to genistein, 6568.33–23461.82 µg g⁻¹ of DM to formononetin, and 2499.55–10337.33 µg g⁻¹ of DM to biochanin A (Table 3). Figure 1b and c show a chromatogram of a sample and a detail of the same, respectively. It is important to notice that the contents varied considerably, and this variation is important, because varieties with higher isoflavones content will be of interest to nutraceutical

industries, whereas varieties with lower concentrations will be more adequate for animal use, as forage.

Conclusions

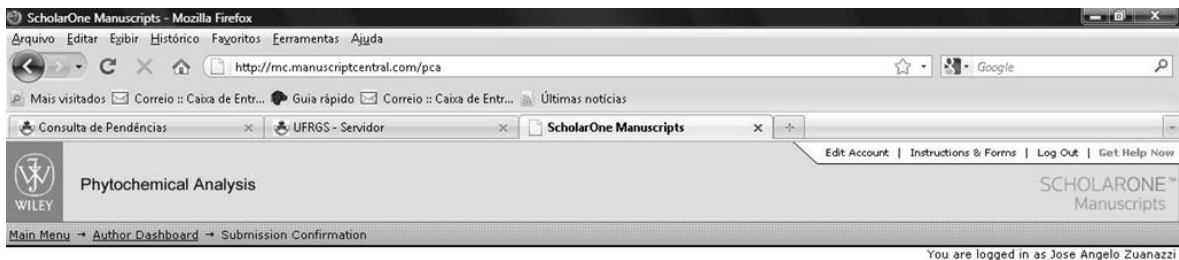
The described method enables the simultaneous quantification of daidzein, genistein, formononetin and biochanin A in red clover leaves after hydrolysis of the respective glycosides. According to the results the proposed procedure showed to be accurate, precise and robust not to mention that it has a simpler and faster sample preparation compared to those already described in the literature. The results showed that is very important to quantify the isoflavones content in red clover populations in order to properly choose those that produce more isoflavones when using them as isoflavone source as a food supplement for humans, and we can also select the ones that produce lower levels as forage.

References

1. Swinny EE, Markham KR (2003) In: Rice-Evans CA, Packer L (eds) Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker, New York
2. Beck AB (1964) Aust J Agric Res 15:223–230
3. Wu Q, Wang M, Simon JE (2003) J Chromatogr A 1016:195–209
4. Vetter J (1995) J Agric Food Chem 43:106–108
5. He X, Lin L, Lian L (1996) J Chromatogr A 755:127–132
6. Klejduš B, Vitamvášová-Sterbová D, Kubám V (1999) J Chromatogr A 839:261–263
7. Klejduš B, Vitamvášová-Sterbová D, Kubám V (2001) Anal Chim Acta 450:81–97
8. Rijke E, Gómez AZ, Ariese F, Brinkman UAT, Gooijer C (2001) J Chromatogr A 932:55–64
9. Krenn L, Unterrieder I, Rupprechter R (2002) J Chromatogr B 777:123–128
10. Peng YY, Ye JN (2006) Fitoterapia 77:171–178
11. Lin LZ, He XG, Lindenmaier M, Yang J, Cleary M, Qiu SX, Cordell GA (2000) J Agric Food Chem 48:354–365
12. Patroni JJ, Collins WJ, Stern WR (1982) J Chromatogr 247:366–368
13. Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala KK (1994) J Agric Food Chem 42:1905–1913

14. Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala KK (1995) *Proc Soc Exp Biol Med* 208:18–27
15. Sivesind E, Seguin P (2005) *J Agric Food Chem* 53:6397–6402
16. Sivesind E, Seguin P (2006) *J Agron & Crop Sci* 192:50–54
17. Booth NL, Ovek CR, Yao P, Totura S, Deng Y, Hedayat AS, Bolton JL, Pauli GF, Farnsworth NR (2006) *J Agric Food Chem* 54:1277–1282
18. Huang H, Liang H, Kwok KC (2006) *J Sci Food Agric* 86:1110–1114
19. Ruiz TP, Lozano CM, Sanz A, Bravo E (2004) *J Pharm Biomed Anal* 34:891–897
20. Shabir GA (2003) *J Chromatogr A* 987:57–66
21. Tsao R, Papadopoulos Y, Yang R, Young JC, McRae K (2006) *J Agric Food Chem* 54:5797–5805

9.3 Anexo 3: Artigo submetido à Revista Phytochemical Analysis



Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Phytochemical Analysis*.

Manuscript ID: PCA-10-01-41
Title: Isoflavones in USDA Red Clover Core Collection Accessions quantified by HPLC and Seasonal evaluation
Authors: Ramos, Grazielle Dias, Paula de Moraes, Claudia Dall'Agnol, Miguel Zuanazzi, Jose Angelo
Date Submitted: 26-Jan-2010

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)



**Isoflavones in USDA Red Clover Core Collection Accessions quantified by
HPLC and Seasonal evaluation**

Graziele Pereira Ramos ¹, Paula Menna Barreto Dias ², Cláudia Borges de Morais ¹,
Miguel Dall'Agnol ², José Angelo Silveira Zuanazzi ^{1*}

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

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

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 5450; fax: +55 51 3308 5437.

* Corresponding author: zuanazzi@farmacia.ufrgs.br

ABSTRACT

Introduction - *Trifolium pratense* L. (red clover) is one of the most utilized legume forage in the world agriculture and contains many of the isoflavones long recognized and extensively studied; these compounds have also been studied due to its human health benefits.

Objectives – Quantify the isoflavones (daidzein, genistein, formononetin and biochanin A) in 77 red clover accessions of the USDA-NPGS core collection and one population cultivated in Brazil and verify the seasonal variation of these compounds in different seasons.

Methodology - High-performance liquid chromatography and multivariate analysis were applied to quantify the isoflavones from red clover leaves.

Results - The aglycone contents of these compounds varied from 0.00 to 137.91 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry material (DM) to daidzein, 14.70 to 516.91 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM to genistein, 452.97 to 28 548.65 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM to formononetin and 2 199.02 to 15 670.39 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM to biochanin A. By the multivariate analysis was possible to verify four groups. The seasonal evaluation demonstrated that red clover has an increase of isoflavones concentration occur during the winter, and during spring, the total concentration of isoflavones is decreased.

Conclusion - These results are very important for the selection and breeding of new varieties with low (to be used as forage plant) or high (to be used for pharmaceutical proposes) isoflavones concentration, and for the selection of the best season for the harvest of red clover for different purposes.

Key words: Red clover, isoflavones, daidzein, genistein, formononetin, biochanin A, HPLC, seasonal evaluation

INTRODUCTION

Trifolium pratense L. (red clover) is one of the most utilized legume forage in the world (Bowley et al., 1984) and contains many isoflavones, which are long recognized and extensively studied, mainly formononetin and biochanin A, as well as smaller amounts of daidzein and genistein. Many works using morphologic (Christie & Choo, 1991; Kouamé & Quesenberry, 1993), molecular (Greene et al., 2004; Sato et al., 2005; Dias et al., 2008a) and biochemical traits (Yu et al., 2001; Mosjidis & Klinger, 2006) have showed the high genetic diversity present in this species. Indeed, recent studies of utilization of red clover by the pharmaceutical industry have pointed that dietary phytoestrogens play an important role in the prevention of menopausal symptoms (Beck et al., 2003), osteoporosis (Atkinson et al., 2004a), cancer (Atkinson et al., 2004b) and heart disease (Dixon, 2004).

The industrial use of red clover is a new activity and is under great expansion and diversification (Morris & Greene, 2001; Humphreys, 2005). Therefore, future breeding activities need to take this in account, exploiting the wide range of genetic diversity present in this species when making new varieties to supply the demands from this new market (Greene et al., 2004). The core collection of red clover of the National Plant Germplasm System of United States Department of Agricultural (NPGS-USDA) is composed by 85 accessions originating from 41 countries (Mosjidis & Klinger, 2006) and represents the genetic diversity present in this species and is one of the most utilized source of variability in breeding programs.

Total isoflavone concentration and concentrations of individual isoflavones are affected by many factors including fertility management, growth conditions, plant maturity, nodulation, tissue type, genetics and sampling methodology (Papadopoulos et al., 2006).

Despite the importance of the red clover core collection as source of variability, its biochemical diversity was never investigated before concerning the amount and seasonal variation of isoflavones.

The aims of this study were to: i) evaluate the amount of four isoflavones (daidzein, genistein, formononetin and biochanin A) in the red clover accessions from the USDA-NPGS core collection by a high-performance liquid chromatography (HPLC); ii) verify possible relationships between accessions depending on their origin

or improvement status by a multivariate analysis; and iii) study the seasonal variation of isoflavones concentration in red clover accessions.

EXPERIMENTAL

Plant Material: From the red clover core collection of National Plant Germplasm System of the United States Department of Agriculture (NPGS-USDA), a subset of 77 accessions from different countries (Table 1), and one population cultivated in Brazil were selected. The accessions from the core collection were classified by the NPGS on the basis of improvement status into cultivars, cultivated material, landraces and wild populations when the data were available (Mosjidis & Klinger 2006). The 78 accessions were planted in a greenhouse (in the same day) using a complete randomized design with repetitions (plants) per accessions. From each accession, seeds were germinated in Petri dishes with watered filter paper and after 15 days were planted in plastic pots (750 mL capacity). Each plant was inoculated with 1 mL of a solution of *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* in aqueous solution (concentration of 10^9 cells mL⁻¹). After one month the plants were transferred to pots of 5 kg soil capacity. The greenhouse was located at Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (30° 01'59" S, 51°13'48" W and elevation 10 m). Plants were evaluated for four different isoflavones aglycones, daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A. From each accession three leaves were collected from five adult plants. At the harvest plants were at the vegetative stage.

The accessions selected for the seasonal study were, N° 44-PI 179146, N° 71-PI 376880 and N° 29-PI 419550 (Table 1). They were planted as described above, however the pots were placed outside of the greenhouse in a field, so the plants could stay at weather conditions, for each season. Harvests were realized between thirty and forty-fifth day after the season beginning. The harvests were made always from the same plants, where three leaves were collected from five plants.

General: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses were performed on a Waters Alliance 2695 chromatograph and a UV detector (UV/VIS Waters 2487). The system was equipped with a C18 reverse-phase column (Nova-Pak, 4µm, 3.9 x 150 mm) with guard-column and operated at room temperature.

The sample preparation and HPLC method used in this work, for the study of isoflavones concentrations in accessions of red clover core collection and the seasonal evaluation, were previously validated by Ramos et al. (2008). One harvest was made, where three leaves from each five plants were pooled, and dried in an oven at the temperature of 100 °C during 1 h, after that, the plant material was ground with a mortar and pestle. Each population sample was prepared and analyzed in triplicate. Ten mg of plant material were extracted with 4 mL of 6M HCl and incubated at 100 °C for 15 min with magnetic agitation in a water bath. After cooling, the residue was filtrated and washed with methanol (5 mL). The extract was transferred to a 10 mL volumetric flask that was filled up with distilled water. Before HPLC injection the extracted was filtrated by a 0.45 μ m membrane (Ramos et al., 2008).

Elution of isoflavones was performed using a linear gradient system, and the mobile phase consisted of acetonitrile:water:trifluoroacetic acid (20:80:0.01; v/v/v) (A) and acetonitrile:trifluoroacetic acid (100:0.1; v/v) (B). The gradient profile was: 0-10 min from 0 to 40% B, 10-11 min 40% B, 11-12 min from 40 to 100% B. At the end each running, 6 min of 100% A was used to restore the initial conditions. The flow-rate was 0.7 mL/min. The wavelength of detection was 260 nm. All determinations were performed in triplicate (Ramos et al., 2008).

Statistical Analysis

Concentration of isoflavones: Analysis of variance was carried out, on data of all accessions and all isoflavones using PROC GLM of SAS software (SAS Institute, 2001). For the multivariate analysis, the NTSYS program was used to perform a principal component analysis (PCA) on the set of 78 accessions using the standardized mean values of isoflavones exhibiting significant population effect. A Pearson product moment correlation matrix, including all isoflavones was computed using the PROC CORR (SAS Institute, 2001).

Seasonal variation: Using the PROC GLM of SAS software (SAS Institute, 2001), the analyses of variance for all isoflavones were performed on each of the three accessions comparing the data from all seasons. The season's amounts of

isoflavones in each accession were compared using the post hoc Tukey HSD test of means.

RESULTS AND DISCUSSION

Seventy-seven accessions of red clover from a subset of the core collection of NPGS-USDA and one population cultivated in Brazil were analysed. Most isoflavones in red clover are malonated and glycosylated with only a small percentage present in the aglycone form (Edwards et al., 1997; Toebes et al., 2005; Sivesind & Seguin, 2005). Therefore, the quantification of isoflavones in this study represents the total isoflavone concentration in red clover, including malonyl, glucosylated and aglycone forms. The aglycone contents (Table 2) varied from 0.00 to 137.91 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry material (DM) to daidzein, 14.70 to 516.91 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM to genistein, 452.97 to 28 548.65 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM to formononetin and 2 199.02 to 15 670.39 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM to biochanin A. The total isoflavone concentration ranged between 9.81 and 36.36 mg g^{-1} .

The range of isoflavone concentration reported here was in agreement with the results found by Sivesind & Seguin (2005), who related similar isoflavone concentrations in ten red clover cultivars in Quebec, ranging from 8 923 to 12 753 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM. Booth et al. (2006) also found similar isoflavones concentrations when analysing only one red clover variety.

The lowest total isoflavone concentration was found in a landrace from Hungary (N° 14- PI318888) while the highest total isoflavone concentration was founded in a landrace from United States of America (N° 35- PI230229) (Table 2). Interestingly, the two accessions classified by the NPGS as tetraploid (N° 40- PI314840 and N°11- PI266047) presented no differences in total isoflavone contents when compared to the diploid ones. Similar results were found by Tsao et al. (2006) when comparing total isoflavones contents in diploid and tetraploid cultivars.

It is important to note that the isoflavones concentration, and total isoflavone concentration varied considerably among the accessions used in our study. This variability is very important, since we can select accessions with high isoflavones content to be used by the industry or we can select accessions with low content to be used as forage plants. The variation of isoflavone content can be explained by the fact that the isoflavones concentration in legumes is controlled by both genetic and

environmental factors. Isoflavones are constitutively found in legumes, but their concentrations often increase in response to biotic and abiotic stresses (Sivesind & Seguin, 2005).

Analysis of variance indicated significant differences for the four isoflavones among the 78 accessions (Table 3). The mean Euclidean distance between the 78 accessions was 6.62 and ranged from 0 to 17.58. The hierarchical cluster analysis on the Euclidean distance matrix produced three groups (data not show) and the cophenetic correlation was high ($r = 0.88$), which indicated that the dendrogram produced from the cluster analysis gave a good fit when compared with the distance matrix.

The principal component analysis, made with the means of the four isoflavones for all accessions, indicated that the first two dimensions were responsible for 99.96% of the variation found (Fig. 1). Scatter plots of those two dimensions visually supports the cluster analysis but indicated the formation of four groups, since populations N° 16, 26 and 56 were grouped (Fig. 1). The Table 4 resumes the average of isoflavones concentration of each group.

Group I was composed by three accessions that showed the highest content of daidzein and formononetin and presented the lowest content of genistein (Table 4). This group was also was characterized by the highest total isoflavone content. Interestingly these three accessions were classified by NPGS-USDA as landraces (N°34- PI295355 and N°34- PI230229) and as breeding material (N°29 - PI419550). This would be unexpected once these materials are thought to have less isoflavones concentration once they were already subject of selection in breeding programs. However, in general isoflavones concentration is not a problem for ruminants and this was probably not taken in account by plant breeding programs.

Group II was composed by 23 accessions, mostly cultivars or cultivated material that showed the highest genistein content and the second high total isoflavone content.

Group III contained the largest number of accessions (49) characterized by the lowest contents of daidzein, biochanin A and total of isoflavones. Among these accessions there were 10 late flowering cultivars from Europe high latitudes (N°1, 2, 3, 8, 9, 12, 13, 40, 41, 48), which were also clustered as found in recent studies, when the red clover core collection was analyzed using morphological, biochemical

and molecular markers (Dias et al., 2008a; Dias et al., 2008b). Taylor & Smith (1995) described that distinct plant types of red clover have evolved through natural selection and in Europe these types are largely distributed according to latitude, with the late flowering types more common to north of 60° latitudes and the early-flowering types that predominate in Europe south 50° latitudes. Most of accessions classified as wild by the NPGS (N°17, 45, 53, 54, 57, 64, 67, 70) were also present in this group.

Finally, group IV was composed by three accessions that had the highest level of biochanin A and the lowest content of formononetin.

When comparing the amounts of total isoflavone between groups (Table 4), there was no clear separation linked to geographic origin, type of material (cultivar, wild or landrace) or flowering time. Early and late flowering types of red clover were present in all clusters.

Isoflavones composition is similar among different red clovers cultivars. However, the total concentration of isoflavones differed significantly between cultivars (Sivesind & Seguin 2005, Tsao et al. 2006). The red clover core collection is formed mainly by cultivars or cultivated material. Thus the high level of variation in total isoflavone concentration between cultivars could explain this no structuration related to type of material. Cultivars and cultivated materials were present in both group I and III, which showed respectively the highest and lowest total concentration of isoflavones (Table 4).

Since all red clover accessions were grown in greenhouse under the same environmental conditions, the differences between cultivars in total isoflavone concentration could be explained by different genetic backgrounds. Genetic variation has been found to play an important role in isoflavones production in red clover (Sivesind & Seguin 2005, Tsao et al. 2006).

Papadopoulos et al. (2006) also shown in their study that total and individual isoflavones concentration in red clover plants have a genetic variability among cultivars, and suggests that selecting individual plant phenotypes for high formononetin and high biochanin A would be highly effective for cultivars development. Specific cultivar recommendations could thus be made depending on if concentrations are to be maximized or minimized depending on the intended use (Sivesind & Seguin 2005). Some of accessions evaluated here could be

selected by breeding programs with the objective to produce cultivars for forage production or for pharmaceutical use. Since the results found here highlighted the accessions from red clover core collection with low and high individual isoflavone contents.

Seasonal evaluation results are presented at Table 5 and Table 6. Results showed that the total concentration of isoflavones is lower during spring (when the plants are at reproductive stage), and higher when the plant is at vegetative stage. This could be explained, by the fact that during vegetative stage the plants produce more phytoalexins (as isoflavones) to prevent damages to the plant, so it could be alive to reproduce; and during the reproductive stage, plants generally focus their metabolites production to reproductive products (Tsao et al., 2006, Papadopoulos et al., 2006). It is important to pay attention what kind of secondary metabolites we are looking for and their physiological importance to the plant, so we can plan the period for harvest.

Tsao et al. (2006) demonstrated that the isoflavone concentration and composition were different in different plant parts, and the harvesting time also appeared to be important. The isoflavone concentration was higher after flowering, and the leaves were the plant part that had higher amounts of isoflavones.

Our results are important for the selection and breeding of new varieties with lower or higher isoflavones concentration. Results from seasonal evaluation showed that the vegetative stage is the best time for harvest in red clover accessions, with higher amounts of isoflavones. Findings in this study therefore provide important information for further studies on the utilization of red clover as a source for phytomedicines, nutraceuticals and functional foods, or forage use.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the fellowship support.

REFERENCES

- Atkinson C, Compston JE, Day NE, Dowsett M, Bingham SA. 2004a. The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* **79**: 326-333.
- Atkinson C, Warren RML, Sala E, Dowsett M, Dunning AM, Healey CS, Runswick S, Day NE, Bingham SA. 2004b. Red clover-derived isoflavones and mammographic breast density: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial [ISRCTN42940165]. *Breast Cancer Res* **6**: 170-179.
- Beck V, Unterrieder E, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. 2003. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**: 259-268.
- Booth NL, Overk CR, Yao P, Totura S, Deng YF, Hedayat AS, Bolton JL, Pauli GF, Farnsworth NR. 2006. Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) isoflavones and estrogenic activity. *J Agric Food Chem* **54**: 1277-1282.
- Bowley SR, Taylor NL, Dougherty T. 1984. Physiology and morphology of red clover. *Adv Agron* **37**: 317-347,
- Christie BR, Choo TM. 1991. Morphological characteristics associated with winter survival of five growth types of tetraploid red clover. *Euphytica* **54**: 275-278.
- Dias PMB, Julier B, Sampoux JP, Barre P, Dall'Agnol M. 2008a. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica* **160**: 189-205.
- Dias PMB, Pretz VF, Dall'Agnol M, Schifino-Wittmann MT, Zuanazzi JA. 2008b. Analysis of genetic diversity in the core collection of red clover (*Trifolium pratense*) with isozyme and RAPD markers. *Crop Breed Appl Biotech* **8**: 202-211.
- Dixon RA. 2004. Phytoestrogens. *Annual Rev Plant Biol* **55**: 225-261.
- Edwards R, Tiller SA, Parry AD. 1997. The effect of plant age and nodulation on the isoflavonoid content of red clover (*Trifolium pratense*). *J Plant Physiol* **150**: 603-610.
- Greene SL, Gritsenko M, Vandemark G. 2004. Relating morphologic and RAPD marker variation to collection site environment in wild populations of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Gen Res Crop Evol* **51**: 643-653.
- Humphreys MO. 2005. Genetic improvement of forage crops: Past, present and future. *J Agric Science* **143**: 441-448.
- Kouamé CN, Quesenberry KH. 1993. Cluster analysis of a world collection of red clover germplasm. *Gen Res Crop Evol* **40**: 39-47.

Morris JB, Greene SL. 2001. Defining a multiple-use germplasm collection for the genus *Trifolium*. *Crop Sci* **41**: 893-901.

Mosjidis JA, Klingler KA. 2006. Genetic diversity in the core subset of the US red clover germplasm. *Crop Sci* **46**: 758-762.

Papadopoulos YA, Tsao R, McRae K, Mellish AE, Fillmore SAE. 2006. Genetic variability of main isoflavones in red clover. *Can J Plant Sci* **86**: 1345-1347.

Ramos GP, Dias PMB, Morais CB, Fröhlich PE, Dall'Agnol M, Zuanazzi JAS. 2008. LC determination of four isoflavone aglycones in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Chromatographia* **67**: 125-129.

SAS Institute. 2001. *SAS: STAT user's guide: Statistics*. NC State Univ. Press. Cary, NC. [8.02]. Cary, NC, SAS Institute.

Sato S, Isobe S, Asamizu E. 2005. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Res* **12**: 301-364.

Sivesind E, Seguin P. 2005. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. *J Agric Food Chem* **53**: 6397-6402.

Taylor NL, Smith RR. 1995. Red clover. In: Barnes RF, Miler DA, Nelson CJ (eds) *Forages*. Iowa State University, p. 217-226.

Toebe AH, De Boer V, Verkleij JAC, Lingeman H, Ernst WHO. 2005. Extraction of isoflavone malonylglucosides from *Trifolium pratense* L. *J Agric Food Chem* **53**: 4660-4666.

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

Yu J, Mosjidis JA, Klingler KA. 2001. Isozyme diversity in North American cultivated red clover. *Crop Sci* **41**: 1625-1628.

Table 1. Passport data of 78 red clover accessions from NPGS core collection

Red clover number	Accession	Country	NPGS Improvement Status
1	PI 237705	Denmark	Cultivar
2	PI 196424	Denmark	Cultivar
3	PI 217507	Denmark	Cultivar
4	PI 237714	Denmark	Cultivar
5	PI 235847	Sweden	Cultivar
6	PI 235854	Sweden	Landrace
7	PI 235870	Sweden	Landrace
8	PI 229799	Finland	Cultivar
9	PI 236455	Finland	Cultivar
10	PI 310459	Switzerland	Cultivar
11	PI 266047	Poland	Cultivar
12	PI 384058	Poland	Cultivar
13	PI 294481	Austria	Cultivar
14	PI 318888	Hungary	Landrace
15	PI 315522	Italy	Uncertain
16	PI 249870	Greece	Wild
17	PI 253583	Spain	Wild
18	PI 188680	France	Landrace
19	PI 207972	France	Uncertain
20	PI 201191	Netherlands	Uncertain
21	PI 204506	Turkey	Uncertain
22	PI 204507	Turkey	Uncertain
23	PI 371959	Bulgaria	Cultivar
24	PI 294797	Bulgaria	Landrace
25	PI 251564	Serbia	Cultivated
26	PI 207520	Afghanistan	Uncertain
27	PI 228160	Russia	Cultivar
28	PI 345675	Russia	Cultivated
29	PI 419550	Japan	Breeding Material
30	PI 184960	Australia	Uncertain
31	PI 187284	United Kingdom	Cultivar
32	PI 306188	United Kingdom	Cultivar
33	PI 315534	Canada	Cultivar
34	PI 295355	USA	Landrace
35	PI 230229	USA	Landrace
36	PI 302421	Colombia	Cultivar
37	PI 304842	Chile	Cultivar
38	PI 226952	Ethiopia	Wild
39	-	Brazil	Breeding material
40	PI 314840	Norway	Cultivar
41	PI 188905	Sweden	Cultivar
42	PI 235867	Sweden	Landrace
43	PI 310465	Switzerland	Uncertain
44	PI 179146	Switzerland	Cultivated
45	PI 234925	Switzerland	Wild
46	PI 239696	Switzerland	Uncertain
47	PI 632214	Not available	Uncertain
48	PI 255894	Poland	Cultivar
49	PI 225119	Germany	Cultivar
50	PI 187008	Germany	Not available
51	PI 234836	Germany	Wild
52	PI 318887	Hungary	Landrace
53	PI 418889	Italy	Wild
54	PI 419294	Greece	Wild

Continuation of Table 1. Passport data of 78 red clover accessions from NPGS core collection

Red clover number	Accession	Country	NPGS Improvement Status
55	PI 220856	Portugal	Uncertain
56	PI 311492	Spain	Uncertain
57	PI 307948	Spain	Wild
58	PI 189174	Netherlands	Cultivar
59	PI 187224	Belgium	Cultivar
60	PI 234448	Belgium	Cultivar
61	PI 205313	Turkey	Uncertain
62	PI 120105	Turkey	Landrace
63	PI 171870	Turkey	Uncertain
64	PI 314487	Georgia	Wild
65	PI 315533	Bulgaria	Cultivar
66	PI 228365	Iran	Uncertain
67	PI 250899	Iran	Wild
68	PI 401469	Romania	Cultivar
69	PI 232941	Hungary	Cultivar
70	PI 440737	Russia	Wild
71	PI 419565	Japan	Breeding Material
72	PI 376880	New Zealand	Cultivar
73	PI 306185	UK	Cultivar
74	PI 286116	Canada	Cultivar
75	PI 286222	Canada	Cultivar
76	PI 306677	Ecuador	Landrace
77	PI 449326	Chile	Landrace
78	PI 271627	India	Uncertain

Table 2. Isoflavone concentration of 78 red clover accessions from NPGS core collection *

Red clover number	Daidzein **	Genistein **	Formononetin **	Biochanin A **	Total ***
1	23.72 ± 5.53	202.72 ± 2.53	9 785.96 ± 3.31	2 499.55 ± 4.10	12.43
2	34.67 ± 8.86	14.70 ± 6.41	9 061.74 ± 3.93	3 751.38 ± 5.04	12.85
3	32.54 ± 1.36	30.38 ± 7.47	12 200.17 ± 5.46	3 591.37 ± 7.59	15.84
4	41.46 ± 7.78	155.03 ± 1.99	12 598.38 ± 0.77	7 539.74 ± 0.44	20.27
5	22.02 ± 3.72	231.87 ± 4.66	7 176.57 ± 3.74	9 135.45 ± 3.82	16.48
6	28.76 ± 8.86	188.90 ± 4.26	10 970.80 ± 6.58	4 691.05 ± 6.65	15.81
7	70.39 ± 1.39	102.10 ± 4.00	15 621.64 ± 0.98	8 804.96 ± 1.30	24.56
8	10.55 ± 3.25	120.72 ± 6.20	6 568.33 ± 2.59	3 806.78 ± 3.34	10.46
9	29.75 ± 3.09	148.63 ± 1.02	8 018.49 ± 1.22	8 710.42 ± 1.23	16.85
10	28.63 ± 9.92	182.51 ± 6.04	10 163.32 ± 1.47	9 505.79 ± 0.88	19.81
11	32.36 ± 5.87	177.60 ± 3.57	14 076.68 ± 2.44	6 838.78 ± 0.26	21.05
12	12.21 ± 7.97	92.05 ± 2.64	6 479.65 ± 3.57	3 466.56 ± 5.18	10.01
13	26.24 ± 6.75	76.46 ± 7.45	7 907.60 ± 3.81	8 129.54 ± 2.05	16.11
14	9.75 ± 4.93	52.12 ± 7.84	5 595.14 ± 0.66	4 178.28 ± 7.03	9.81
15	35.72 ± 12.40	132.30 ± 0.92	11 410.87 ± 4.22	4 869.87 ± 4.36	16.40
16	0.00	153.73 ± 6.21	578.22 ± 7.17	10 813.49 ± 6.29	11.49
17	0.00	231.23 ± 3.79	5 243.77 ± 10.71	7 755.45 ± 3.74	13.15
18	0.00	335.97 ± 3.02	9 368.94 ± 3.96	11 432.91 ± 3.61	21.02
19	29.92 ± 5.79	79.67 ± 11.36	9 234.70 ± 3.75	4 717.85 ± 2.01	14.03
20	29.78 ± 3.30	26.46 ± 8.38	9 460.43 ± 4.02	4 004.19 ± 5.54	13.50
21	34.59 ± 6.18	201.14 ± 6.45	13 867.67 ± 3.39	9 923.49 ± 5.04	23.95
22	5.71 ± 3.52	118.19 ± 9.84	8 724.34 ± 4.88	3 725.11 ± 8.74	12.53
23	23.97 ± 8.63	61.39 ± 8.49	9 781.59 ± 5.81	4 109.10 ± 5.14	13.95
24	56.02 ± 3.62	247.26 ± 4.90	8 970.84 ± 0.83	6 073.66 ± 5.47	15.25
25	25.36 ± 6.71	71.47 ± 6.09	9 805.80 ± 1.66	4 330.47 ± 3.95	14.20
26	97.49 ± 3.04	60.44 ± 3.29	452.97 ± 1.43	15 670.39 ± 1.41	16.24
27	28.63 ± 8.06	116.95 ± 2.24	8 451.93 ± 0.76	5 340.85 ± 0.01	13.89
28	50.90 ± 0.90	194.41 ± 1.79	14 916.18 ± 3.83	5 977.54 ± 1.86	21.06
29	95.64 ± 3.16	349.08 ± 5.31	25 026.62 ± 5.91	9 272.23 ± 7.59	34.60
30	90.58 ± 8.26	197.64 ± 7.81	16 160.09 ± 8.86	11 478.19 ± 8.25	27.83
31	30.97 ± 4.96	516.91 ± 5.98	14 167.54 ± 2.07	12 591.14 ± 3.65	27.12
32	44.33 ± 0.79	160.66 ± 5.55	12 632.00 ± 5.34	10 337.33 ± 6.17	23.11
33	27.23 ± 4.96	318.77 ± 6.11	9 268.17 ± 2.84	2 199.02 ± 3.61	11.69
34	122.37 ± 0.14	121.52 ± 5.36	23 461.82 ± 5.37	9 950.20 ± 1.76	33.58
35	137.91 ± 7.96	113.60 ± 6.57	28 548.65 ± 3.04	7 612.77 ± 2.98	36.36
36	28.68 ± 2.54	429.83 ± 2.34	11 672.11 ± 2.16	14 908.10 ± 0.15	26.88
37	72.06 ± 9.20	264.69 ± 3.36	18 023.39 ± 2.14	11 247.64 ± 2.75	29.50
38	57.10 ± 8.48	117.45 ± 7.77	18 338.64 ± 7.15	9 417.67 ± 8.05	27.87
39	49.29 ± 2.29	214.00 ± 6.96	16 376.52 ± 3.04	11 144.73 ± 4.28	27.70
40	5.31 ± 5.96	124.72 ± 5.71	13126.22 ± 1.78	3708.69 ± 1.14	16.96
41	6.73 ± 3.67	315.21 ± 5.43	13726.68 ± 8.84	5045.36 ± 7.11	19.09
42	32.01 ± 9.90	160.31 ± 5.89	10713.98 ± 4.88	2948.10 ± 9.05	13.85
43	3.19 ± 14.10	516.80 ± 8.80	19234.79 ± 11.05	4974.13 ± 9.28	24.73
44	4.03 ± 14.24	286.93 ± 4.21	18602.98 ± 7.58	5020.09 ± 6.04	23.91
45	6.11 ± 4.11	239.24 ± 8.33	11325.43 ± 2.10	5610.23 ± 11.71	17.18
46	10.07 ± 7.69	327.15 ± 1.00	8345.16 ± 9.14	9344.65 ± 7.27	18.03
47	25.55 ± 3.82	160.51 ± 3.12	16181.23 ± 1.31	5446.30 ± 2.71	21.81
48	11.42 ± 9.68	156.20 ± 13.17	9838.78 ± 14.46	1967.64 ± 8.23	11.97
49	22.40 ± 3.23	153.65 ± 3.65	11778.49 ± 13.35	3180.85 ± 4.67	15.14

* Results present the mean of isoflavones quantification per population analyzed in triplicate ± Standard Deviation (%).

** Concentration in $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM

*** Concentration in mg g^{-1} of DM

Continuation of Table 2. Isoflavone concentration of 78 red clover accessions from NPGS core collection *

Red clover number	Daidzein **	Genistein **	Formononetin **	Biochanin A **	Total ***
50	29.04 ± 10.98	380.90 ± 9.78	12836.81 ± 3.86	4487.31 ± 5.20	17.73
51	21.31 ± 2.61	347.44 ± 10.32	12348.43 ± 3.37	7608.48 ± 3.93	20.33
52	9.44 ± 11.47	195.38 ± 1.12	10774.09 ± 9.45	2796.69 ± 10.52	13.78
53	14.33 ± 7.20	161.14 ± 11.15	10292.76 ± 5.68	4633.65 ± 5.40	15.10
54	54.74 ± 10.67	108.65 ± 13.15	10198.99 ± 8.84	3988.89 ± 8.55	14.35
55	11.72 ± 13.32	179.57 ± 1.76	12948.83 ± 1.08	5515.34 ± 3.16	18.66
56	0.55 ± 14.66	329.70 ± 2.07	2705.39 ± 12.35	20145.27 ± 9.37	23.18
57	28.21 ± 12.78	312.28 ± 10.38	6466.00 ± 10.11	5200.73 ± 12.50	12.01
58	8.15 ± 6.10	164.62 ± 0.38	9682.74 ± 11.97	4751.97 ± 11.75	14.61
59	54.52 ± 10.64	261.88 ± 6.53	14894.87 ± 7.94	7778.15 ± 8.60	22.99
60	53.26 ± 9.07	298.56 ± 3.16	8172.88 ± 4.01	4214.03 ± 5.22	12.74
61	24.18 ± 1.35	190.98 ± 6.10	16674.89 ± 1.29	6584.11 ± 3.62	23.47
62	46.10 ± 2.83	305.74 ± 1.97	10991.52 ± 0.85	11478.19 ± 8.25	22.82
63	6.09 ± 5.83	166.61 ± 2.72	12849.86 ± 4.63	4382.20 ± 6.72	17.40
64	20.84 ± 3.77	124.24 ± 6.35	9080.60 ± 3.95	6596.83 ± 3.55	15.82
65	13.37 ± 13.15	136.49 ± 3.57	8946.91 ± 8.27	3484.12 ± 12.96	12.58
66	40.74 ± 12.32	119.71 ± 0.25	8727.61 ± 12.28	3562.58 ± 12.25	12.45
67	73.84 ± 10.09	406.60 ± 14.59	9429.42 ± 11.14	3501.50 ± 10.89	13.41
68	19.63 ± 1.37	186.01 ± 10.17	8242.93 ± 5.70	5097.21 ± 9.15	13.55
69	47.43 ± 14.40	192.41 ± 9.14	8857.70 ± 10.11	5019.37 ± 5.45	14.12
70	35.91 ± 13.07	339.56 ± 2.69	7969.84 ± 5.04	8421.07 ± 8.87	16.77
71	23.99 ± 10.91	143.87 ± 13.07	9252.61 ± 4.18	5601.70 ± 3.47	15.02
72	40.25 ± 1.19	87.03 ± 7.70	7539.25 ± 0.26	2781.34 ± 0.79	10.45
73	31.71 ± 11.87	151.53 ± 4.94	12465.50 ± 1.15	4518.29 ± 2.32	17.17
74	16.43 ± 14.03	70.47 ± 9.20	15956.81 ± 11.18	7039.93 ± 14.19	23.08
75	33.00 ± 7.36	292.36 ± 13.15	15302.95 ± 6.99	8504.21 ± 12.01	24.13
76	32.41 ± 11.80	89.27 ± 10.31	9122.64 ± 7.74	4089.31 ± 4.80	13.33
77	41.71 ± 3.74	134.96 ± 11.23	10858.07 ± 3.79	6455.88 ± 2.05	17.49
78	30.66 ± 6.90	100.67 ± 2.60	9243.96 ± 7.53	3319.91 ± 7.94	12.70

* Results present the mean of isoflavones quantification per population analyzed in triplicate ± Standard Deviation (%).

** Concentration in $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM

*** Concentration in mg g^{-1} of DM

Table 3. Analysis of variance of 78 accessions of red clover core collection. All mean squares were significant at $p \leq 0.05$

Isoflavone	Mean	SD	Population	Error	F
Daidzein	29,21	21,3	1413,47	11,73	120,5
Genistein	163,69	106,87	33811,84	362,24	93,3
Formononetin	11353,29	4745,3	6660180,1	735872,1	90,5
Biochanin A	6568,8	3434,1	35186422,8	254157,1	138,3

Table 4. Average of the four isoflavones contents and total isoflavone for each group

Group	Daidzein	Genistein	Formononetin	Biochanin A	Total
I	94.53	126.13	25679.03	8945.07	34.84
II	30.41	197.81	14703.11	8938.33	23.87
III	23.23	149.31	9529.22	4761.46	14.46
IV	24.43	156.14	1245.53	15543.05	16.97

* Concentration in $\mu\text{g g}^{-1}$ of DM

** Concentration in mg g^{-1} of DM

Table 5. Results for seasonal evaluation for each accession *

PI179146	Daidzein**	Genistein**	Formononetin**	Biochanin A**	Total**
Summer	0,03 ± 11,6a	0,11 ± 0,71a	8,52 ± 4,74a	6,60 ± 12,64a	15,28a
Autumn	0,00b	0,13 ± 2,64a	8,94 ± 11,08a	4,75 ± 10,87b	13,82a
Winter	0,00b	0,20 ± 6,78b	11,26 ± 7,02b	5,76 ± 6,96a	17,22a
Spring	0,00b	0,07 ± 12,02a	7,27 ± 5,65a	5,28 ± 8,79a	12,63a
PI376880	Daidzein**	Genistein**	Formononetin**	Biochanin A**	Total**
Summer	0,02 ± 11,27a	0,09 ± 3,07a	8,85 ± 0,98a	6,11 ± 2,88a	15,07a
Autumn	0,00b	0,25 ± 3,65b	9,99 ± 11,24b	4,65 ± 14,62b	14,90a
Winter	0,00b	0,23 ± 2,63c	13,23 ± 7,36c	2,87 ± 14,13c	16,33a
Spring	0,00b	0,30 ± 3,40b	6,84 ± 7,76b	3,33 ± 5,23c	10,47b
PI419550	Daidzein**	Genistein**	Formononetin**	Biochanin A**	Total**
Summer	0,00a	0,13 ± 5,24a	10,81 ± 9,24a	3,76 ± 8,04a	14,69a
Autumn	0,00a	0,16 ± 7,31b	9,86 ± 4,64a	2,52 ± 4,66b	12,54b
Winter	0,00a	0,26 ± 1,02c	10,12 ± 4,51a	2,94 ± 2,34bc	13,33ab
Spring	0,05 ± 4,36b	0,06 ± 8,30d	9,22 ± 2,41a	3,27 ± 1,88c	12,60b

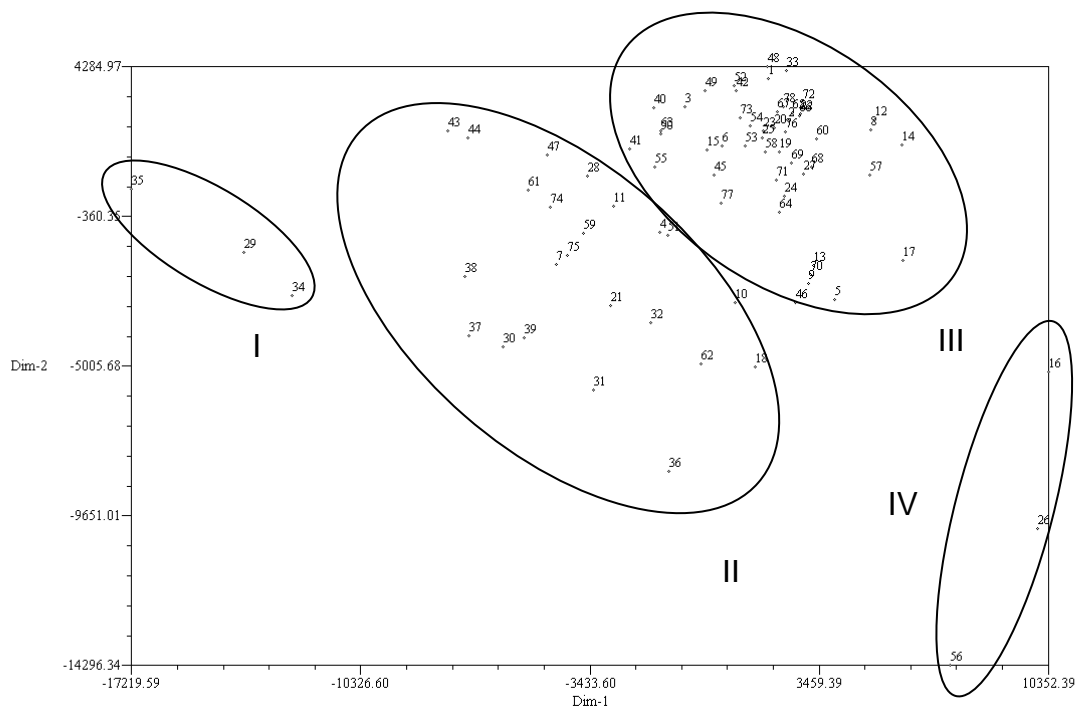
* Results present the mean of isoflavones quantification per population analyzed in triplicate ± Standard Deviation (%)

** Concentration in mg g⁻¹ of DM, means followed by different letters, are statistically different ($\alpha = 0.05$)

Table 6. Analysis of variance for total isoflavone concentration in seasonal evaluation for each accession

PI179146					
Source of variation	D.F.	SS	MS	F	Prob.>F
Between	3	35.15	11.72	7.83	0.01
Within	8	11.98	1.50		
Total	11	47.13			
PI376880					
Source of variation	D.F.	SS	MS	F	Prob.>F
Between	3	66.93	22.31	17.67	0.00
Within	8	10.10	1.26		
Total	11	77.03			
PI419550					
Source of variation	D.F.	SS	MS	F	Prob.>F
Between	3	9.07	3.02	4.93	0.03
Within	8	4.91	0.61		
Total	11	13.98			

Figure 1. Two-dimensional representation of the biochemical relationships among 77 red clover accessions from the U.S. National Germplasm System core collection and one population cultivated in Brazil. The first two dimensions are responsible for 99.96% of the variation.



9.4 Anexo 4: Artigo submetido à Revista Planta Medica

ScholarOne Manuscripts - Mozilla Firefox

Arquivo Editar Exibir Histórico Favoritos Ferramentas Ajuda

http://mc.manuscriptcentral.com/plamed

Mais visitados Correio :: Caixa de Entr... Guia rápido Correio :: Caixa de Entr... Últimas notícias

Website da Faculdade de Far... ScienceDirect - Search Results... Thieme: Fachzeitschriften: Pla... ScholarOne Manuscripts Programa de Pós-Graduação...

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | Get Help Now

Planta Medica Thieme SCHOLARONE Manuscripts

Main Menu → Corresponding Author Dashboard → Submission Confirmation

You are logged in as José Silveira Zuanazzi

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Planta Medica*.

Manuscript ID: PLAMED-2010-01-0080-OP

Title: In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of red clover (*Trifolium pratense* L.) dry extract

Authors: Ramos, Grazielle
Apel, Miriam de Moraes, Claudia
Ceoloto, Paula
Schapoval, Elfrides Eva
Dall'Agnol, Miguel
Silveira Zuanazzi, José

Date Submitted: 26-Jan-2010

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) · [ScholarOne Privacy Policy](#) · [Get Help Now](#)

Concluído

ScholarOne Manus... science (objeto appl... Zuanazzi - coleta 20... Planta Medica

PT 18:28

Original Paper

In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of red clover (*Trifolium pratense* L.) dry extract

Graziele Pereira Ramos¹, Miriam Anders Apel¹, Cláudia Borges de Moraes¹, Paula Casagrande Ceolato¹, Elfrides Eva Scherman Schapoval¹, Miguel Dall'Agnol², José Angelo Silveira Zuanazzi¹

Affiliation

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brazil;

² Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brazil.

Correspondence

Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, CEP 90.610-000, Porto Alegre (RS), Brazil; E-mail: zuanazzi@farmacia.ufrgs.br; Phone: +55 51 3308 5450; fax: +55 51 3308 5437.

Abstract

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is one of the most utilized legume forage in the world agriculture and contains four glycosides, mainly formononetin and biochanin A, and in smaller concentrations, daidzein and genistein. These compounds have gained a lot interest due to its human health benefits, such as estrogenic and progestogenic activities, antioxidant, anti-cancer and others. The objective of this study was to determine *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of red clover dry extract. The *in vitro* anti-inflammatory activity was assayed by the technique using the Boyden chamber method, evaluating the leukocyte migration inhibition, a process named chemotaxis. The *in vivo* anti-inflammatory activity was tested by a carrageenan-induced rat paw edema test. The results of anti-inflammatory *in vitro* test showed that there was a significant inhibition of leukocyte migration at the concentrations of 100.0 (94.73% of inhibition), 50.0 (95.39% of inhibition), 25.0 (94.73% of inhibition), 10.0 (84.68% of inhibition) and 5.0 (78.75% of inhibition) µg/mL of red clover dry extract. The anti-inflammatory *in vivo* test resulted in a significant activity in both tested doses (100 and 50 mg/kg of red clover dry extract) and in each tested time (1, 2, 3 and 4 hours after the phlogistic agent injection). The average percentage of edema inhibition was 63.37%, and presented a dose-dependency test. The findings of this study suggest that the red clover extract might be suitable for the treatment of inflammatory diseases.

Keywords

Trifolium pratense, isoflavones, anti-inflammatory, chemotaxis, leukocyte migration, rat paw edema

Introduction

Trifolium pratense L. (red clover) is one of several botanical dietary supplements that is being marketed for use in alleviation of hot flashes and other menopausal symptoms [1].

Animal studies, clinical trials and epidemiologic observations suggest a potential of dietary phytoestrogens in the prevention of “Western Diseases” (e.g. atherosclerosis, cardiovascular diseases, osteoporosis, different kind of cancer) [2-3]. Isoflavones, such as daidzein, genistein, formononetin and biochanin A, are the most important group of phytoestrogens. These compounds occur in soy, soy products, kudzu and red clover [2]. Due to the reported beneficial health effects of phytoestrogens the demand for food supplements rich in isoflavones is strongly increasing [4].

Red clover contains mainly glycosides of genins of the isoflavones formononetin and biochanin A and has gained a lot of interest. In humans these glycosides are hydrolyzed and resulting formononetin and biochanin A, which are metabolized to daidzein and genistein [4] (Fig. 1).

Many new drugs derived from plant secondary metabolites have been applied for the treatment and/or prevention of various diseases. Investigations about natural products have recently regained prominence with the increasing of understanding of their biological significance and increasing recognition of their origin and structural diversity. Most clinically important medicines are steroidal or non-steroidal anti-inflammatory chemical therapeutics for treatment of inflammation-related diseases. Though these have potent activity, long-term administration is required for treatment of chronic disease. Furthermore, these drugs have various and severe adverse effects. Therefore, naturally occurring agents, with high effectiveness and very few side-effects, are desirable as substitutes for chemical therapeutics [5].

Inflammation is a basic pathological mechanism that underlies in a variety of diseases. The inflammatory reaction involves complex interactions between inflammatory cells

neutrophils, lymphocytes, and monocytes/macrophages) and vascular cells (endothelial and smooth muscle cells), and the role of the vascular cells during the inflammatory process is well established [6].

Acute rat paw inflammation is characterized by migration of inflammatory cells into the microvascular system and fluid entering the interstitial tissue. These events are induced by inflammatory mediators which bind to specific receptors on inflammatory and endothelial cells [7-8].

Chemotaxis is the phenomenon in which the direction of a cell's locomotion is determined by an extracellular gradient of chemicals and plays a critical role in many diverse physiological processes, including the recruitment of leukocytes to sites of infection, trafficking of lymphocytes throughout the human body, and patterning of neuronal cells in the developing nervous system. Because of the essential roles of chemotaxis in development and physiology, improperly guided cell movements can cause diverse pathological conditions, including tumor growth, cancer metastasis and inflammatory diseases, such as asthma, arthritis and atherosclerosis [9-11].

In this study, the red clover dry extract anti-inflammatory effects were investigated *in vitro*, by the inhibition of leukocyte chemotaxis, employing a modified Boyden chamber, and *in vivo*, with carragenan-induced paw edema in rats model.

Materials and Methods

Plant material

Seeds from red clover (population Nova Santana) were planted in an experimental field at Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil (30°05'02" S, 51°36'58" W and elevation 40 m). Leaves from these plants were harvested after 5 months.

Dry extract preparation

The dry extract was obtained from dried red clover leaves that were macerated three times with ethanol 40%, and after the ethanolic extract was separated with dichloromethane and then the solvent was evaporated and resuspended with water: ethanol (95:5, v:v). After that, this solution was frozen and lyophilized. The isoflavones from dry extract were quantified by a previously validated method by our group [12].

Animals

Male Wistar rats (180-220 g) were obtained from Breeding Laboratory, UFRGS, Brazil. The animals were housed five per cage in a room with controlled temperature with free access to food and water. This study was approved by the Ethical Comitee from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol number: 2007723).

Anti-inflammatory activities

Chemotactic migration

Chemotactic migration was measured by the method described previously by Zigmond and Hirsch [13]. Prior to the chemotactic assay, red clover dry extracts was dissolved in rat leukocytes solution to obtain de concentrations of 100, 50, 25.00, 10 and 5 µg/mL, and

incubated at 37 °C for 1 h. Plasma collected from rats was incubated at 37 °C for 30 min with 65 µg/ml of LPS (lipopolysaccharide from *Escherichia coli*), the plasma was diluted in Hanks buffer at 20% concentration (v/v).

Chemotactic migration of leukocytes through an 8 µm nitrocellulose filter, towards the chemotactic stimulant (LPS treated plasma), was measured, after incubation for 1 h at 37 °C, using the micrometer on the fine-focus knob of the microscope. The distance from the top of the filter to the farthest plane of focus still containing two cells, in five microscopic fields, allowed the evaluation of leukocyte migration. All experiment was carried out in duplicate.

Carrageenan-induced paw edema in rats

Anti-inflammatory activity was evaluated by the carrageenan-induced rat paw oedema test, as described by Winter *et al.* [14]. Red clover dry extract was resuspended in saline, resulting a suspension, that was administered orally 1 h before subplantar injection of carrageenan (0.1 mL of a suspension at 5 mg/mL) using a single dose of 100 and 50 mg/kg body weight for each group of samples. The control group received equivalent volumes of the vehicle.

Male Wistar rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) and injected subplantarly into one of the hind paws with 0.1 ml of 0.5% λ-carrageenan type IV solution in isotonic saline (Sigma chemical Co., St. Louis, MO). The contralateral paw was injected with 0.1 ml saline solution and used as control. Edema was measured using a digital plethysmometer Ugo Basile (model 7140, Italy) at 1, 2, 3 and 4 h after carrageenan injection. Edema volume was expressed for each animal as the percentage change in rat paw volume after carrageenan injection, compared with placebo group.

The activity was compared with the effect of indomethacin administration (10 mg/kg, p.o.; Sigma Chemical Co.).

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM, and were tested for significance using Student's *t*-test. Probability values (*P*) of less than 0.05 were taken to indicate statistical significance.

Results and Discussion

Dry extract analysis

The red clover dry extract was analyzed, by a HPLC method previously validated by our group for the quantification of isoflavones [12], and this analysis revealed that this dry extract had 200 mg/g of isoflavones (sum of concentration of daidzein, genistein, formononetin and biochanin A).

Chemotactic migration assay

In the *in vitro* anti-inflammatory model, red clover dry extract was tested using the Boyden chamber method [13], which is based on a chamber that has two compartments filled and separated by a microporous membrane. This assay simulated the chemotaxis of the leukocytes toward to chemotactic agent. After the appropriate incubation time, the membrane between the two compartments is fixed and stained, and the number of cells that migrated to the lower portion, in which is the LSP, is determined with a microscope.

Neutrophils are highly specialized leukocytes that play an important role in innate immunity and are the main kind of leukocytes present in the acute phase of the inflammation. During an infection or damage tissue, neutrophils respond to inflammatory and chemoattractant factors by their migration through the microvascular endothelium, extracellular matrix and mucosal epithelium at inflammatory sites [15].

The inhibition of chemotaxis test assay the effectiveness of the sample compared to a situation of an induced inflammation outside the body of a living being, where the action of the sample is directly on isolated leukocytes. Through our results we could verify the inhibition of leukocyte migration in all the tested concentrations (5 to 100 µg/mL) of red clover dry extract (Table 1). The mean and the standard error were calculated and the data were statistically analyzed by ANOVA (analysis of variance), followed by Student's t-test, using confidence interval of 95%.

The neutrophils treatment with 100.0, 50.0, 25.0, 10.0 and 5.0 µg/mL of red clover dry extract, reduced at all doses, significantly ($p \leq 0.001$) the migration of them through chamber filled with plasma treated with LPS, the percentage of inhibition for the doses described above were, respectively, 94.73, 95.39, 94.73, 84.68, 78.75% (Table 1), when compared to the control. When the doses are compare between then, is possible to observe that there was a significant difference ($p \leq 0.001$) between all doses compared with the doses of 5 and 10 µg/mL, no significant differences were found between the doses of 100, 50 and 25 µg/mL. Thus, there is no need to use doses higher than 25 µg/mL.

Carrageenan-induced paw edema in rats assay

The results of the oral administration of the red clover dry extract suspension for the inhibition of rat paw edema induced by carrageenan are shown in the Table 2. The results for the rat paw edema are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The mean and standard error were calculated and the data were statistically analyzed by ANOVA (analysis of variance), followed by Student's t-test using a confidence interval of 95%.

The red clover dry extract is composed of approximately 200 mg of isoflavones per gram of dry extract. The Table 2 presents the results obtained from the oral administration of a suspension in water of the dry extract of red clover in relation to the negative control and

indomethacin (positive control). It can be observed that the extract showed significant antiedematogenic activity, within the first hour after the suspension administration for both tested doses. The dose of 100 mg/kg after two hours showed a significant difference when compared to indomethacin. Two hours after administration of doses is also possible to observe difference between doses. It can be also observed that the extract showed significant antiedematogenic activity at all doses and times tested, and represented a dose-dependency test.

Considering that the red clover dry extract, used for the preparation of the suspension is constituted mainly by isoflavones aglycones, it is suggested that the demonstrated activity is related to these compounds, or the synergism of these main compounds among them or with other present in lower concentrations.

The antiedematogenic activity after the first hour of dosing the extract can be explained by the fact that the absorption of the aglycones is quick and extensive [16-17].

The anti-inflammatory activity related to flavonoids is well known and studied. This activity is primarily due to inhibition of some enzymes involved in inflammation and/or the cellular signaling pathways such as cyclooxygenase (COX) where some flavonoids, act by inhibiting the COX and 5-lipoxygenase enzymes [18].

Through the results analyzed, the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activities highlighted the anti-inflammatory activity of red clover dry extract. So, the findings of this study suggest that more research in this area should be developed, because the results were promising.

Acknowledgements

We are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the fellowship support.

References

- ¹ *Mu H, Bai YH, Wang ST, Zhu ZM, Zhang YW.* Research on antioxidant effects and estrogenic effects of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). *Phytomedicine* 2009; 16: 314-319.
- ² *Cornwell T, Cohick W, Raskin I.* Dietary phytoestrogens and health. *Phytomedicine* 2004; 65: 995-1016.
- ³ *Geller SE, Studee L.* Soy and red clover for mid-life and ageing. *Climacteric* 2006; 9: 245-263.
- ⁴ *Krenn L, Paper DH.* Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine* 2009; 16: 1083-1088.
- ⁵ *Menichini F, Conforti F, Rigano D, Formisato C, Piozzi F, Senatore F.* Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumor activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chem* 2009; 115: 679-686.
- ⁶ *Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MAC, Bjordal JM, Alves LP, Munin E, Costa MS.* Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2007; 89: 50–55.
- ⁷ *Doerschuk CM, Mizgerd JP, Kubo H, Qin L, Kumasaka T.* Adhesion molecules and cellular biomechanical changes in acute lung injury. *Giles F. Filley Lecture* 1999; *Chest* 116 (Suppl. 1): 37S–43S.
- ⁸ *Saito H, Lai J, Rogers R, Doerschuk CM.* Mechanical properties of rat bone marrow and circulating neutrophils and their responses to inflammatory mediators. *Blood* 2002; 99: 2207–2213.

- ⁹ Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K, Saiki I. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci* 2007; 98: 1652-1658.
- ¹⁰ Liehn EA, Zerneck A, Postea O, Weber C. Chemokines: inflammatory mediators of atherosclerosis. *Arch Physiol Biochem* 2006; 112: 229-238.
- ¹¹ Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007; 86: 306-319.
- ¹² Ramos GP, Dias PMB, Morais CB, Fröhlich PE, Dall'Agnol M, Zuanazzi JAS. LC determination of four isoflavone aglycones in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Chromatographia* 2008; 67: 125-129.
- ¹³ Zigmond SH, Hirsch JG. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med* 1973; 137: 387-410.
- ¹⁴ Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111: 244-247.
- ¹⁵ Liu Y, Shaw SK, Ma S, Yang L, Luscinskas FW, Parkos CA. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *J Immunol* 2004; 172: 7-13.
- ¹⁶ Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 2000; 130: 1695-1699.
- ¹⁷ Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *J Ste Biochem Mol Biol* 2005; 94: 499-518.

¹⁸ *Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. Exp Tox Pathol 2003; 54: 313-318.*

Figure 1. Chemical structure of red clover isoflavones

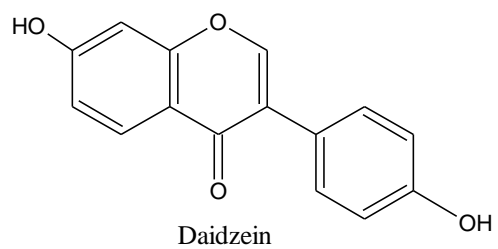
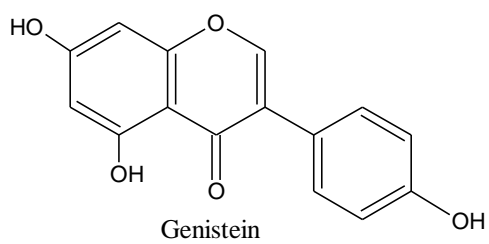
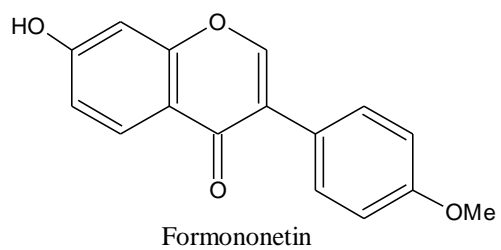
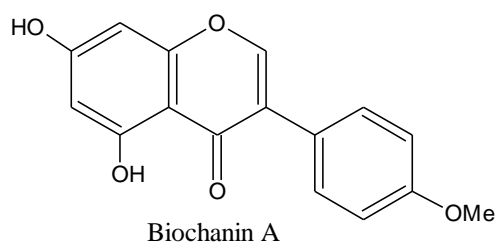


Table 1. *In vitro* chemotaxis migration of neutrophils treated with red clover dry extract

Sample	Migrated distance (μm) \pm SEM	% inhibition
Control	121.4 \pm 1.90	0
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6.4 \pm 1.84*	94.73
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5.6 \pm 1.58*	95.39
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6.4 \pm 1.58*	94.73
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	18.6 \pm 2.74*# ⁺ ^a	84.68
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25.8 \pm 2.74*# ⁺ ^{ab}	78.75

* $p \leq 0.001$ compared to control

+ $p \leq 0.001$ compared to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose

$p \leq 0.001$ compared to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose

^a $p \leq 0.001$ compared to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose

^b $p \leq 0.001$ compared to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose

Table 2. Effect of red clover dry extract orally administrated on carrageenan-induced rat paw edema (n= 7 animals)

Treatment	Mean edema size (mL) \pm SEM (% inhibition)			
	1h	2h	3h	4h
Control	1.46 \pm 0.23	1.64 \pm 0.27	2.27 \pm 0.10	1.98 \pm 0.20
Indomethacin (10 mg/kg)	0.732 \pm 0.23** (50%)	0.997 \pm 0.22** (40%)	0.864 \pm 0.22* (62%)	0.604 \pm 0.13* (70%)
Red Clover (50 mg/kg)	0.655 \pm 0.13* (55%)	0.754 \pm 0.11** (54%)	0.770 \pm 0.07* (66%)	0.960 \pm 0.18* (51%)
Red Clover (100 mg/kg)	0.474 \pm 0.09* (68%)	0.431 \pm 0.08*##+ (74%)	0.672 \pm 0.15* (70%)	0.625 \pm 0.12* (69%)

*p \leq 0.001 compared to control

**p \leq 0.01 compared to control

p \leq 0.05 compared to indomethacin

+ p \leq 0.05 between doses