

---

---

## DETERMINAÇÃO DE GENISTEÍNA E GENISTINA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VISÍVEL EM EXTRATOS SECOS DE SOJA UTILIZADOS COMO MATÉRIA-PRIMA EM FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO

### DETERMINATION OF GENISTEIN AND GENISTIN BY UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER IN DRY EXTRACTS OF SOYBEAN AS A RAW MATERIAL USED IN COMPOUNDING PHARMACIES

Candida Nissola<sup>1</sup>, Bianca Hess<sup>2</sup>, Thais Guimarães de Francisco<sup>2</sup>, João Cleverson Gasparetto<sup>2</sup>, Francinete Ramos Campos<sup>3</sup>, Roberto Pontarolo<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>Especialista em Farmácia Magistral do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR.

<sup>2</sup>Alunos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR.

<sup>3</sup>Professora Visitante no Departamento de Farmácia da UFPR.

<sup>4</sup>Professor Associado do Departamento de Farmácia da UFPR.  
pontarolo@ufpr.br

REC: 03/2010 AC: 04/2010

#### RESUMO:

As isoflavonas são predominantemente encontradas em leguminosas e mais abundantes na soja. Estas são fitoestrógenos que mimetizam a ação do estradiol, porém com menor intensidade e tem sido utilizadas principalmente na terapia de reposição hormonal. Genisteína, daidzeína e gliciteína são as agliconas mais abundantes nos extratos de soja, ocorrendo também como glicosídeos. Neste contexto, a genisteína é considerada a isoflavona com maior atividade estrogênica, sendo que sua quantidade pode variar devido à influência de diversos fatores. Portanto, sua determinação em extratos de soja é importante uma vez que o conteúdo individual de isoflavonas pode ter implicações na atividade biológica. No presente trabalho foi avaliado o teor de genisteína+genistina em dez amostras de extratos secos de soja utilizados como matéria-prima em farmácias de manipulação. O método utilizado foi o doseamento por UV-VIS após reação com cloreto de alumínio. Os resultados demonstraram que há uma considerável variação na concentração de genisteína+genistina entre os diferentes lotes de extrato seco e que 62,5% das amostras apresentaram teores aproximados dos valores declarados nos certificados de análises, demonstrando a necessidade de padronização de isoflavonas individuais nestas matérias-primas. O método utilizado se mostrou simples e rápido para a avaliação dos teores de genisteína+genistina de extratos secos de soja comercializados em farmácias de manipulação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Isoflavonas, UV-VIS, Genisteína, Genistina, Extrato seco de soja.

#### ABSTRACT:

Isoflavones are found predominantly in Leguminosae and most abundant in soybeans. The isoflavones are phytoestrogens that mimic the estradiol action, but with less intensity and have been mainly used in hormone replacement therapy. Genistein, daidzein and glycitein are the most abundant aglycones found in soy extracts and also occur as glycosides. In this context, the isoflavone genistein is considered the highest estrogenic activity, and its amount can vary due to the influence of several factors. Therefore, its determination in soy extracts is important because the individual isoflavones content may have biological activity implications. The present study evaluated the genistein+genistin amounts in ten dry soy extract samples used as raw material in compounding pharmacies. The method used for its

determination was UV-VIS after reaction with aluminum chloride. The results showed that there was considerable variation in the genistein+genistin concentration between the samples and 62,5% of them presented approximate levels from those declared in the analysis certificate. Therefore, there is a need of standardization of individual isoflavones in these materials. The method proved to be simple and rapid for the genistein+genistin assessment in dry soy extracts sold in compounding pharmacies.

**KEY WORDS:** Isoflavones, UV-VIS, Genistein, Genistin, Dry soy extract.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fitoestrógenos são compostos não-esteroidais de origem natural encontrados nas plantas. As isoflavonas (também chamadas de isoflavonóides) são as formas mais comuns de fitoestrógenos, possuem estrutura química semelhante ao estradiol e desta forma apresentam a habilidade de mimetizar a ação dos estrógenos (HARON et al., 2009). São predominantemente encontradas em leguminosas e mais abundantes na soja (*Glycine max* L.) (ESTEVES; MONTEIRO, 2001; GENOVESE; LAJOLO, 2001; TORREZAN et al., 2008).

As isoflavonas encontram-se na forma glicosilada na natureza, biologicamente inativas. Após ingestão, ocorre um complexo mecanismo enzimático de conversão no trato gastrointestinal, resultando na formação de fenóis heterocíclicos estruturalmente similares ao 17- $\beta$ -estradiol (RODRIGUES, 2006).

As principais isoflavonas encontradas na soja são as agliconas daidzeína, a genisteína, e a gliciteína, ocorrendo também na forma de glicosídeos denominados daidzina, genistina e glicitina (DUNCAN; PHIPPS; KURZER, 2003). As concentrações de isoflavonas na soja são variáveis, dependendo da qualidade do grão, das condições de crescimento, do solo e do processamento (GÓES-FAVONI et al., 2004).

Os efeitos das isoflavonas variam de acordo com o tipo de tecido, dependendo da afinidade por receptores específicos (ANDERSON; GARNER, 1997; YE; CHAN; LEUNG, 2009). Em um trabalho de revisão Ferrari e Demiate (2001) abordaram os efeitos de fitoestrogênios sobre tecidos animais, destacando a capacidade desses compostos em melhorar a saúde humana principalmente por protegerem o organismo contra certas doenças crônicas. Dados epidemiológicos mostram que o grande consumo de soja e seus derivados por populações orientais como a China e Japão poderia ser um fator determinante na baixa incidência de doenças, como alguns tipos de câncer (mama, próstata e colo), doenças cardiovasculares, osteoporose e sintomas da menopausa (HAN et al., 2002; PENHA et al., 2007).

No Brasil, a grande maioria das farmácias magistrais, manipula cápsulas gelatinosas duras contendo extrato seco de soja padronizado para conter 40% de isoflavonas totais, sem considerar o teor e o tipo de isoflavona individual existente na matéria-prima. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a genisteína apresenta maior atividade estrogênica em relação às demais isoflavonas. Dessa forma, as variações no conteúdo individual de isoflavonas podem ter implicações na atividade biológica e conseqüentemente, influenciar diretamente no efeito esperado após a administração oral de formas farmacêuticas contendo extrato seco de soja (CÉSAR, 2008; YANO, 2006).

Nesse sentido, devido ao fato de não existir uma padronização dos teores in-

dividuais de isoflavonas nas matérias-primas fornecidas para as farmácias de manipulação, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade dos teores de genisteína+genistina em extratos secos de soja comercializados em farmácias de manipulação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 REAGENTES**

O padrão de referência de genisteína foi obtido da Chromadex (Santa Ana, CA, EUA); Metanol (grau CLAE) foi adquirido da J. T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Netherlands), enquanto que o cloreto de alumínio,  $\text{AlCl}_3$  (grau analítico) foi obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

Foram obtidos no comércio local de Joinville/SC, dez lotes de extratos secos de soja padronizados para conter 40% de isoflavonas totais de diferentes fornecedores (n=7) com os respectivos certificados de análise.

### **2.3 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO**

O método empregado para as análises dos extratos secos de soja foi o desenvolvido por César (2008). Dessa forma foi preparada uma triplicata da solução padrão de ginesteína na concentração de  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo estas diluídas em metanol nas concentrações de 1,5; 6; 18; 30; 42 e  $54 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida, 1 mL de uma solução metanólica a 2% (m/v) de  $\text{AlCl}_3$  foi adicionada em cada solução.

### **2.4 PREPARO DO BRANCO E DAS AMOSTRAS**

Para o preparo das amostras cerca de 100 mg do extrato seco de soja foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida foram adicionados 20 mL de metanol e a mistura submetida a banho de ultra-som por 10 minutos. O volume foi completado com o mesmo solvente e filtrado. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi colocada em um balão de 25 mL contendo 1,0 mL de uma solução metanólica a 2% (m/v) de  $\text{AlCl}_3$ , sendo o volume completado com metanol. O branco foi preparado de forma similar, no entanto sem a adição de  $\text{AlCl}_3$ .

### **2.5 INSTRUMENTAL**

As análises foram realizadas em um espectrofotômetro UV-VIS da Agilent modelo 8453. Os espectros foram registrados na faixa de 200 a 500 nm, sendo a determinação de genisteína+genistina realizada após 20 minutos do preparo das soluções, no comprimento de onda de 382 nm, indicativo da formação do complexo das isoflavonas com o  $\text{AlCl}_3$ . Os teores de genisteína+genistina (expressos como genisteína) foram determinados em relação à curva de calibração.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos secos de soja utilizados como matéria-prima nas farmácias de manipulação são padronizados para conter no mínimo 40% de isoflavonas totais, não sendo padronizada a quantidade e o tipo de cada isoflavona (CLAPAUCH et al., 2002). Neste contexto, a genisteína é considerada como sendo a isoflavona com maior atividade biológica dentre as demais, quando comparada aos efeitos do 17- $\beta$ - estradiol (DIXON; FERREIRA, 2002). Portanto seu conteúdo nos extratos é de grande relevância no contexto farmacológico e através de sua determinação é possível prever um maior ou menor efeito terapêutico. Neste sentido, foram realizadas análises de doseamento de genisteína (genisteína+genistina) por UV-VIS em amostras de extrato seco de soja utilizadas como matérias-primas em farmácias de manipulação.

Conforme observado na Tabela 1, duas das 10 amostras selecionadas para o estudo continham apenas a informação da concentração total de isoflavonas declaradas no certificado de análise do fornecedor, sem mencionar as concentrações de genisteína+genistina, não sendo, portanto possível fazer uma comparação direta com essas amostras. Sendo assim, 62,5% das amostras apresentaram teores de genisteína+genistina próximos aos valores declarados nos laudos dos fornecedores (amostras 2, 3, 5, 6 e 7).

Tabela 1: Teor de isoflavonas totais e individuais declaradas nos certificados de análise e teores de genisteína+genistina obtidos por UV-VIS.

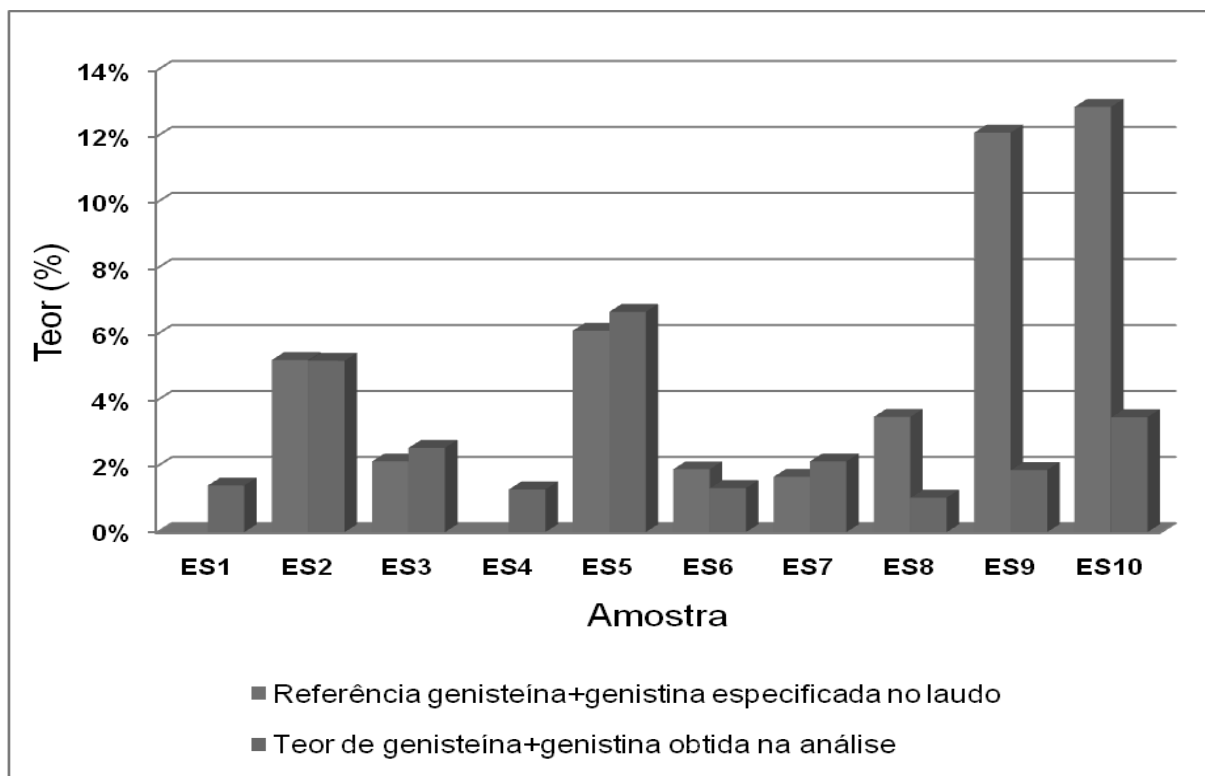
Amostra	Massa utilizada (mg)	Tomada final da amostra ( $\mu$ g/ml)	Teor obtido de genisteína* ( $\mu$ g/ml)	Teor obtido de genisteína* (%)	Teor de genisteína declarado*.** (%)	Isoflavonas totais declarado** (%)
1	100,0	800,0	11,34	1,41	Não declarado	40,6
2	100,6	804,8	41,81	5,19	5,21	42,1
3	100,6	804,8	20,58	2,55	2,14	41,9
4	100,3	802,4	10,36	1,29	Não declarado	42,0
5	100,1	800,8	42,78	6,67	6,10	41,8
6	100,1	800,8	10,70	1,33	1,90	52,6
7	99,9	799,2	17,15	2,14	1,67	41,9
8	101,4	811,2	8,46	1,04	3,49	42,5
9	100,3	802,4	15,12	1,88	12,10	40,6
10	100,9	807,2	11,25	3,48	12,88	47,3

\*Expresso como genisteína+genistina; \*\*conteúdo declarado no laudo do fornecedor.

No Gráfico 1, pode-se observar que as amostras 8, 9 e 10 apresentaram concentrações de genisteína+genistina bastantes discrepantes quando comparadas aos valores declarados nos laudos. Estes resultados sugerem falta de controle de qualidade para estes extratos o que pode comprometer a atividade farmacológica espe-

desde a coleta dos grãos de soja até a obtenção do extrato seco, os quais podem influenciar na concentração e no tipo de isoflavona presente na matéria prima (CARRÃO-PANIZZI; GOÉS-FAVONI; KIKUCHI, 2002; DUNCAN; PHIPPS; KURZER, 2003, GENOVESE et al., 2003).

Gráfico 1: Comparação entre os teores de genisteína+genistina declarados nos certificados de análise com os obtidos por UV-VIS.



**NOTA: ES = extrato seco TESTES *IN VITRO* E *IN VIVO* UTILIZADOS NA TRIAGEM**

Devido a dificuldade e infra-estrutura adequada, a grande maioria das farmácias de manipulação terceiriza as análises de doseamento destas matérias-primas, porém a metodologia utilizada nestas análises geralmente compreende apenas a determinação de isoflavonas totais. Portanto, é necessária uma padronização dos extratos utilizados bem como um controle de qualidade mais rigoroso em relação à composição das isoflavonas individuais presentes nos mesmos, garantindo, desta forma, uma maior eficácia terapêutica do medicamento manipulado.

#### 4. CONCLUSÃO

As análises dos extratos secos de soja através de UV-VIS após reação com AICI demonstraram que há uma grande variação no conteúdo de isoflavonas genisteína+genistina nas amostras, havendo assim a falta de reprodutibilidade na for-

mulação e conseqüentemente da eficácia terapêutica. Desta forma, fica evidenciada a importância da padronização destas substâncias nas matérias-primas utilizadas em farmácias de manipulação.

O método por UV-VIS se mostrou simples e rápido no doseamento de genisteína+genistina, e pode ser uma opção para a implantação deste na rotina de controle de qualidade em farmácias de manipulação ou de laboratórios terceirizados que não realizam este tipo de doseamento.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, J. J. B.; GARNER, S. C. The effects of phytoestrogens on bone. **Nutr. Res.**, Chapel Hill, v. 17, n. 10, p. 1617- 1632, 1997.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; GOÉS-FAVONI, S. P. de; KIKUCHI, A. Extraction time for soybean isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, p. 515-518, 2002.

CÉSAR, I. C. et al. Quantitation of genistein and genistin in soy dry extracts by uv-visible spectrophotometric method. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1933-1936, 2008.

CLAPAUCH, R. et al. Fitoestrogênios: posicionamento do departamento de endocrinologia feminina da sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205-211, 2002.

DUNCAN, A. M.; PHIPPS, W. R.; KURZER, M. S. Phyto-oestrogens. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 17, p. 253-271, 2003.

ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.

FERRARI, R. A.; DEMIATE, I. M. Isoflavonas de soja- uma breve revisão. **Biological and Health Sciences**, Los Altos Hills, v. 7, n. 1, p. 39-46, 2001.

GÓES-FAVONI, S. P. et al. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, n. 4, p.582-586, 2004.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 1, p.86-93, 2001.

GENOVESE, M.I. et al. Avaliação do teor de isoflavonas de “suplementos nutricionais à base de soja”. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 159-167, 2003.

HARON, H. et al. Daidzein and genestein contents in tempeh and selected soy products. **Food Chemistry**, London, v. 115, p. 1350-1356, 2009.

HAN, K.K. et al. Efeitos dos fitoestrogênios sobre alguns parâmetros clínicos e laboratoriais no climatério. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 8, p. 547-552, 2002.

PENHA, L. A. O. et al. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 91-102, 2007.

TORREZAN, R. et al. O tratamento com isoflavonas mimetiza a ação do estradiol no acúmulo de gordura em ratas ovariectomizadas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n. 9, p.1489-1496, 2008.

RODRIGUES, E. T. **Avaliação do efeito da isoflavona sobre o epitélio cérvico-vaginal e sintomas da menopausa**. São Paulo, Dissertação (Mestrado em Biociências aplicadas à Farmácia), 2006, Universidade de São Paulo.

YANO, H. M. **Determinação de isoflavonas em formulações farmacêuticas**. São Paulo, Dissertação (Doutorado em Fármaco e Medicamentos), 2006, Universidade de São Paulo.

YE, L.; CHAN, M.; LEUNG, L. K. The soy isoflavona genisteína induces estrogen synthesis in an extragonal pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 302, p. 73-80, 2009.