

Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Isabela da Costa César, Fernão Castro Braga, Cristina Duarte Vianna-Soares, Elzília de Aguiar Nunan, Thiago Assis Franco Barbosa, Ligia Maria Moreira-Campos*

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

RESUMO: A utilização de produtos naturais e suplementos contendo extratos secos de isoflavonas aumentou na última década, devido, principalmente, aos efeitos benéficos atribuídos a estes compostos no alívio dos sintomas da menopausa. Genisteína, daidzeína e gliciteína são as agliconas mais abundantes nos extratos de soja, ocorrendo também como glicosídeos. Tendo em vista seus usos, não existe ainda na literatura uma definição da quantidade mínima de cada uma das agliconas que os extratos ou cápsulas de isoflavonas devem ter, e também não existe um método oficial para o controle de qualidade dos mesmos. O presente trabalho apresenta um método por CCD para análise qualitativa das três agliconas e de seus glicosídeos em extratos e cápsulas de isoflavonas, antes e após hidrólise ácida. A análise quantitativa das cápsulas de isoflavonas, realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), revelou grandes variações nos teores das três agliconas, após hidrólise ácida. Os teores variaram da seguinte forma, nos 18 lotes de cápsulas avaliados: daidzeína (13,34 a 76,20 mg/cápsula), genisteína (0,61 a 27,18 mg/cápsula) e gliciteína (0,49 a 8,80 mg/cápsula).

Unitermos: Isoflavonas, genisteína, daidzeína, gliciteína, CCD, CLAE.

ABSTRACT: "Determination of daidzein, genistein and glycitein in isoflavone capsules by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC)". The use of herbal products and supplements based on isoflavone dry extracts has increased considerably in the last decade, mainly due to beneficial effects to relief of the menopausal symptoms credited to those compounds. Genistein, daidzein and glycitein are the most abundant isoflavone aglycones found in soy extract, where they also occur as glycosides. Concerning their uses, there is neither standardization regarding the minimum content of each aglycone in the extracts or capsules, nor an official method to the quality control of these products. The present work presents a TLC method for qualitative analysis of the three aglycones and their glycosides in extracts and capsules of isoflavones, before and after acid hydrolysis. The quantitative analysis of the isoflavone capsules, carried out by high performance liquid chromatography (HPLC), showed high variation in the content of the three aglycones, after acid hydrolysis. The contents varied in the following way, in the 18 batches of evaluated capsules: daidzein (13.34 to 76.20 mg/capsule), genistein (0.61 to 27.18 mg/capsule) and glycitein (0.49 to 8.80 mg/capsule).

Keywords: Isoflavones, genistein, daidzein, glycitein, TLC, HPLC.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os fitoestrógenos têm sido alvo de vários estudos, devido à sua possível atividade estrogênica (Anderson et al., 1999). As isoflavonas são os fitoestrógenos mais comuns, sendo encontradas em abundância nos grãos de soja (*Glycine max* L.) e seus derivados. Daidzeína, genisteína e gliciteína são as isoflavonas presentes em maior proporção na soja, ocorrendo também na forma de glicosídeos, denominados daidzina, genistina e glicitina, respectivamente (Figura

1) (Duncan et al., 2003). Há um crescente interesse no benefício potencial das isoflavonas em vários aspectos da saúde humana, particularmente nas doenças ocidentais e crônicas, como vários tipos de cânceres hormônio-dependentes, doenças cardiovasculares, osteoporose e, principalmente, no alívio dos sintomas relacionados à menopausa (Duncan et al., 2003).

Devido aos efeitos colaterais decorrentes da terapia de reposição hormonal convencional, e à alta incidência dos sintomas indesejáveis associados à menopausa, a manipulação de cápsulas contendo

extratos de isoflavonas e a comercialização de medicamentos e suplementos alimentares à base de soja aumentou vertiginosamente nos últimos anos. Extratos secos de soja, padronizados para conter 40% de isoflavonas totais, são comumente utilizados como matéria-prima farmacêutica, para a produção de cápsulas e comprimidos.

Em 2004, a Resolução RDC n° 48 publicada pela ANVISA dispõe que, para o registro de medicamentos fitoterápicos, é necessário relatório contendo a descrição detalhada de todas as metodologias utilizadas no controle de qualidade, com os métodos analíticos devidamente validados para o medicamento, assim como o resultado da prospecção fitoquímica ou perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG), quando cabível (Brasil, 2004).

Entretanto, os métodos analíticos para identificação e quantificação de isoflavonas encontrados na literatura referem-se, principalmente, à determinação dessas substâncias em matrizes biológicas (Kledjus et al., 2004), grãos de soja (Hutabarat et al., 1998) ou produtos alimentícios (Nurmi et al., 2002), sendo dado pouco enfoque a produtos farmacêuticos. Este fato gera, certamente, heterogeneidade nos procedimentos de análise e nas exigências de controle de qualidade adotados pelos diferentes laboratórios produtores e farmácias magistrais.

A maioria dos métodos descritos na literatura utiliza CLAE para a quantificação de isoflavonas em matrizes diversas (Wang et al., 2002). Para a determinação quantitativa de glicosídeos e agliconas individualmente é necessário dispor de substâncias de referência para cada uma delas, o que implica em alto custo, além de tempos longos de análise e dificuldades inerentes à otimização das condições cromatográficas. Com o objetivo de superar esses inconvenientes, e aumentar a viabilidade e simplicidade das análises, alguns métodos são baseados na quantificação das agliconas liberadas após hidrólise enzimática (Liggins et al., 1998; Thomas et al., 2001), hidrólise ácida (Hutabarat et al., 2000; Mitani et al., 2003; César et al., 2006) ou saponificação (Klump et al., 2001; Johns et al., 2003).

A cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel é uma das técnicas mais utilizadas para a separação e identificação de produtos naturais (Moffat, 1986; Julião et al., 2003; Valente et al., 2006), sendo amplamente empregada para o controle de qualidade analítico de matérias-primas vegetais e fitoterápicos (Budel et al., 2004; Sousa et al., 2007). Embora sejam descritos, na literatura, alguns métodos por CCD para análise de isoflavonas (Mabry et al., 1970; Harbone et al., 1975; Wagner; Blat, 1996), não foram encontradas condições detalhadas para a obtenção de perfis cromatográficos visando a identificação de glicosídeos e agliconas de isoflavonas, em matérias-primas vegetais (extratos de isoflavonas) ou produtos acabados.

No presente trabalho são apresentadas condições de separação por CCD para identificar glicosídeos e agliconas de isoflavonas, permitindo monitorar o processo de hidrólise de extratos secos de soja. Paralelamente, utilizou-se um método por CLAE, previamente desenvolvido e validado pelos autores, para a quantificação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas, após hidrólise ácida. A quantificação teve como objetivo investigar o grau de variação dos teores das três agliconas em cápsulas de isoflavonas comercializadas atualmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e amostras

Foram utilizados daidzeína, genisteína e gliciteína substâncias químicas de referência da marca Chromadex (Santa Ana, CA, EUA); metanol e ácido acético grau cromatográfico Merck (Darmstadt, Alemanha); etanol, ácido clorídrico, acetato de etila e clorofórmio grau analítico Tedia (Fairfield, OH, EUA) e água purificada em sistema Milli-Q Millipore (Bedford, MA, USA). Três amostras de matérias-primas de extratos secos de isoflavonas (MP1, MP2 e MP3) foram obtidas de fornecedores de matérias-primas farmacêuticas (Galena e Deg). Amostras de cápsulas de isoflavonas (CAP01 a CAP15) foram manipuladas por 15 diferentes farmácias magistrais do estado de Minas Gerais, sendo sete de Belo Horizonte e oito do interior do estado. Três amostras de cápsulas de isoflavonas, industrializadas, foram adquiridas em drogarias de Belo Horizonte - MG (CAP16 a CAP18). Dezesete lotes de cápsulas estavam rotulados para conter 60 mg de isoflavonas totais/cápsula. Um único lote (CAP17) estava rotulado para conter 50 mg/cápsula.

Condições cromatográficas para análise por CCD

As análises por CCD foram realizadas em cromatofolhas de alumínio TLC de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha). Aplicaram-se nas placas alíquotas de 10 µL de solução etanólica contendo 0,5 mg/mL de cada um dos padrões (genisteína, daidzeína e gliciteína), e 10 µL de solução metanólica de cada amostra de extrato seco de isoflavonas (MP1, MP2 e MP3) a 5 mg/mL, antes e após hidrólise ácida. Foram desenvolvidos dois sistemas eluentes. O sistema A, constituído de mistura de acetato de etila e clorofórmio (70:30), foi utilizado para a separação das agliconas. O sistema B, utilizado para a separação dos glicosídeos, era constituído de uma mistura de acetato de etila, metanol e água (75:13,75:11,25). Os cromatogramas foram desenvolvidos em cubas saturadas. A visualização das manchas correspondentes aos glicosídeos e agliconas foi feita com auxílio de luz ultravioleta, a 254 nm, em câmara ultravioleta Spectroline CM-10. O R_f correspondente a

cada isoflavona foi calculado.

Condições de hidrólise

Foram adotadas as condições otimizadas descritas por César et al. (2006). Pesou-se quantidade do extrato seco ou do pó das cápsulas equivalente a 20 mg de isoflavonas totais e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 80 mL de HCl etanólico 3,0 mol/L, submeteu-se a banho de ultrassom, por 5 minutos, seguido de aquecimento em banho de vapor, por 40 minutos. Após resfriamento, completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrou-se. Uma alíquota de 5 mL foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com a fase móvel. Volumes de 20 µL das soluções foram analisados por CLAE, como descrito a seguir.

Condições cromatográficas para análise por CLAE

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo a líquido HP1100 (Agilent, CA, USA), constituído por bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD) e software HP ChemStation. Foram utilizadas as condições cromatográficas descritas por César et al. (2006). Empregou-se coluna C₁₈ capeada Lichrospher (250 x 4,6 mm, 5 µM), a 30 °C (Merck, Darmstadt, Alemanha); fase móvel constituída por ácido acético a 0,1% e metanol (52:48); fluxo de 1 mL/min; detecção em DAD a 254 nm e volume de injeção de 20 µL.

Preparou-se uma solução padrão única contendo 25,0 µg/mL de daidzeína, 15,0 µg/mL de genisteína e 2,00 µg/mL de gliciteína, usando como solvente a fase móvel. Essas concentrações de trabalho foram estabelecidas com base nos teores das isoflavonas geralmente encontrados no extrato seco de soja.

Aplicação do método por CLAE em análises de cápsulas de isoflavonas

Devido à presença de excipientes nas cápsulas, a seletividade do método analítico por CLAE foi reavaliada, conforme as orientações da Resolução RE nº 899 da ANVISA (Brasil, 2003). Foram preparadas duas formulações de excipientes, a partir de informações fornecidas pelas quinze farmácias que manipularam as cápsulas. A formulação 1 foi constituída por lactose (59%), celulose (20%), manitol (20%) e aerosil (1%), e a formulação 2 continha amido (68%), talco (30%), estearato de magnésio (1%) e laurilsulfato de sódio (1%).

Dois lotes de cápsulas foram manipulados utilizando as duas formulações de excipientes e a matéria-prima MP1, de modo a conter 60 mg de isoflavonas totais/cápsula. Também foram manipuladas cápsulas de placebo contendo somente as formulações

de excipientes. As análises quantitativas do conteúdo dessas cápsulas foram realizadas conforme descrito em *Condições de hidrólise*, em sextuplicata e em dois dias consecutivos. A seletividade do método foi avaliada por meio da análise dos cromatogramas obtidos e pela determinação, com auxílio do detector de DAD, da pureza dos picos. O desvio padrão relativo (DPR) referente às concentrações de cada aglicona analisada foi calculado, para avaliar a precisão (intra-dia e inter-dias) do método.

O doseamento por CLAE das agliconas de isoflavonas, liberadas após hidrólise, foi realizado, em triplicata, nas dezoito amostras de cápsulas. Pesou-se quantidade do pó das cápsulas equivalente a 20 mg de isoflavonas e procedeu-se conforme descrito em *Condições de hidrólise*. Foi realizado, ainda, o doseamento das mesmas amostras antes da hidrólise. Os teores de isoflavonas individuais e totais foram determinados em cada amostra de cápsula e os valores de DPR foram calculados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises por CCD

Inicialmente, foram obtidos vários perfis cromatográficos por CCD em sílica gel, empregando condições descritas na literatura para isoflavonas (Mabry et al., 1970; Harbone et al., 1975; Wagner; Blat, 1996). A grande diferença de polaridade entre glicosídeos e agliconas dificultou a obtenção de uma condição cromatográfica única para separação de todas as formas de isoflavonas presentes em extratos secos de soja. Dessa forma, foram propostos e otimizados dois sistemas eluentes distintos, sendo um para separação e identificação de agliconas e outro para os glicosídeos.

A Figura 2 apresenta, de forma esquemática, os perfis cromatográficos obtidos por CCD nos dois sistemas eluentes empregados (A e B) e os valores de R_f para os padrões das isoflavonas e para as três amostras de extratos secos, antes e após hidrólise. No perfil cromatográfico (Figura 2-A) obtido com o eluente acetato de etila e clorofórmio (70:30), para a separação das agliconas, os glicosídeos das isoflavonas não foram eluídos, devido à baixa polaridade do sistema empregado. Já com o eluente acetato de etila, metanol e água (75:13,75:11,25), figura 2-B, houve eluição dos glicosídeos, mostrando dois componentes, com valores de R_f iguais a 0,45 e 0,51, que provavelmente referem-se aos glicosídeos da daidzeína (daidzina) e da genisteína (genistina), tendo em vista as agliconas que são formadas após hidrólise.

De acordo com os perfis cromatográficos obtidos e correspondência com os valores de R_f dos padrões, verifica-se que a amostra MP1 apresenta manchas correspondentes a genisteína e daidzeína com maiores intensidades, bem como aos glicosídeos

dessas duas isoflavonas. A amostra MP2 se mostrou rica em daidzeína e daidzina, não apresentando outras isoflavonas em quantidades suficientes para detecção por CCD. Antes da hidrólise, MP3 apresentava apenas a aglicona daidzeína, porém na amostra hidrolisada foi possível identificar também gliciteína, indicando que essa isoflavona encontra-se na forma de glicosídeo na amostra não hidrolisada, que ou não foi separada pelo sistema solvente, ou não foi detectada.

Análises por CLAE

Não foram observados picos interferentes nos cromatogramas dos placebos contendo as formulações de excipientes 1 e 2. Um pico de maior intensidade foi observado no tempo de 1,9 min, decorrente dos reagentes utilizados na hidrólise. Os valores de pureza dos picos das agliconas no cromatograma das cápsulas manipuladas foram correspondentes a 99,52%, 99,20% e 99,98% para daidzeína, gliciteína e genisteína, respectivamente. Os elevados valores de pureza demonstram que outras substâncias não co-eluíram com os picos de interesse, sendo o método considerado seletivo para as agliconas analisadas, mesmo na presença dos excipientes das formulações 1 e 2.

Os teores médios ($n = 6$) e valores de DPR determinados na precisão intra-dia para daidzeína, genisteína e gliciteína foram 38,23 mg/cáp (DPR = 0,47%), 17,30 mg/cáp (DPR = 0,69%) e 1,59 mg/cáp (DPR = 0,83%), respectivamente. Os valores encontrados na precisão inter-dias ($n = 12$) foram 38,14 mg/cáp (DPR = 0,55%), 17,44 mg/cáp (DPR = 0,92%) e 1,58 mg/cáp (DPR = 1,03%), para daidzeína, genisteína e gliciteína, respectivamente. Os baixos valores de DPR obtidos, inferiores a 2,0%, confirmaram a precisão do método.

Os resultados da aplicação do método de CLAE na análise quantitativa das três agliconas nas dezoito amostras de cápsulas, antes e após hidrólise, são apresentados na Tabela 1.

Os resultados obtidos permitiram constatar que existe grande variação nos teores de agliconas individuais e totais entre as amostras analisadas, permitindo detectar três perfis de distribuição das agliconas, dependendo do tipo de extrato seco de soja utilizado na produção das cápsulas. 61% das amostras (CAP02, CAP03, CAP04, CAP05, CAP08, CAP10, CAP13, CAP15, CAP16, CAP17 e CAP18) demonstraram ser mais ricas em genisteína. Em 33% das amostras (CAP01, CAP06, CAP07, CAP11, CAP12 e CAP14) houve predomínio de daidzeína. Uma única amostra apresentou-se rica em gliciteína (CAP09), o que corresponde a cerca de 6% das cápsulas avaliadas. É interessante ressaltar que as cápsulas industrializadas foram as que apresentaram teor mais elevado de genisteína. A Figura 3 ilustra de forma esquemática os perfis de distribuição das agliconas nos dezoito lotes de cápsulas analisados.

Segundo dados fornecidos pelas farmácias magistrais, as amostras mais ricas em genisteína foram manipuladas com o extrato seco MP1 ou similar. Pode-se observar semelhança entre os perfis cromatográficos obtidos por CCD para MP1 (Figura 2) e por CLAE para amostras das cápsulas mencionadas (Figura 4), antes e após hidrólise. Nas análises por CCD de MP1 foi possível identificar, antes da hidrólise, manchas referentes a genisteína, daidzeína e seus respectivos glicosídeos. Na análise por CLAE de CAP02, manipulada com MP1, também foi possível observar a presença, no cromatograma, dos picos referentes às mesmas isoflavonas (Figura 4).

As cápsulas ricas em daidzeína foram manipuladas utilizando-se como matéria-prima o extrato seco MP2 ou similar. A análise por CCD (Figura 2) possibilitou detectar a presença de daidzeína e seu glicosídeo nesse extrato, o que coincide com o perfil de isoflavonas individuais obtido por CLAE nas amostras de cápsulas manipuladas com MP2. O cromatograma referente à CAP06 (Figura 4), contendo MP2, ilustra o perfil obtido com as cápsulas ricas em daidzeína.

O extrato seco MP3 foi utilizado como matéria-prima para manipulação da amostra CAP09. De forma semelhante, é possível correlacionar os perfis cromatográficos obtidos por CCD e CLAE para essas amostras, que demonstraram teor mais significativo de gliciteína após hidrólise, em relação às outras.

A natureza e a quantidade das isoflavonas individuais nos extratos de soja podem variar devido à influência de vários fatores, tais como variedade da soja, período da colheita e localização geográfica (Duncan et al., 2003). Estudos *in vitro* (Wober et al., 2002) e em modelos animais (Branham et al., 2002) demonstraram que as diversas isoflavonas de soja apresentam diferenças em relação à atividade biológica. Genisteína é considerada a isoflavona com maior atividade estrogênica *in vivo*, sendo cerca de dez vezes mais ativa do que daidzeína (Branham et al., 2002). Apesar do extrato seco de soja ser padronizado em relação ao teor de isoflavonas totais, parece não haver preocupação em relação aos teores individuais das isoflavonas nas matérias-primas.

Dessa forma, devido às diferenças consideráveis nos teores de isoflavonas individuais e totais entre as amostras de cápsulas analisadas, pode-se pressupor que a atividade farmacológica e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica de um tratamento com cápsulas de isoflavonas sejam suscetíveis a variações, dependendo da origem da matéria-prima utilizada.

CONCLUSÃO

As condições estabelecidas para análise por CCD mostraram-se adequadas para a identificação de isoflavonas no extrato seco de soja e para avaliar a eficiência da hidrólise, pelo desaparecimento, nas placas,

das manchas referentes aos glicosídeos. O método analítico por CLAE para determinação de agliconas de isoflavonas após hidrólise ácida se mostrou viável para o doseamento de cápsulas de isoflavonas, podendo ser utilizado para o controle de qualidade analítico de produtos acabados contendo estes fitoestrógenos. Foi possível correlacionar os perfis cromatográficos por CLAE das amostras de cápsulas com aqueles obtidos por CCD para os extratos secos utilizados como matéria-prima na manipulação das cápsulas. A alta variabilidade nos teores das agliconas individuais nas amostras analisadas indica a necessidade de padronização e controle das concentrações de isoflavonas em cápsulas comercializadas atualmente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Anderson JJB, Anthony MS, Cline JM, Washburn SA, Garner SC 1999. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nutr* 2: 489-504.
- Branham WS, Dial SL, Moland CL 2002. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *J Nutr* 132: 658-664.
- Brasil 2003. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, 2003.
- Brasil 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, 2004.
- Budel JM, Duarte MR, Santos CAM 2004. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). *Rev Bras Farmacogn* 14: 41-48.
- César IC, Braga FC, Vianna-Soares CD, Nunan EA, Pianetti GA, Condessa FA, Barbosa TAF, Moreira-Campos LM 2006. Development and validation of a RP-HPLC

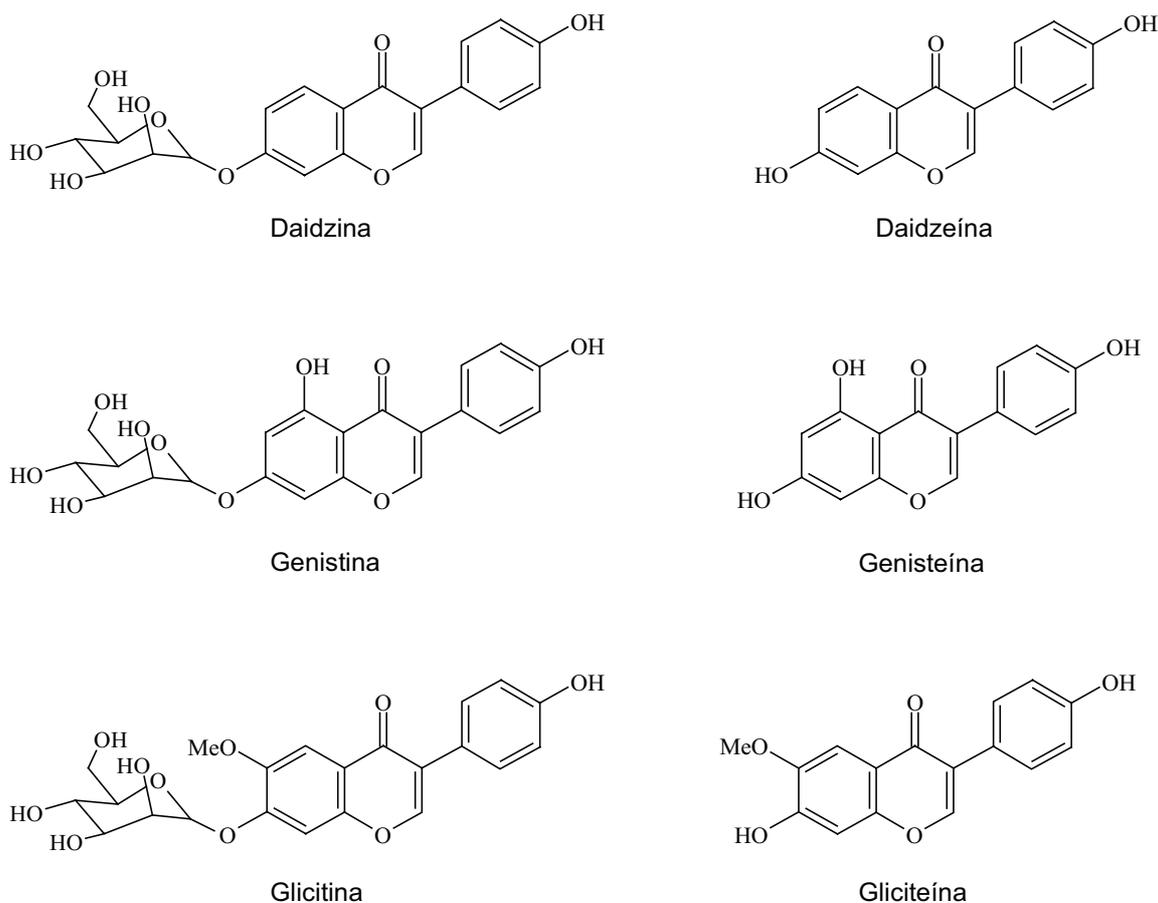


Figura 1. Estruturas químicas dos glicosídeos e agliconas de isoflavonas presentes em extratos secos de soja.

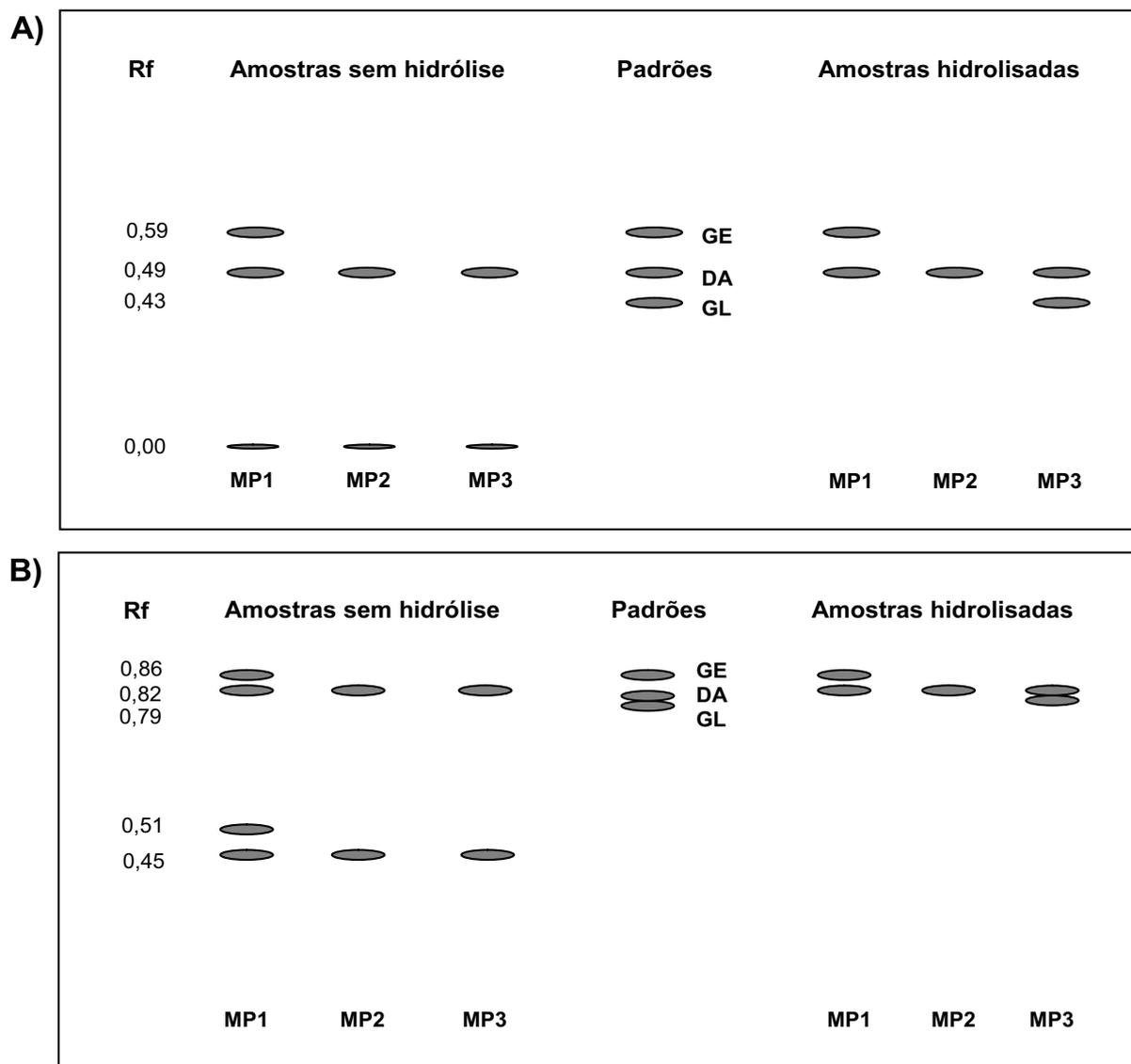


Figura 2. Representação esquemática dos perfis cromatográficos e respectivos valores de Rf de padrões de isoflavonas e amostras de extratos secos, antes e após hidrólise, obtidos por CCD em sílica gel. Eluente A: acetato de etila e clorofórmio (70:30). Eluente B: acetato de etila, metanol e água (75:13,75:11,25). Identificação dos padrões: GE (genisteína), DA (daidzeína) e GL (gliciteína)

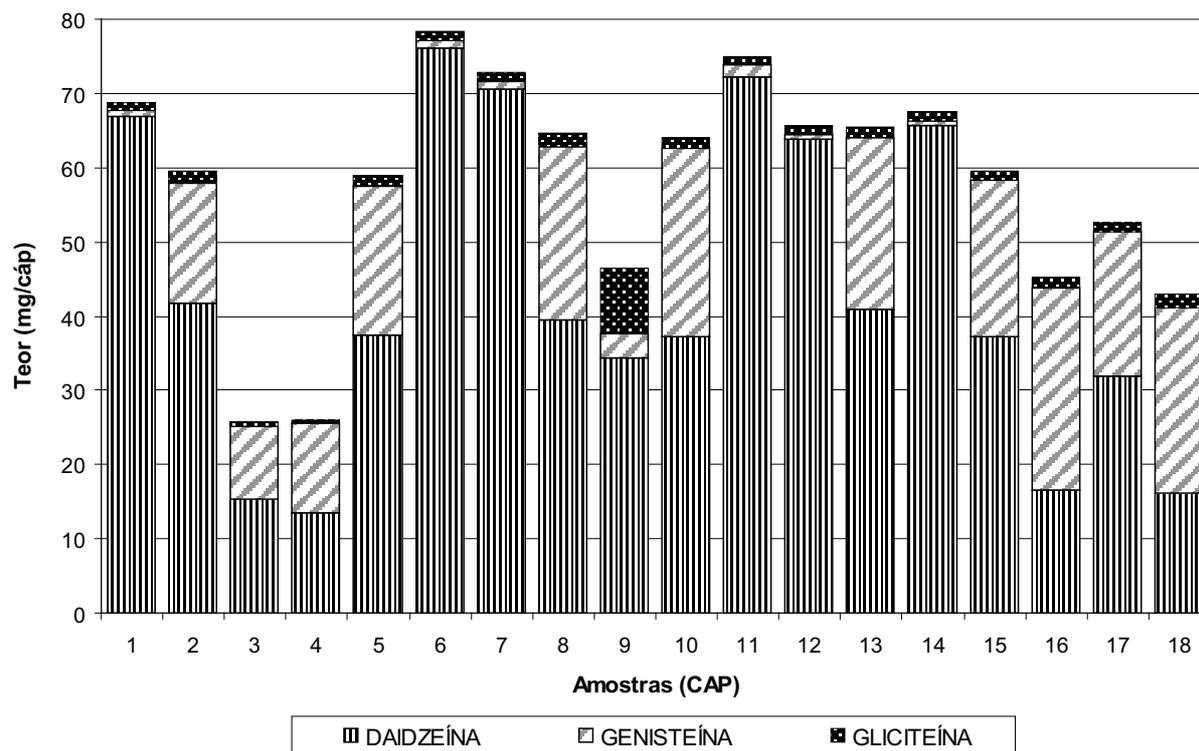


Figura 3. Representação gráfica dos teores médios obtidos por CLAE para daidzeína, genisteína e gliciteína, em amostras de cápsulas de isoflavonas, após hidrólise ácida.

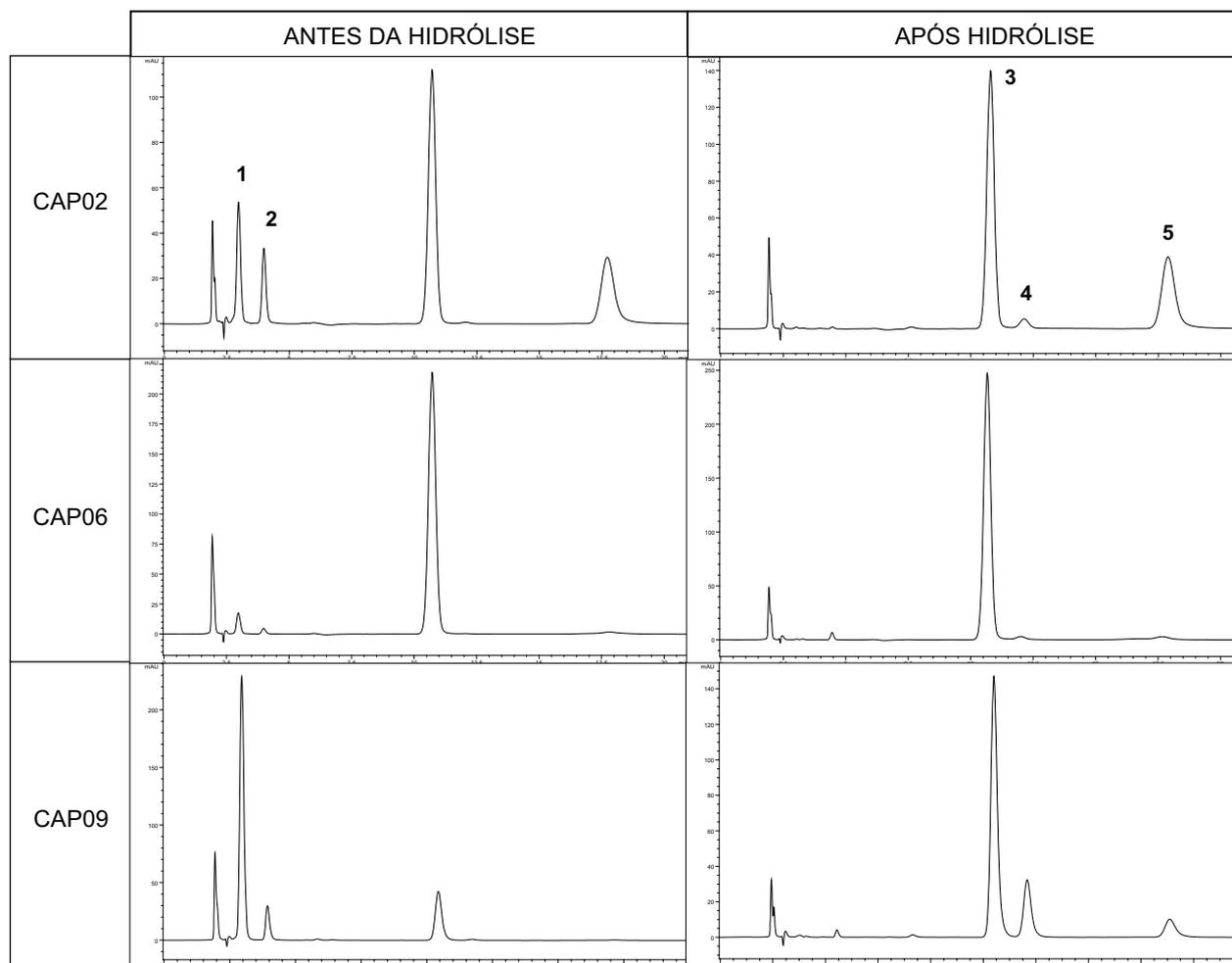


Figura 4. Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, antes e após hidrólise, para três amostras de cápsulas analisadas (CAP02, CAP06 e CAP09). Identificação dos picos: 1 e 2 - glicosídeos; 3 - daidzeína; 4 - gliciteína e 5 - genisteína.

Tabela 1. Teores médios de agliconas, obtidos por CLAE, expressos em mg/cápsula, em amostras de cápsulas de isoflavonas, antes e após hidrólise.

Amostra	Antes da hidrólise (mg/cáp)			Após hidrólise (mg/cáp)			Agliconas totais após hidrólise (mg/cáp)
	DA	GL	GE	DA	GL	GE	
CAP01	61,75	-	-	66,94	1,01	0,80	68,75
CAP02	34,85	-	13,07	41,78	1,48	16,19	59,45
CAP03	12,30	-	8,30	15,30	0,64	9,90	25,84
CAP04	10,95	-	9,97	13,54	0,49	11,96	25,99
CAP05	32,20	-	15,41	37,44	1,43	20,10	58,97
CAP06	71,34	-	-	76,20	1,31	0,94	78,45
CAP07	65,71	-	-	70,69	1,20	0,98	72,87
CAP08	31,01	-	18,37	39,39	1,79	23,47	64,64
CAP09	10,76	0,22	-	34,44	8,80	3,22	46,46
CAP10	29,51	-	19,78	37,34	1,59	25,17	64,10
CAP11	67,84	-	-	72,22	1,06	1,68	74,96
CAP12	63,58	-	-	63,74	1,13	0,80	65,66
CAP13	35,65	-	15,95	40,87	1,42	23,17	65,46
CAP14	63,08	-	-	65,74	1,12	0,61	67,46
CAP15	32,60	-	14,02	37,25	1,28	21,01	59,54
CAP16	0,65	-	0,54	16,51	1,63	27,18	45,31
CAP17	27,49	-	15,82	31,86	1,22	19,50	52,57
CAP18	0,67	-	0,58	16,16	1,89	24,93	42,98

DA = daidzeína; GL = gliciteína e GE = genisteína

- method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *J Chromatogr B* 836: 74-78.
- Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS 2003. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 253-271.
- Harbone JB, Mabry TJ, Mabry H 1975. *The flavonoids*. London: Chapman and Hall.
- Hutabarat LS, Mulholland M, Greenfield H 1998. Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean. *J Chromatogr A* 795: 377-382.
- Hutabarat LS, Greenfield H, Mulholland M 2000. Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. *J Chromatogr A* 886: 55-63.
- Johns P, Dowlati L, Wargo W 2003. Determination of isoflavones in ready-to-feed soy-based infant formula. *JAOAC Int* 86: 72-78.
- Julião LS, Tavares ES, Lage CLS, Leitão SG 2003. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). *Rev Bras Farmacogn* 13(Supl.): 36-38.
- Kledjus B, Vacek J, Adam V, Zehnalek J, Kizek R, Trnková L, Kubá V 2004. Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B* 806: 101-111.
- Klump SP, Allred MC, Macdonald JL, Ballam JM 2001. Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study. *JAOAC Int* 84: 1865-1883.
- Liggins J, Bluck LJC, Coward WA, Bingham SA 1998. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal Biochem* 264: 1-7.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag.
- Mitani K, Narimatsu S, Kataoka H 2003. Determination of daidzein and genistein in soybean foods by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 986: 169-177.
- Moffat AC 1986. *Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material*. 2 ed. London: Pharmaceutical Press.
- Nurmi T, Mazur W, Heinonem S, Kokkonen J, Adlercreutz H 2002. Isoflavone content of the soy based supplements. *J Pharm Biomed Anal* 28: 1-11.
- Sousa JPB, Furtado NAJC, Jorge R, Soares AEE, Bastos JK 2007. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 85-93.
- Thomas BF, Zeisel SH, Busby MG, Hill JM, Mitchell RA, Scheffler NM, Brown SS, Bloeden LT, Dix KJ, Jeffcoat AR 2001. Quantitative analysis of the principle soy isoflavones genistein, daidzein and glycitein, and their primary conjugated metabolites in human plasma and urine using reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 760: 191-205.
- Valente LMM, Alves FF, Bezerra GM, Almeida MBS, Rosario SL, Mazzei JL, d'Avila LA, Siani AC 2006. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. *Rev Bras Farmacogn* 16: 216-223.
- Wagner H, Blatt S 1996. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2 ed. Berlin: Springer.
- Wang CC, Prasain JK, Barnes S 2002. Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *J Chromatogr B* 777: 3-28.
- Wober J, Weisswange I, Vollmer G 2002. Stimulation of alkaline phosphatase activity in Ishikawa cells induced by various phytoestrogens and synthetic estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83: 227-233.