

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**Avaliação da estabilidade por CLAE das isoflavonas biochanina A e  
formononetina: estudo de degradação forçada.**

**Cristina Nickele Gonçalves**

**Porto Alegre, novembro de 2016.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**Avaliação da estabilidade por CLAE das isoflavonas biochanina A e  
formononetina: estudo de degradação forçada.**

**Cristina Nickele Gonçalves**

**Prof. Dra. Valquíria Linck Bassani**

**Porto Alegre, novembro de 2016.**

**"Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista de Ciências  
Farmacêuticas Básica e Aplicada/ Journal of Basic and Applied Pharmaceutical  
Sciences apresentadas em anexo."**

## RESUMO

A biochanina A e a formononetina são isoflavonas majoritárias de extratos de *Trifolium pratense*. A quantificação destas isoflavonas em extratos dessa espécie tem sido relatada por Ramos (2008) e Maito (2015). No entanto, não foram encontrados na literatura relatos de estudos de degradação forçada das mesmas. Em vista disto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a estabilidade das isoflavonas biochanina A e formononetina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), verificando a interferência dos produtos de degradação na determinação do teor dos analitos. As seguintes condições foram utilizadas para promover a degradação forçada: meio básico (NaOH 1M, 2h e 24h), meio ácido (HCl 1M, 2h), meio oxidativo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,45 % e 14,5%, 2h), termodegradação (80°C, 2h) e fotodegradação (UVA e UVC, 24h). O método cromatográfico (CLAE) utilizado foi o proposto por Maito (2015). Os resultados obtidos demonstraram que as isoflavonas são estáveis frente aos meios ácido e oxidativo, à temperatura e radiação UVA e UVC nas condições que foram analisadas. No entanto, foram susceptíveis à degradação em meio básico. Após 2 horas de exposição, observou-se no cromatograma da formononetina o aparecimento de um pico adicional, que foi atribuído como produto de degradação tendo em vista que houve redução de sua concentração. Após 24 horas de exposição, observou-se, no cromatograma da biochanina A, o aparecimento de um pico que foi atribuído ao produto de degradação, cujo tempo de retenção foi idêntico ao da formononetina (9,57 min), demonstrando a necessidade de se revisar o método cromatográfico que foi utilizado.

Palavras-chave: Isoflavonas. Biochanina A. Formononetina. Estabilidade. Degradação forçada.

## ABSTRACT

Biochanin A and formononetin are the major isoflavones present in the *Trifolium pratense* extracts. The quantifications of these isoflavones in this species extracts have been reported by Ramos (2008) and Maito (2015). However, no reports of studies indicating stability were found in the literature. The present study aims to evaluate the stability of the biochanin A and formononetin isoflavones against forced degradation conditions as well as to verify the interference of the degradation products in the analyses determination using high performance liquid chromatography (HPLC). The following conditions were used to promote the forced degradation: basic media (1M NaOH, 2h and 24h), acid media (1M HCl, 2h), oxidative medium H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.45% and 14.5%, 2h), temperature (80° C, 2h) and UVA and UVC radiation, 24h). The chromatographic method (HPLC) followed the conditions described by Maito (2015). The results demonstrated that the isoflavones are stable against the acid and oxidative media, temperature and UVA and UVC radiation as well as oxidative medium. However, they showed to be unstable against basic media. After 2 hours of exposure, the formononetin concentration decreased and an additional peak was observed in the chromatogram, which was assigned to the corresponding degradation product. The biochanin A chromatogram revealed the appearance of a peak after 24 hours of basic media exposure to the product to which it was assigned. This peak showed retention time identical to that of formononetin (9.57 min), demonstrating the need to reviewing the chromatographic method conditions to assure absence of its interference.

Keywords: Isoflavones. Biochanin A. Formononetin. Stability. Forced degradation.

## INTRODUÇÃO

A biochanina A (5,7-diidroxí-4'-metoxiisoflavona) e a formononetina (7-hidroxí-4'-metoxiisoflavona) são isoflavonas pertencentes à classe dos flavonoides. Essas isoflavonas são caracterizadas, assim como os flavonoides, pela presença da cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-proprano (Zuanazzi & Montana, 2007). A diferença estrutural entre essas duas isoflavonas é que a biochanina A possui uma hidroxila no carbono 5 do anel A, conforme observado na Figura 1. Estas constituem as isoflavonas majoritárias da espécie *Trifolium pratense* (trevo vermelho) (Beck *et al.*, 2005).

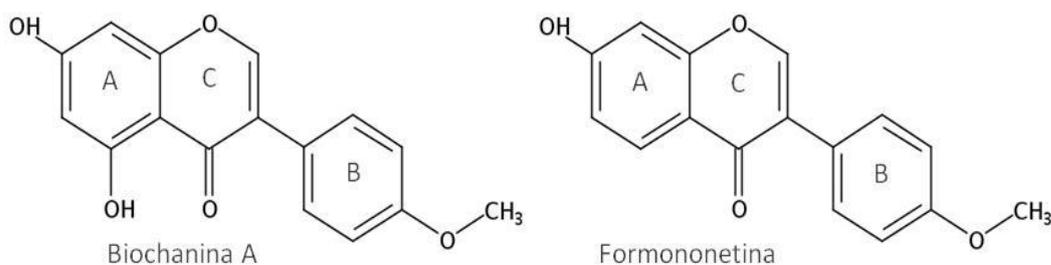


Figura 1: Estrutura química das isoflavonas biochanina A e formononetina.

Em outras espécies como *Cicer arietinum* (grão-de-bico) e *Baptisia spp* (falso indigo), também apresentam ambas as isoflavonas. Além disso, a formononetina pode ser encontrada nas espécies *Dalbergia paniculata*, *Machaerium villosum*, e a biochanina A em *Ferreirea spectabilis* e *Andira parviflora* (Wong, 1975).

A estrutura química e a massa molecular das isoflavonas, em geral, são semelhantes as do hormônio 17 $\beta$ -estradiol e, por isso, as isoflavonas podem interagir com receptores estrogênicos desse hormônio (Warri, *et al.*, 2008; Zand, *et al.*, 2000; Uesugi, *et al.*, 2002). Devido a essas características, as isoflavonas apresentam atividades biológicas semelhantes ao estradiol e são comumente conhecidas como fitoestrógenos. Alguns

estudos já demonstraram que a ingestão destes compostos pode reduzir os teores de colesterol, sendo também úteis para prevenção e tratamento de câncer, perda óssea e, o mais conhecido, alívio dos sintomas associados à menopausa (Sivesind & Seguin, 2005).

Diversos mecanismos de ação das isoflavonas vêm sendo propostos para prevenção de doenças, incluindo atividade estrogênica ou antiestrogênica, antiproliferativa, indução da parada do ciclo celular e apoptose, prevenção de oxidação, regulação do sistema imune e mudança na sinalização celular (Birt, *et al.*, 2001; Lissin & Cooke, 2000; Setchell & Adlercreutz, 1988). Quando se trata das isoflavonas isoladas, a literatura relata diversos estudos sobre a atividade biológica. A biochanina A já foi reportada como antioxidante (Rufer & Kulling, 2006), anti-inflamatório (Kalayciyan, *et al.*, 2007), antiviral (Cirone, *et al.*, 1996), anticarcinogênica (Puli, *et al.*, 2006) e também efeitos de proteção da integridade endotelial e funcional (Schrepfer, *et al.*, 2006). O tratamento com biochanina A produz alterações quimiopreventivas benéficas na expressão de genes em concentrações que podem ser obtido após a ingestão dietética (Moon, *et al.*, 2007). Para a formononetina também tem sido relatados estudos sobre a atividade biológica, como efeitos sobre a expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) e níveis de metaloproteinases (MMPs) em células cancerígenas de cólon humano HCT 116, com redução do volume tumoral (Auyeung *et al.*, 2012), efeito antiapoptótico (Wang, *et al.*, 2012) e efeito antiproliferativo sobre células de osteossarcoma humano (Liu, *et al.*, 2014).

Segundo a Conferência Internacional de Harmonização (ICH), os testes de estresse com fármacos devem incluir o efeito da temperatura, umidade se for o caso, oxidação e fotólise. Além disso, pode-se avaliar a hidrólise por meio de uma gama de valores de

pH quando em soluções e suspensões. Pesquisar produtos de degradação sob condições de estresse torna-se útil para estabelecer rotas de degradação e desenvolver e validar métodos analíticos adequados. Ainda segundo o ICH, os testes de estresse são estudos realizados para elucidar a estabilidade intrínseca do fármaco. Esse tipo de teste é parte da estratégia de desenvolvimento e é realizado normalmente em condições mais críticas do que aqueles utilizados para testes de estabilidade acelerada. Adicionalmente, os resultados destes estudos poderão integrar as informações fornecidas às autoridades reguladoras (ICH, 2003).

Os estudos de degradação forçada de fármacos fornecem informações tais como: (i) determinação da via de degradação de fármacos e produtos; (ii) discernimento dos produtos de degradação nas formulações que contenham os fármacos entre as substâncias não ativas (exemplo: excipientes); (iii) elucidação da estrutura dos produtos de degradação; (iv) determinação da estabilidade intrínseca de fármacos em solução e estado sólido e (v) identificação dos mecanismos de degradação termolítica, hidrolítica, oxidativa e fotolítica de fármacos ou produtos (ICH, 2003; Renolds *et al.*, 2002).

Recentemente, foi publicada pela ANVISA uma nova resolução, a RDC nº 53 de 2015, que contempla a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento. Entretanto, essa resolução somente engloba medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, não incluindo ainda os fitoterápicos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar estudos indicativos de estabilidade das substâncias de referência das isoflavonas, biochanina A e formononetina,

submetendo as duas moléculas à degradação forçada, em condições promotoras da degradação forçada, em meios básico e ácido, oxidativo; exposição à temperatura e à radiação UVA e UVC.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Materiais**

Os solventes utilizados na fase móvel para análises por cromatografia líquida foram: acetonitrila (grau HPLC) adquirido da Tedia, (USA); ácido trifluoracético (TFA) adquirido da Vetec, (Brasil) e a água ultrapura obtida utilizando-se o sistema de filtração Milli-Q-<sup>TM</sup> (Millipore, EUA). O metanol (grau HPLC) utilizado para a dissolução das amostras foi adquirido da Tedia (USA). As substâncias químicas de referência utilizadas, biochanina A (pureza de 98%) e formononetina (pureza de 99%), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha) e TCI (China), respectivamente. Os demais solventes e reagentes utilizados possuíam grau analítico.

### ***Preparo das amostras e reagentes***

#### ***Preparo dos amostras (solução estoque)***

Foram pesados separadamente 2 mg de biochanina A e 2 mg de formononetina, cada uma sendo transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com metanol. As concentrações finais obtidas foram de 20 µg/mL para cada uma delas. Essas soluções foram utilizadas para todos os testes de degradação realizados.

#### ***Preparo dos reagentes***

Para os testes de estresse com os meios ácido, básico e oxidativo, foram previamente preparadas as soluções estoque dos reagentes. Meio ácido: foi preparado ácido clorídrico (HCl) 2M. Meio básico: foi preparado hidróxido de sódio (NaOH) 2M. Meio oxidativo: foram utilizadas duas concentrações de peróxido de hidrogênio, uma a 29% e outra na concentração de 2,9%.

## **Metodologia**

### *Condições cromatográficas*

As condições cromatográficas utilizadas foram as propostas por Maito (2015) brevemente descritas: equipamento de CLAE Shimadzu LC-10 A (Kyoto, Japan), acoplado a um Detector por Arranjo de Diodos (DAD), controlado por software LC-Solution Multi-PDA. A fase estacionária foi constituída por uma coluna Phenomenex RP - 18 (Synergi Fusion 150 × 4,6 mm) com tamanho de partícula de 4 µm e uma pré-coluna Waters (20 × 3,9 milímetros ID; tamanho de partícula, 10 µm) (Milford , MA , EUA). A fase móvel foi constituída por uma fase A composta de acetonitrila:água (20:80) contendo 0,01% ácido trifluoracético e uma fase B composta por acetonitrila (99,9) e 0,1% de ácido trifluoracético. O gradiente de eluição é apresentado na Tabela 1; fluxo de 1 mL/min, volume de injeção 10 µL, temperatura do forno de 40 °C e detector UV em 260 nm.

Tabela 1. Gradiente de eluição

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fase A (%)</b>	<b>Fase B (%)</b>
0-13	80-75	20-25
13-18	75-71,4	25-28,6
18-20	71,4-0	28,6-100
20-27	0-80	100-20

## *Estudos indicativos de estabilidade*

### *Temperatura*

O estudo de estabilidade térmica foi avaliado por meio da exposição dos padrões ao calor. Para isso, foram tomadas aliquotas de 7 mL da solução estoque de cada uma das substâncias de referência, biochanina A e formononetina, e transferidas para frascos transparentes, hermeticamente fechados. Esses padrões foram levados à estufa com temperatura e umidade controladas (80°C por 2h). O teste foi realizado em triplicata. Após 2h, as amostras foram diluídas a uma concentração final de 5 µg/mL e posteriormente filtradas através de membrana PTFE (Milipore®), com diâmetro nominal de poro de 0,45 µm e o teor de isoflavonas e perfil cromatográficos avaliados por CLAE.

### *Meio oxidativo*

Foram adicionados 2,5 mL de cada uma das soluções estoque das substâncias de referência de biochanina A e formononetina à 2,5mL de solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (2,9% ou 29%, resultando numa concentração de 1,45% ou 14,5%) Após repouso por 2h, o volume de cada balão volumétrico (10 mL) foi completado com metanol (concentração final de 5 µg/mL). As soluções foram filtradas e analisadas por CLAE.

### *Radiação UVA e UVC*

Para o estudo de foto estabilidade, foram tomadas alíquotas de 7 mL da solução estoque de cada uma das substâncias de referência, biochanina A e formononetina e transferidas para frascos transparentes, hermeticamente fechados. Os padrões ficaram expostos às

luzes UVA e UVC por 24h. O teste foi realizado em triplicada. Após esse período, as amostras foram diluídas a uma concentração final de 5 µg/mL e posteriormente filtradas e analisadas por CLAE.

#### *Meio ácido e meio básico*

Para os estudos em meios ácido e básico, foram tomadas alíquotas de 2,5 mL das soluções estoque dos padrões (biochanina A ou formononetina) e transferidos para balões volumétricos de 10 mL. Na sequência, foram adicionados 2,5 mL de cada meio (HCl 2M e NaOH 2M), resultando numa concentração de 1M. Após o tempo de 2 e 24 horas, o meio básico foi neutralizado com HCl 2M e o volume dos balões completado com metanol (concentração final de 5 µg/mL). As amostras foram filtradas com membrana de tamanho nominal poro de 0,45 µm para vials e analisadas por CLAE.

#### *Análise estatística*

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão relativo (DPR). E adotada a análise de variância (ANOVA) seguido de teste *t*. O nível de confiança adotado foi de 0,05.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *Temperatura*

Os resultados da análise de estabilidade das amostras de biochanina A e formononetina frente à temperatura estão apresentadas na Tabela 2. Observa-se que estas isoflavonas não sofreram termodegradação quando expostas à temperatura de 80 °C durante 2 horas, não apresentando no seu teor diferenças estatísticas significativas em relação à

substância de referência não submetida às condições de termodegradação ( $p > 0,05$ ). Isto pode ser relacionado ao elevado ponto de fusão das duas isoflavonas analisadas, que são 213-215°C para biochanina A (Chen *et al.*, 2010) e de 261-263°C para formononetina (Drenin *et al.*, 2008).

A estabilidade frente à temperatura é uma característica relevante para o estabelecimento de parâmetros de processamento da planta, bem como do prazo de validade do produto final. Na literatura existem relatos da degradação de outras isoflavonas, como genisteína e daidzeína, estruturalmente semelhantes a biochanina A e a formononetina respectivamente, acima de 150°C (Yue *et al.*, 2010).

Tabela 2. Estabilidade das isoflavonas, biochanina A e formononetina, no teste de degradação forçada, frente a temperatura de 80 °C.

	<b>Biochanina A</b>			<b>Formononetina</b>		
	Conc.Média (µg/mL)	% DPR	Valor $p^*$	Conc.Média (µg/mL)	% DPR	Valor $p^*$
Referência 25°C	5,41	2,95		5,30	2,71	
Temperatura 80°C, 2 horas	5,29	2,31	0,3407	5,27	1,34	0,7093

\*significativo para  $p < 0,05$ ; n= 3

### **Oxidação**

Para essa análise foi utilizado peróxido de hidrogênio em duas concentrações (14.5% e 1.45%, v/v) e um período de exposição de 2 horas. A Tabela 3 apresenta os resultados encontrados para as duas isoflavonas, não observando-se diferença estatisticamente significativa entre a concentração da amostra submetida à degradação e a substância de referência.

Hovorka & Schöneich (2001), referem que grupos aromáticos substituídos, tais como fenóis e tiofenóis, entre outros, são suscetíveis à captação de hidrogênio, pois os anéis

aromáticos podem estabilizar os radicais resultantes por ressonância. Apesar das isoflavonas, biochanina A e formononetina, apresentarem grupos fenólicos em sua estrutura, não observou-se redução significativa no teor das isoflavonas nas condições testadas, mesmo na maior concentração de peróxido de hidrogênio, após 2 horas. Yatsu *et al.* (2014) também relatou a estabilidade de outras duas isoflavonas, genisteína e daidzeína, estruturalmente semelhantes a biochanina A e a formononetina, frente a condições oxidativas idênticas.

Tabela 3. Teste de degradação forçada das isoflavonas, biochanina A e formononetina, frente ao peróxido de hidrogênio, após 2 horas.

	Biochanina A			Formononetina		
	Conc.Média (µg/mL)	% DPR	Valor <i>p</i> *	Conc.Média (µg/mL)	% DPR	Valor <i>p</i> *
Referência	5,41	2,95		5,30	2,71	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1.45%	5,44	1,18	0,0650	5,34	0,74	0,3000
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 14.5%	5,16	0,52	0,7698	5,20	0,89	0,6688

\*significativo para  $p < 0,05$ ; n = 3

### **Fotodegradação**

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos no teste de exposição das amostras à radiação UVA e UVC, durante 24 horas. Observa-se que as médias das concentrações das amostras quando comparadas com as substâncias de referência foram estatisticamente semelhantes, denotando ausência de degradação.

A fotodegradação primária ocorre quando o comprimento de onda da luz que incide está dentro da faixa de comprimento de onda de absorção do analito, ou seja, a própria molécula absorve a radiação e então degrada (Ahmad, *et al.*, 2016; Florence & Attwood, 2011). Os máximos de absorção da biochanina A e da formononetina situam-se nos comprimentos de onda de 260/328 nm e 248/300 nm, respectivamente. Muito embora as faixas dos comprimentos de onda das luzes UVA (320–400 nm) e UVC

(200–290 nm) sejam próximas (Ahmad, *et al.*, 2016), não observou-se degradação, no tempo de exposição testado.

Dunford *et al.*(2003) relata que a exposição à luz solar não causou alterações nos espectros de absorção da biochanina A, porém para a formononetina houve um decréscimo na concentração quando solventes como a acetonitrila foi empregado.

Tabela 4. Degradação forçada das isoflavonas, biochanina A e formononetina, frente à radiação UVA e UVC em 24 horas de exposição.

	<b>Biochanina A</b>			<b>Formononetina</b>		
	Conc.Média (µg/mL)	% DPR	Valor <i>p</i> *	Conc.Média (µg/mL)	% DPR	Valor <i>p</i> *
Referência	5,412	2,95		5,304	2,71	
UVA	5,421	1,46	0,9303	5,204	2,92	0,4518
UVC	5,406	2,61	0,9632	5,079	1,42	0,0724

\* significativo para  $p < 0,05$ ; n=3

### **Meio Ácido**

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos no teste de degradação forçada utilizando meio ácido (HCl 1M), na qual observa-se que não houve redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no teor das isoflavonas, após 2 horas de exposição ao meio. A estabilidade frente ao meio ácido é uma característica interessante sob vários aspectos tais como a possibilidade de extração das isoflavonas da planta empregando solventes ácidos (Ramos, *et al.*, 2007), bem como a utilização de fase móvel acidificada na análise por CLAE, suprimindo o efeito de cauda de pico causado pela ionização dos grupos fenólicos (Yatsu, *et al.*, 2014).

Tabela 5. Degradação forçada das isoflavonas, biochanina A e formononetina em meio ácido após exposição por 2 horas

	<b>Biochanina A</b>			<b>Formononetina</b>		
	Conc.Média (µg/mL)	% DPR	Valor <i>p</i> *	Conc.Média (µg/mL)	% DPR	Valor <i>p</i> *
Referência	5,41	2,95		5,30	2,71	
HCl 1M	5,28	2,61	0,3396	5,46	3,42	0,3253

\* significativo para  $p < 0,05$ ; n=3

### ***Meio Básico***

No teste de degradação forçada em meio básico, foi utilizada a concentração de NaOH 1M. Como resultado, obteve-se a degradação parcial para as duas isoflavonas no tempo de duas horas. A Figura 2b apresenta o cromatograma (CLAE) da formononetina, após 2 horas exposição. Pode-se observar a presença de um pico adicional com tempo de retenção 13,84 min, que pode ser atribuído a um produto de degradação. Em paralelo, observa-se um decaimento de 37,55% na concentração da formononetina (Tabela 6), que assume significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Para a biochanina A, muito embora tenha sido observado um decaimento de 30,87% em sua concentração no período de 2h de exposição ao meio básico, não se observou a presença de pico adicional no cromatograma correspondente. Com vistas a intensificar a degradação, foi realizada exposição das amostras ao meio básico (NaOH 1M) por um período de exposição mais prolongado, de 24 horas. Os cromatogramas (CLAE) correspondentes à formononetina e biochanina A submetidas a estas condições são apresentados nas Figuras 2c e 3. Observa-se, para a formononetina, que o pico adicional atribuído ao produto de degradação apresentou área maior, além do desaparecimento do pico da formononetina, indicando que nesse período houve degradação total dessa molécula; e no cromatograma da biochanina A, pode-se observar o aparecimento de um pico adicional, com tempo de retenção 9,57 min, atribuído ao produto de degradação em meio básico.

Pode-se observar que o tempo de retenção do pico do degradado da biochanina A (9,57 min) apresentou o mesmo tempo de retenção do padrão de formononetina (9,57 min). Contudo, as análises dos espectros de máximos de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$  224 e 286 nm) do

degradado da biochanina A indicam a formação de um composto diferente da formononetina, uma vez que os máximos de absorção observados para esta isoflavona são  $\lambda_{\text{máx}}$  248 e 300 nm. Não há dados na literatura sobre compostos formados a partir da degradação em meio básico dessas isoflavonas. Sendo assim, análises de espectros de massas e ressonância magnética são necessárias para confirmação das estruturas dos degradados de ambas as isoflavonas. Além da necessidade de rever o gradiente de eluição utilizado, tendo em vista que o tempo de retenção do produto de degradação da biochanina A e da formononetina foram coincidentes, o que pode interferir na quantificação da formononetina em produtos em que as mesmas ocorrem simultaneamente, como é o caso de extratos vegetais de *Trifolium pratense*.

Comparando a estabilidade da formononetina e biochanina A e sua relação com a estrutura química destas moléculas, pode-se destacar a presença de uma hidroxila a mais no carbono 5 do anel A da biochanina A em relação à formononetina, o qual pode estabelecer ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila do anel C e estabilizar a molécula, como sugere Vaidya *et al.* (2007). Este autor analisou em meio básico, em altas temperaturas, a malonilgenisteína e a malonildaidzeína, que são semelhantes estruturalmente, respectivamente, à biochanina A e formononetina também sugeriu que a hidroxila extra no carbono 5 do anel da malonilgenisteína pode ter um efeito significativo, pois a malonildaidzeína teve o dobro da concentração degradada.

Tabela 6. Degradação forçada das isoflavonas, biochanina A e formononetina, em meio básico após exposição por 2 horas.

	<b>Biochanina A</b>			<b>Formononetina</b>		
	Conc.Média ( $\mu\text{g/mL}$ )	% DPR	Valor $p^*$	Conc.Média ( $\mu\text{g/mL}$ )	% DPR	Valor $p^*$
Referência	5,41	2,95		5,30	2,71	
NaOH 1M	3,74	3,23	0,00013	3,31	3,76	$5,3770e^{-05}$

\* significativo para  $p < 0,05$ ;  $n=3$

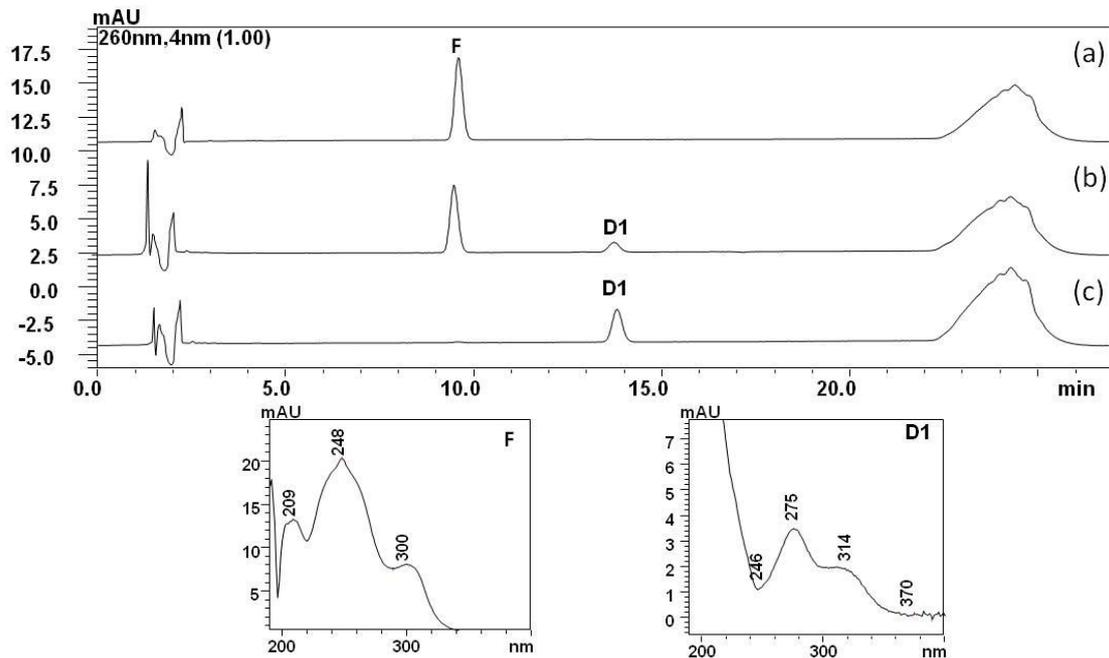


Figura 2: Cromatogramas de CLAE obtidos da análise por hidrólise alcalina. (a) amostra referência de formononetina 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ; (b) após hidrólise alcalina (1M, 2h); (c) após hidrólise alcalina (1M, 24h). (F) pico da formononetina (espectro de UV 248 nm e 300 nm), (D1) pico da degradação alcalina da formononetina (espectro de UV 275 nm e 314 nm).

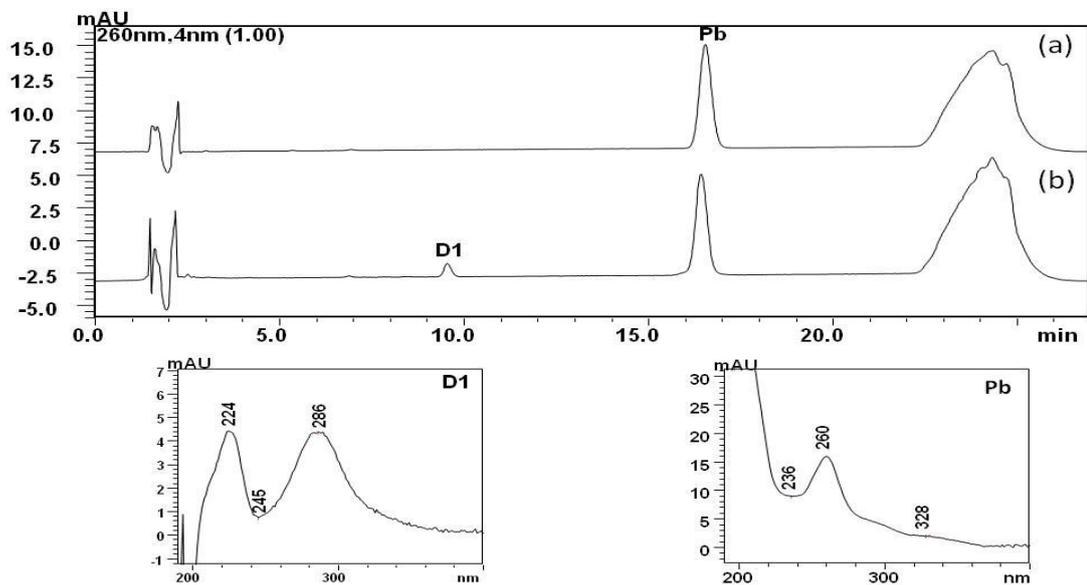


Figura 3: Cromatogramas de CLAE obtidos da análise por hidrólise alcalina. (a) amostra referência de biochanina A 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ; (b) após hidrólise alcalina (1M, 24h). (Pb) pico da biochanina A (espectro de UV 260 nm e 328 nm), (D1) pico da degradação alcalina da biochanina A (espectro de UV 224 nm e 286 nm).

Em suma, o conjunto de resultados deste trabalho mostra o quanto a formononetina e a biochanina A são estáveis frente às condições de estresses a que foram submetidas, e fornecem subsídios importantes para pesquisas futuras. A identificação dos produtos de degradação, utilizando espectroscopia de massas (MS) e/ou ressonância magnética nuclear (RMN), constitui-se numa perspectiva importante, bem como a avaliação desses produtos quanto a sua toxicidade e possíveis atividades biológicas semelhantes ou até mesmo mais potentes que as duas isoflavonas analisadas.

## **CONCLUSÕES**

Entre os testes de degradação forçada realizados, pode-se observar que somente em meio básico se observa degradação das isoflavonas biochanina A e formononetina. Os demais testes de degradação, temperatura 80°C, 2 h; exposição a UVC e UVA, 24 horas; meio ácido (HCl 1M, 2 h) e peróxido de hidrogênio, 2h, não determinaram degradação estatisticamente significativa nas duas isoflavonas ( $p>0,05$ ), denotando estabilidade das mesmas frente a estas condições.

A biochanina A apresenta maior estabilidade frente a degradação ao meio básico que a formononetina. O produto de degradação da biochanina A apresenta o mesmo tempo de retenção que a formononetina.

## REFERÊNCIAS

Ahmad I, Ahmed S, Anwar Z, Sheraz MA, Sikorski M. Photostability and photostabilization of drugs and drug products. *International Journal Of Photoenergy*, 2016, 19pg.

Auyeung KK-W, Law P-C, Ko JK-S. Novel anti-angiogenic effects of formononetin in human colon cancer cells and tumor xenograft. *Oncology Reports*, 2012, 28(6): 2188-2194, 2012.

Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005, 94 (5): 499-518.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology and therapeutics*, 2001, 90: 157–177.

Brasil. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Resolução de diretoria colegiada (RDC) nº 53, de 4 de dezembro de 2015.

Chen X, Tang L-J, Sun Y-N, Qiu P-H, Liang G. Syntheses, characterization and antitumor activities of transition metal complexes with isoflavone. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2010, 104: 379–384.

Cirone M, Zompetta C, Tarasi D, Frati L, Faggioni A. Infection of human t lymphoid cells by human herpesvirus 6 is blocked by two unrelated protein tyrosine kinase inhibitors, biochanin a and herbimycin. *Aids res. Hum. Retroviruses*, 1996, 12: 1629–1634.

Drenin AA, Botirov EKh, Petrulyak EV. New genistein monogalactoside from the aerial part of *Trifolium pratense*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2008, 44 (2): 178-181.

Dunford CL, Smith GJ, Swinnyb EE, Markhama KR. The fluorescence and photostabilities of naturally occurring isoflavones. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, 2(5):453-623.

Florence AT, Attwood D. Estabilidade De Drogas. In: princípios físico-químicos em farmácia. 2ª Edição. São Paulo : Pharmabooks, Cap 4, Pg 125-186. 2011.

Hovorka SW, Schöneich C. Oxidative degradation of pharmaceuticals: theory, mechanisms and inhibition. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 90: 253-269.

International Conference on Harmonisation (ICH). Stability testing of new substances and products Q1A (R2). ICH; 2003.

Kalayciyan A, Orawa H, Fimmel S, Perschel, FH, Gonzalez JB, Fitzner RG, Orfanos, CE, Zouboulis CC. Nicotine and biochanin a, but not cigarette smoke, induce anti-inflammatory effects on keratinocytes and endothelial cells in patients with behcet's disease. *J. Invest. Dermatol*, 2007, 127:81–89.

Kemertelidze ÉP, Syrov VN, Alaniya MD, Kavtaradze NSh, Khushbaktova ZA. Chemical composition and pharmacological activity of the leaves of *pueraria hirsuta* L. grown in Georgia. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2008, 42(6): 340-343 .

Lissin LW, Cooke JP. Phytoestrogens and cardiovascular health. *Journal of the American College of Cardiology*, 2000, 35(6), 1403–1410.

Liu Y, et al. The proapoptotic effect of formononetin in human osteosarcoma cells: involvement of inactivation of erk and akt pathways. *Cellular Physiology And Biochemistry: International Journal Of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, And Pharmacology*, 2014,34(3): 637-645.

Maito TF. Multicomplexação de isoflavonas de *Trifolium pratense L.* com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. [tese]. Porto Alegre: UFRGS. 2015.

Moon YJ, Brazeau DA, Morris ME. Effects of flavonoids genistein and biochanin a on gene expression and their metabolism in human mammary cells. *Nutr. Cancer*, 2007, 57: 48–58.

Moore DE. Photophysical and photochemical aspects of drug stability. In: Tonnesen H. *Photostability of drugs and drug formulations*, , Ed., Crc Press, Boca Raton, Fla, USA, 2nd Edition, 2004, p. 17–19.

Puli S, Lai JC, Bhushan A. Inhibition Of Matrix Degrading Enzymes And Invasion In Human Glioblastoma (u87mg) Cells By Isoflavones. *J. Neurooncol*, 2006, 79: 135–142.

Ramos GP, et al. LC determination of four isoflavone aglycones in red clover (*Trifolium pratense l.*). *Chromatographia*, 2008,67 (1-2): 125-129.

Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajk TD, Motto MG. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharm Tech*, 2002, 26(2):48–56.

Rufer, CE, Kulling SE. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *J. Agric. Food Chem*, 2006, 54: 2926–2931.

Schrepfer S, Deuse T, Munzel T, Schafer H, Braendle W, Reichenspurner H. The selective estrogen receptor-beta agonist biochanin a shows vasculoprotective effects without uterotrophic activity. *Menopause*, 2006, 13: 489–499.

Setchell KDR, Adlercreutz H. Mammalian lignans and phytoestrogens: recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: Rowland IR. *Role of gut or a in toxicity and cancer*. San-Diego, Ca: Academic Press. 1988, p. 315–345

Sivesind E, Seguin, P. Effects of the environment, cultivar, maturity and preservation method on red clover isoflavone concentration. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53:6397-6402.

Uesugi T, Fukui Y, Yamori Y. Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal japanese women: a four-week study. *J Am Coll Nutr* 2002, 21:97–102.

Vaidya NA, Mathias K, Ismail B, Hayes KD, Corvalan CM. Kinetic Modeling of Malonylgenistin and Malonyldaidzin Conversions under Alkaline Conditions and

Elevated Temperatures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007, 55 (9): 3408 -3413.

Veitch NC. Isoflavonoids of the leguminosae. *Natural product reports*. 2013,30 (7): 988-1027.

Wang Y, et al. Formononetin attenuates il-1 $\beta$ -induced apoptosis and Nf-Kb activation in ins-1 cells. *Molecules*, 2012,17(9): 10052-10064.

Warri A, Saarinen NM, Makela S, Hilakivi-Clarke L. The role of early life genistein exposures in modifying breast cancer risk. *Br. J. Cancer*, 2008, 98: 1485–1493.

Wong, E. Isoflavonoids. In: Harborne J.B; Mabry J.T; Mabry H. *The Flavonoids*. New York: Academic Press, 1975. Cap. 14, P. 743-800.

Yatsu FKJ, Pedrazza GPR, Argenta DF, Barreto F, Nemitz MC, Teixeira HF, Koester LS, Bassani VL. A new simplified and stability indicating liquid chromatography method for routine analysis of isoflavones aglycones in different complex matrices. *Food Anal. Methods*, 2014, 7:1881–1890.

Yue X, Abdallah AM, Xu Z. Thermal dynamic properties of isoflavones during dry heating. *International journal of food science and technology*, 2010, 45: 1878–1882.

Zand SR, Jenkins DJ, Diamandis EP. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds, *Breast Cancer Res Treat*. 2000, 62(1): 35–49.

Zuanazzi JAS, Montanha JA, Zucolotto. Flavonoides. In: Simoes CMO e colaboradores. *Farmacognosia, do produto natural ao medicamento 1 Edição*. Porto Alegre, Artmed, 2007. Cap. 15, Pg 209-233.



## AUTHOR'S INSTRUCTIONS

### 1. SCOPE AND POLICY

The Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada / Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences is a specialized research periodical of multidisciplinary content that welcomes contributions from the national and international scientific community. It is refereed and distributed to readers in Brazil and several other countries.

The Journal is published by the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University (UNESP), Araraquara, Brazil. It publishes original research in all fields of the Pharmaceutical Sciences, on pertinent topics involving fundamental and applied research, in the form of original papers, brief communications or review articles. Manuscripts should be submitted in English. There is one volume per year, made up of four numbered issues at threemonth intervals.

The requirements for manuscripts to be published in the Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada / Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences conform to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" agreed by the International Committee of Medical Journal Editors at Vancouver (<http://www.icmje.org>). Reference Style and Format: The Uniform Requirements style for references is based largely on an American National Standards Institute style adapted by the National Library of Medicine (NLM) for its databases. Authors should consult NLM's Citing Medicine (2007, updated 2009 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>) for information on its recommended formats for a variety of reference types.

**1.1 ORIGINALITY:** Authors should ensure that manuscripts submitted to the Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences have not been previously submitted or published elsewhere. The authors are fully responsible for the content of their papers. The Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences use anti-plagiarism software on received manuscripts.

### 2. SUBMISSION OF WORK

Manuscripts should be submitted in electronic format at the website of the magazine in SUBMISSIONS or by clicking on this link:

<http://seer.fcfar.unesp.br/rcfba/index.php/rcfba/author/submit/>

Each manuscript must be accompanied by a cover letter signed by the corresponding author.



### **3. PREPARING AN ORIGINAL ARTICLE**

The manuscript should be submitted in MS Word 97 or later, in A4 (210x297mm) format, with side margins of 3 cm, top and bottom margins of 2.5 cm (or 1 inch), font 12-point Times New Roman and double spacing throughout. Pages should be numbered from the title page.

The manuscript should be divided into sections in the following order: title page, abstract, keywords, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, resumo (Portuguese) references, figures, figure legends and tables.

#### **3.1 TITLE PAGE:**

- a) Title of the article: this should be concise, informative and complete, avoiding unnecessary words. The authors should provide a Portuguese version of the title.
- b) Authors: complete name and surname of each author.
- c) Affiliation: the institutional affiliation of each author.
- d) Corresponding author: the author to whom mailing should be sent, including complete postal and email addresses, telephone and fax numbers.
- e) Short running title: this title will be used as a heading on each printed page, and should not exceed 40 characters.

#### **3.2 ABSTRACT:**

Articles should include an Abstract in English and a Resumo in Portuguese, to a maximum of 250 words. The abstract should give a clear outline of the study, indicating objective, methodology, results and conclusions.

##### **3.2.1 KEYWORDS AND PALAVRAS-CHAVE:**

A list of 3 to 6 indexing terms should be presented in English and Portuguese, preferably taken from the Medline Thesaurus or the structured thesaurus of Health Sciences Descriptors (DeCS) created by Bireme, available at: .

#### **3.3 INTRODUCTION:**

This should define the purpose of the study and offer a brief review of the literature, justifying the execution of the research and emphasizing the resulting advances.

#### **3.4 MATERIAL AND METHODS:**

This section should offer, briefly and clearly, sufficient information to allow the study to be repeated by other researchers. Standard techniques may be indicated by bibliographic reference.



### 3.5 RESULTS:

This section should report the findings clearly and concisely, avoiding comments and comparisons. Do not repeat in the text much of the data already set out in figures and tables.

### 3.6 DISCUSSION:

This should explore as fully as possible the results obtained, relating them to the previously published data. Only indispensable citations should be included.

### 3.7 ACKNOWLEDGMENTS:

These should be restricted to the essentials. The sources of financial support should be included in this item.

### 3.8 REFERENCES:

All published work cited in the body of the text must appear in the list of bibliographical references, which should be organized alphabetically, in the style of the Vancouver (authornumber) system. Only citations essential to the content of the article should be included. In publications with up to ten authors, all of them should be cited; beyond this number, only the first author, followed by the expression "et al.". Names of journals should be abbreviated in the style used in the Index Medicus (not in italics and without full stops), giving date, volume, issue and page range. The list of periodicals indexed therein can be consulted at the following electronic address: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>.

- Articles in periodicals

Docherty JR. Subtypes of functional  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* . 1998; 361(1):1- 15.

Martins MBG, Martins AR, Cavalheiro AJ, Telascrêa M. Caracterização biométrica e química da folha de *Mentha pulegium* x *spicata* (Lamiaceae). *Rev Ciênc Farm., Araraquara*, 2004;25(1):17-23.

- Articles without volume or issue number

Combes A. Etude d'excipients utilises dans l' industrie pharmaceutique. *STP Pharma* 1989:766-90.

- Articles without author

Coffee drinking and cancer of the pancreas [editorial]. *Br Med J Clin Res*. 1981 Sep 5;283(6292):628.

- Articles from on-line periodical



Rocha JSY, Simões BJG, Guedes GLM. Assistência hospitalar como indicador da desigualdade social. Rev Saúde Pública [Internet] 1997 [citado 1998 mar 23];31(5)479-87. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~rsp>.

- Articles with Digital Object Identifier - DOI

Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. Biol Proc Online [Internet]. 2006 [cited 2007 Jan 8];8(1):194-215. Available from: <http://www.biologicalprocedures.com/bpo/arts/1/127/m127.pdf>. DOI: 10.1251/bpo127

- Institution as an author or publisher

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. Hypertension 2002; 40(5):679-86.

- Institution as both author and publisher

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis. 3ª ed. Brasília (DF); 1999.

Ministerio de Salud de Nicaragua. Política nacional de salud 1997-2002: descentralización y autonomía. Managua: Ministerio de Salud; 2002. p.42-9.

- Papers presented at a congress

Alencar LCE, Seidl EMF. Levantamento bibliográfico de estudos sobre doadoras de leite humano produzidos no Brasil. In: 2. Congresso Internacional de Bancos de Leite Humano; 2005; Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Harley NH. Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kay SV, editors. Indoor air and human Health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium; 1984 Oct 29-31; Knoxville, TN. Chelsea, MI: Lewis, 1985:69-78.

- Books

Goodman LS. The pharmacological basis of therapeutics. 2nd. ed. New York: Macmillan; 1955.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th. ed. Chicago: McGraw-Hill; 2006.

- Chapters in books



Laurenti R. A medida das doenças. In: Forattini OP. Ecologia, epidemiologia e sociedade. São Paulo: Artes Médicas; 1992. p.369-98

- Editors, Organizers

Dienner HC, Wilkinson M, editors. Drug induced headache. New York: Spring-Verlag; 1988.

- Book on CD-ROM

Martindale: the complete drug reference [CD-ROM]. Englewood, CO: Micromedex; 1999. Based on: Parfitt K, editor. Martindale: the complete drug reference. London: Pharmaceutical Press; 1999. International Healthcare Series.

- Dissertation and thesis

Gonçalves H. Aproveitar a vida: um estudo antropológico sobre valores, juventude e gravidez em uma cidade do interior [tese]. Porto Alegre: UFRGS; 2004.

- Legal documents

Published legislation

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 30 de março de 2007. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados - SNGPC estabelece a implantação do módulo para drogarias e farmácias e dá outras providências. Diário Oficial da União, nº 63, 2 de abril de 2007. Seção 1. p. 62-4.

São Paulo (Estado). Decreto no 42.822, de 20 de janeiro de 1998. Lex: coletânea de legislação e jurisprudência, São Paulo, 1998; 62(3): 217-220.

Planned legislation

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1st Sect. (1995).

Federal code regulations

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

- Patent

Harred JF, Knight AR, McIntyre JS, inventors. Dow Chemical Company, assignee. Expoxidation process. US patent 3,654,317. 1972 Apr 4.

- Software



HINTZE JL. NCSS: statistical system for Windows. Version 2001. Kaysville, UT: Number Cruncher Statistical Systems; 2002. Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

EPI Info: a database and statistics program for public health professionals Version 3.2.2. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2005. [cited 2006 May 30]. Available from: .

- Website

Health on the net foundation. Health on the net foundation code of conduct (HONcode) for medical and health web sites. [cited 1998 June 30]. Available from: .

Hoffman DL. St John's Wort. 1995; [4 screens]. [cited 1998 July 16]. Available from: .

#### **4. PREPARING A REVIEW ARTICLE**

This should be a critical review of a currently relevant subject based on published articles and results from the author's work. The Review Article should not be over eight printed pages (approximately 24 pages in the manuscript). It should contain an Abstract in English and Resumo in Portuguese.

#### **5. PREPARING A BRIEF COMMUNICATION**

This should be brief and direct, the objective being to communicate results or specific techniques. Nevertheless, it will be reviewed in the same way as an original article and will not be published more quickly. It should conform to the instructions for Original Articles, but without subdivision into sections. The references should be given at the end of the text, using the same format as for an Original Article. A brief Abstract with 3 keywords and Resumo with 3 palavras-chave should be given. The author should inform the Journal that the manuscript is a Brief Communication, to ensure that it will be refereed correctly during the review.

#### **6. ADDITIONAL INFORMATION**

Bibliographic citations in the text: Surname(s) of the author(s) followed by the year of publication should be used, as in these examples:

One author: Croft (1999) or (Croft, 1999)

Two authors: Sogin & Bacci (1998) or (Sogin & Bacci, 1998)

More than two authors: Kreiger et al. (1990) or (Kreiger et al., 1990)



## 7. ILUSTRATIONS

**7.1 FIGURES:** Photographs, charts, maps or illustrations must be submitted at the end of work, numbered consecutively in Arabic numerals in the order that they appear in the text. The corresponding captions should be clear and concise and should appear after each figure. In the text, the approximate position of each figure must be shown. The figures should be in color, however, in the publication they will appear printed in black and white or grayscale. Photographs should be sent also in separate files outside of Word, in .tif or .jpg format with at least 300 dpi resolution.

**7.2 TABLES:** These should complement and not duplicate the text. Tables should be numbered in Arabic numerals, in the order in which they appear in the text, and a brief and descriptive title should be placed above each. If necessary, identified footnotes should be used. Tables must be presented at the end of the text and their position shown in the body of the text.

**7.3 ETHICS:** Researchers who include experiments on human beings or human biological material in their work should follow the current norms published by the competent authorities. Studies that involve experiments requiring the approval of an Ethical Committee should be accompanied by a copy of the favorable permit.

Manuscripts not in accordance with these instructions will not be analyzed.

## 8. COMPLEMENTARY FILES

You must also send two additional documents filled for each submission:

[SUBMISSION LETTER, AUTHORIZATION OF PUBLISHING](#)

[IDENTIFICATION OF THE ARTICLE](#)

### ADDRESS:

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada = Journal of Basic and Applied  
Pharmaceutical Sciences

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - Caixa Postal 502

14801-902 Araraquara, SP- Brasil.

Fone/Phone: 55-16-33016887

Email: [rcfba@fcfar.unesp.br](mailto:rcfba@fcfar.unesp.br)

Website : <http://seer.fcfar.unesp.br/rcfba/>