

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA DE *CAPRARIA BIFLORA* L. E
ESTUDO BIOLÓGICO E FÍSICO-QUÍMICO DE SEUS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

THIAGO MENDONÇA DE AQUINO

VIRTUS IMPAVIDA

**Recife
2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



**CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA DE *CAPRARIA BIFLORA* L. E
ESTUDO BIOLÓGICO E FÍSICO-QUÍMICO DE SEUS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Atuação: Química de Produtos Naturais

THIAGO MENDONÇA DE AQUINO

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

CO-ORIENTADOR: Prof.^o Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque

Recife

2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

REITOR

Prof. Dr. Geraldo José Marques Pereira

VICE-REITOR

Prof. Dr. Yony de Sá Barreto Sampaio

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Paulo Roberto Freire Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof.^a Silvana Cabral Maggi

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me concedido simplesmente a oportunidade de viver.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio, incentivo e carinho em todas as horas.

Aos meus orientadores Prof^ª Dr^ª Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim e Prof. Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque pelos ensinamentos, pela dedicação e pela confiança para a realização deste trabalho, e principalmente pela amizade.

À prof^ª Cláudia Sampaio de Andrade Lima, a qual posso considerar uma mãe na minha vida acadêmica e científica.

À Conceição Almeida, pelo incentivo e presença sempre amiga.

À Prof^ª Dr^ª Jane Sheila Higino, que estava sempre a disposição com idéias e sugestões para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Góes, pelos conselhos e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Antônio José Alves, pela consideração e confiança, e por ter cedido seu laboratório e materiais para a realização de parte deste trabalho. Agradeço também à Ana Flávia e Marli Barbosa pelo expressiva contribuição na parte experimental.

Ao Prof. Dr. Mário Bernardo-Filho, por me aceitar em seu grupo de trabalho, e a todos os integrantes de seu laboratório, em especial Gláucio Diré e Elaine Lima, os quais foram de grande importância na conclusão deste trabalho.

Ao doutorando Arquimedes Monteiro, pela amizade, e que sempre me deu apoio e atenção.

À Antônio Rodolfo, Ivone Souza e todos os professores do mestrado, que me passaram conhecimentos indispensáveis para a realização do trabalho, e para a continuidade de minha vida acadêmica.

À Levi Rodrigues, pela grandiosa amizade durante toda minha vida acadêmica.

À Sra. Iguaci, secretária do mestrado, por sempre estar a disposição para quaisquer problemas.

Aos meus amigos de sempre Enrik Almeida, Alfredo Dias, João Eudes, Felipe Bonifácio, Francisco Jaime, Ricardo Barreto, Filipe Vanderley, Divaldo Júnior, Ana Carolina, Adriana Karla, Lílian Calado, Eduardo Macário, Eduardo Gonçalves, Gustavo Dimech, Diogo Florêncio, Erik Ramo, Marcos André, Rômulo Pinto, Jenifer Rodrigues, Patrícia Amélia, Valderes Almeida e Tereza Raquel.

Ao amigo Adriano Antunes, pela grande contribuição científica prestada ao desenvolvimento deste trabalho.

“Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade”.

Dalai Lama

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE TABELAS | xi |
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 4 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 3.1. USOS POPULARES | 8 |
| 3.2. CONSTITUÍNTES QUÍMICOS | 9 |
| 3.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA | 12 |
| 3.4. ESTUDO DE CASO | 20 |
| 3.5. ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS | 20 |
| 4. PROCEDIMENTOS INICIAIS | 22 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 27 |
| 6. FARMACOBOTÂNICA | 32 |
| 7. TERMOANÁLISE | 38 |
| 8. VALIDAÇÃO | 64 |
| 9. RADIOMARCAÇÃO | 84 |
| 10. CONCLUSÕES | 131 |
| 11. ANEXOS | 134 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------------|--|
| AcOEt | Acetato de etila |
| AcOH | Ácido acético |
| Al³⁺ | Íon Alumínio |
| Ca²⁺ | Íon Cálcio |
| Cl⁻ | Íon Cloro |
| cm | Centímetro |
| CMI | Concentração Mínima Inibitória |
| DE₅₀ | Dose Efetiva 50 |
| DSC | Calorimetria Exploratória Diferencial |
| Fe²⁺ | Íon Ferro |
| g | Grama |
| HCOOH | Ácido fórmico |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatographic</i> |
| ICH | <i>International Conference of Harmonization</i> |
| IV | Infravermelho |
| K⁺ | Íon Potássio |
| Me₂CO | Acetona |
| Mg²⁺ | Íon Magnésio |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| Na⁺ | Íon Sódio |
| n-BuOH | n-Butanol |
| °C | Graus Célsius |

| | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| °GL | Graus Gay-Lussac |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PO₄³⁻ | Íon Fosfato |
| R_f | Relação do <i>from</i> |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| Tc-99m | Tecnécio-99m |
| TG | Termogravimetria |
| UV | Ultravioleta |
| µg | Micrograma |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figura 1 | <i>Capraria biflora</i> L. (Scrophulariaceae) | 07 |
| Figura 2 | Estrutura química da biflorina isolada a partir das raízes de <i>Capraria biflora</i> L. | 10 |
| Figura 3 | Estruturas químicas de iridóides glicosídeos isolados a partir das partes aéreas de <i>Capraria biflora</i> L. | 11 |
| Figura 4 | Estruturas químicas de sesquiterpenos (Caprariolideos A-D) isolados das partes aéreas de <i>Capraria biflora</i> L. | 12 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1 | Espectro antimicrobiano e Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina em ensaio realizado no ano de 1954 pelo método de WAKSMAN-REILLY | 13 |
| Tabela 2 | Espectro antimicrobiano e Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina no primeiro ensaio realizado no ano de 1958 | 14 |
| Tabela 3 | Espectro antimicrobiano e Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina no segundo ensaio realizado no ano de 1958 | 15 |
| Tabela 4 | Espectro antimicrobiano e Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina obtida por um método sugerido para escala industrial no ano de 1962 | 16 |
| Tabela 5 | Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina e de seus produtos de degradação pela luz natural | 17 |
| Tabela 6 | Halos de inibição, expressos em mm, de diferentes concentrações de biflorina frente a fungos dermatófitos. | 18 |
| Tabela 7 | Atividade de diferentes concentrações de biflorina frente a leveduras. Halos expressos em mm. | 18 |
| Tabela 8 | Teores de umidade, cinzas totais e sílica de folhas secas de <i>Capraria biflora</i> L. | 21 |
| Tabela 9 | Teores de taninos, ânions e metais em amostras de folhas secas, e na forma de chá de <i>Capraria biflora</i> L. | 21 |
| Tabela 10 | Sistemas eluentes e reveladores utilizados no <i>screening</i> fitoquímico dos extratos hidroalcoólicos de raízes, caule e folhas de <i>Capraria biflora</i> L. | 24 |
| Tabela 11 | Rendimentos de extração na obtenção de extratos brutos para folhas caule e raízes de <i>Capraria biflora</i> L. | 25 |

Tabela 12 Resultados da triagem fitoquímica realizada com os extratos hidroalcoólicos de raízes, caule e folhas de *Capraria biflora* L.

25

RESUMO

Capraria biflora L. é uma espécie pertencente à família Scrophulariaceae, originária das Antilhas e América do Sul, sendo amplamente distribuída no continente americano. Dentre os usos populares, *C. biflora* L. pode ser utilizada contra dores no estômago, febres, gonorréia, como diurética, calmante e para o tratamento de problemas urinários. Dentre os constituintes químicos, pode-se isolar a biflorina, iridóides glicosídeos e sesquiterpenos. Os objetivos deste trabalho foram: realizar a padronização farmacognóstica da espécie; realizar a caracterização térmica e estudo cinético de degradação térmica da biflorina; validar um método de doseamento da biflorina em HPLC; e verificar o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas e da biflorina em processos de marcação com tecnécio-99m. A padronização botânica foi realizada segundo os procedimentos usuais, envolvendo o estudo histológico e histoquímico de raízes, caule e folhas. A partir do isolamento da biflorina do extrato bruto das raízes, procedeu-se a sua caracterização térmica, por análise das curvas TG e DSC, bem como foi realizado estudo cinético utilizando-se curvas TG, pelos métodos isotérmico e não-isotérmico. A validação do método de doseamento da biflorina foi realizado de acordo com as especificações da *Internacional Conference of Harmonization*, através da avaliação dos parâmetros linearidade, exatidão, precisão, e limites de detecção e quantificação. Para os ensaios de radiomarkação, avaliou-se o efeito da biflorina na marcação *in vitro* de elementos sanguíneos com Tc-99m, bem como o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. biflora* L. na marcação *in vitro* e *in vivo* de elementos sanguíneos com Tc-99m, na biodistribuição do radiofármaco, e na fragilidade osmótica e morfologia de hemácias marcadas com o radiofármaco. A caracterização farmacobotânica evidenciou características que foram consideradas importantes para o diagnóstico da espécie, tais como a presença de conspícuas células pétreas no caule e cutícula estriada nas folhas. Na caracterização térmica da biflorina, a curva TG revelou a presença de três estágios de decomposição, e a curva DSC apresentou cinco picos referentes à fases de transição. No estudo de degradação, em ambos os métodos, foi observado uma cinética de ordem zero, bem como determinou-se para cada método os parâmetros ordem da reação, energia cinética envolvida e fator de frequência. O método de doseamento proposto apresentou curto tempo de análise, uma linearidade satisfatória, exatidão próxima a 100% e coeficientes de variação menores que 6%. Os estudos *in vitro* comprovaram que a biflorina reduz a percentagem de radioatividade em células sanguíneas e proteínas plasmáticas, e a maior concentração utilizada não alterou a radioatividade em linfócitos. Foi observado que o extrato das folhas alterou *in vitro* a percentagem de radioatividade nas células sanguíneas e proteínas plasmáticas; *in vivo* alterou apenas as proteínas celulares; promoveu alterações morfológicas nas células sanguíneas incubadas *in vitro* e *in vivo*; e sua maior concentração utilizada não alterou a biodistribuição do Tc-99m e a radiomarkação em linfócitos. Os resultados obtidos neste trabalho com *C. biflora* L. serão de grande importância na padronização de futuras formas farmacêuticas contendo extratos ou princípios ativos isolados desta planta.

ABSTRACT

Capraria biflora L. is a specie from the Scrophulariaceae family, growing in the Antilles and South America, and is widely distributed in the american continent. In traditional medicine it is used against stomach aches, fevers, gonorrhea, as a diuretic, as a sedative and for the treatment of urinary problems. Biflorin, iridoid glycosides and sesquiterpens have been previously isolated from this specie. Objectives of this work were to establish pharmacognostical standardization of the specie; to perform a thermogravimetric analysis of biflorin and a kinetics of its thermal degradation; to validate a doseament method of biflorin using HPLC, and to verify the effect of the hydroalcoholic extract of leaves of *C. biflora* L. and the biflorin on the processes of labeling with tecnécio-99m. The botanical standardization was performed according to the established procedures, involving histological and histochemical studies of roots, stem and leaves. Biflorin was isolated from the crude extract of roots, and its thermal characterization was examined by analysis of the TG and DSC curves, and through the kinetic studies using the curves TG in isothermal and non-isothermal methods. The validation of the doseament method of biflorin was realized in accordance with the specifications of the International Conference of Harmonization, through the evaluation of the linearity parameters, accuracy, precision and the limits of detection and quantification. Radiolabeling assays were performed to verify the effects of biflorin on the labeling *in vitro* of blood elements with Tc-99m, and the hydroalcoholic extract on the labeling *in vitro* and *in vivo* of blood elements with Tc-99m, on the biodistribution of this radiopharmaceutical, and on the morphology of red blood cells labeled with the radiopharmaceutical. The presence of conspicuous stone cells in the stem and grooved cuticle in leaves is thought to be a pharmacobotanical characteristics important for the diagnosis of the species. The TG curve of a thermal degradation of biflorin showed three stages of its decomposition, whereas the DSC curve presented five peaks relating to the transition phases. In both methods of degradation a zero order kinetics was observed. It was determined for each method the involved kinetic energy. The doseament method used is short , shows satisfactory linearity, accuracy mean of 100% and coefficients of variation smaller than 6%. *In vitro* studies showed that biflorin reduces the plasmatic percentages of radioactivity in red blood cells and plasmatic proteins, and that the biggest concentration used did not change the radioactivity in lymphocytes. It was observed that (i) the extract of leaves modified the percentage of radioactivity in the red blood cells and plasma proteins *in vitro*; (ii) it modified only plasma proteins *in vivo*; (iii) it promoted morphological alterations in the red blood cells incubates *in vitro* and *in vivo*; and (iv) that its biggest concentration did not modify the biodistribution of the Tc-99m and the labeling in lymphocytes. The results presented here may be important for the standardization of future pharmaceutical forms containing the natural extracts or isolated compounds from this plant.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Em todas as culturas, desde a antigüidade, o ser humano vem utilizando as espécies vegetais para aliviar ou tratar suas enfermidades. Em registros datados de 1600 a.C., os egípcios já apresentavam estudos com cerca de oitocentas plantas de uso medicinal (Eldin & Dunford, 2001).

Estima-se que em todo o planeta existem cerca de 250.000 espécies de fanerógamos, sendo então uma enorme fonte de matéria-prima para a descoberta de novas substâncias químicas com potenciais atividades farmacológicas (Pinto, 1996). O Brasil é considerado um dos países mais promissores nesta área, pois suas florestas são altamente diversas, com cerca de 15 mil espécies diferentes de plantas (Panizza, 1999).

Cerca de 40% dos medicamentos produzidos no Brasil possuem princípios ativos retirados das plantas. Ainda assim, somente em 8% das espécies encontradas na flora brasileira foram realizados estudos químicos e biológicos que comprovam a ação terapêutica dessas plantas (Franco, 1996). Esses dados demonstram a importância da pesquisa científica envolvendo produtos naturais na descoberta de medicamentos que apresentem novas propriedades farmacológicas ou atividades superiores as substâncias já existentes no mercado farmacêutico, e com menos toxicidade ou efeitos colaterais.

Esta dissertação enfoca uma promissora espécie da flora brasileira pertencente à família Scrophulariaceae: *Capraria biflora* L. A família Scrophulariaceae compreende 200 gêneros e 3.000 espécies, distribuídas em todas as regiões, das tropicais até árticas e temperadas (Barroso, 1991). Dentre as espécies da família, *Digitalis purpurea* L. apresenta grande valor na medicina, devido ao isolamento dos digitálicos glicosídeos, e *Capraria biflora* L., a espécie de interesse neste trabalho, por possuir um princípio ativo denominado biflorina, que apresenta atividade antimicrobiana comprovada e baixo custo de extração.

Assim, este trabalho visa dar continuidade aos estudos desenvolvidos com *C. biflora* L., que foi dividido nas seguintes abordagens: estudo farmacobotânico através da caracterização microscópica, propiciando ensaios de controle de qualidade de amostras da espécie; estudos físico-químicos com a biflorina, pela realização da caracterização do princípio ativo por análise térmica, e desenvolvimento de metodologia de análise em HPLC (*High Performance Liquid Chromatographic*); ensaios biológicos utilizando extrato hidroalcoólico das folhas e biflorina em processos de radiomarcção utilizando o Tc-99m (Tecnécio-99m).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Capraria biflora L. vem sendo estudada desde a década de 50, compreendendo principalmente estudos fitoquímicos e de atividade antimicrobiana. Esta dissertação tem como principal objetivo dar continuidade aos estudos farmacobotânicos, fitoquímicos e biológicos com a espécie que possui várias utilizações na medicina popular, bem como continuar as abordagens com a biflorina que apresenta potente atividade antimicrobiana, sendo um princípio ativo promissor para utilização futura na terapêutica.

Dessa forma, objetivou-se mais especificamente:

- Realizar a padronização farmacognóstica de *Capraria biflora* L., através da caracterização histológica de suas raízes, caule e folhas;
- Desenvolver a caracterização térmica da biflorina através das curvas por TG (Termogravimetria) e DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) acoplado a sistema fotovisual;
- Realizar o estudo da cinética de degradação térmica da biflorina através das curvas TG pelos métodos isotérmico e não-isotérmico;
- Validar um método para doseamento da biflorina em HPLC.
- Avaliar o efeito da biflorina na marcação *in vitro* de hemácias, proteínas plasmáticas, proteínas celulares e linfócitos com Tc-99m;
- Verificar o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. biflora* L. na marcação *in vitro* e *in vivo* de hemácias, proteínas plasmáticas, proteínas celulares e linfócitos com Tc-99m, na biodistribuição do radiofármaco pertecnetato de sódio, na fragilidade osmótica e na morfologia de hemácias de amostras de sangue marcadas com Tc-99m.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Capraria biflora L. (Figura 1 A e B) é uma espécie pertencente à família Scrophulariaceae, originária das Antilhas e América do Sul, que habita zonas temperadas ou áreas de clima tropical (Matos, 1988). É uma planta que atinge até 150 cm de altura. Possui caule ramoso, ereto, com ramos alternos, cilíndricos, pubescentes e hirsutos. Suas folhas são alternas, chegando até 8cm de comprimento, oblongo-lanceoladas-agudas, serradas irregularmente, inteiras na base, cuneadas e estreitando-se para o pecíolo. As folhas são peninervadas, com nervura média saliente na página inferior. Suas flores são pequenas, brancas, pediceladas, geminadas, axilares e campanuladas. Possui segmentos linear-lanceolados, agudos e ligeiramente ciliado-cerrados. Os frutos possuem formato de uma cápsula ovado-oblonga, glabra, contendo sementes rugosas, escuras e oblongo-cuneadas. Suas raízes são numerosas e longas, tortuosas, apresentando cor parda escura (Corrêa, 1931; Matos, 1988).



Figura 1. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae).

A espécie é amplamente distribuída no continente americano, em países como Peru, Guiana Francesa, Trinidad-Tobago, México, Curaçao, Guatemala e Bahamas. No Brasil, distribui-se nos estados de Minas Gerais, Goiás e na faixa litorânea entre o Piauí e Espírito Santo (Menezes, 1949).

Dentre os nomes populares, é conhecida no Brasil como chá-da-terra, chá-do-méxico, chá-da-martinica, chá-de-goteira, chá-de-pé-da-calçada, chá-do-rio, chá-da-américa, chá-das-antilhas, chá-de-lima, bem como chá-de-marajó, chá-da-balsaminha, chá-do-maranhão, chá-bravo e chá-de-preto (Le Cointe, 1947; Lorenzi & Matos, 2002). Em outros países, pode ter as seguintes denominações: *earache bush*, *granny-bush*, *worry-bush* e *obeah-bush* nas Bahamas (Eldridge, 1975); *claudiosa* e *claviosa* na Guatemala (Comerford, 1996); *tanchi* em Curaçao (Morton, 1968); *epazotillo* e *sqeja lipajni* no México (Alfaro, 1984); *dité peyi* e *du thé pays* em Trinidad-Tobago (Wong, 1976); *thé de pays* na Guiana Francesa (Luu, 1975); *te del peru* no Peru (Caminhoá, 1884).

Existem poucos relatos na literatura em relação a efeitos tóxicos quanto a infusão das folhas ou utilização das raízes de *C. biflora* L. Porém, sabe-se que altas doses da infusão de suas folhas podem causar sonolência, rigidez muscular, tontura e vertigem (Matos, 1988).

3.1. USOS POPULARES

Diversas utilizações populares estão associadas à *C. biflora* L. A espécie poderia substituir o chá-da-índia para o combate de dores no estômago, dispepsia, bem como ser utilizada em associação com outras plantas como febrífuga, diurética, estimulante e digestiva (Corrêa, 1931).

No Brasil, tem-se relatos da utilização de uma associação de plantas, incluindo a *C. biflora* L., como diurética, calmante, bem como para o tratamento de afecções no aparelho

urinário (Cordeiro, 1996), enquanto que o infuso feito com suas folhas e extremidades floridas pode ser utilizado como estomacal, sudorífero, febrífugo e para afecções do trato urinário (Lorenzi & Matos, 2002).

Em países da América do Sul, como Trinidad, Peru e Guiana Francesa, as folhas de *C. biflora* L. são usadas contra febres, gripes, dismenorréia, urticária, vômitos, sarampo, e para lavagens oftálmicas (Wong, 1976). O seu decocto, por via oral, é utilizado como estimulante, colagogo, adstringente, estupefaciente, bem como na cura de feridas e paralisia dos músculos (Luu, 1975; Ramirez *et al*, 1988).

Em países das Américas Central e do Norte, como Guatemala, Bahamas, Curaçao e México, a decoção das folhas é indicada para o tratamento de edemas e câimbras nas pernas, dores no corpo e dores no estômago, bem como para problemas urinários (Perez *et al*, 1984; Comerford, 1996). A infusão das folhas é indicada em casos de indigestão, diarreia e afecções ovarianas. O extrato aquoso quente das folhas é indicado para diabetes, diarreia, gonorréia, debilidade geral, ducha vaginal bem como para perda de memória (Morton, 1968; Ayensu, 1978). Na Índia, utiliza-se o extrato quente para casos de febre, diarreia e dismenorréia (Ayensu, 1978). A infusão e decoção das folhas é utilizada para diabetes, e no intuito de apressar o parto e diminuir a dor (Eldridge, 1975).

3.2. CONSTITUÍNTES QUÍMICOS

Os primeiros trabalhos fitoquímicos realizados com *C. biflora* L. foram desenvolvidos por Gonçalves de Lima *et al.* (1953), que isolaram, a partir das raízes da planta, um princípio ativo que apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, álcool-ácido-resistentes e alguns fungos. A substância isolada foi denominada biflorina (Figura 2). Ainda

no mesmo ano, o espectro de ação da biflorina foi comprovado pelo laboratório Eli Lilly de Indianápolis-EUA (Mc Cowen & Stone, 1953).

No ano seguinte, desenvolveu-se um método para obtenção de cristais mais puros da biflorina. Estes cristais apresentaram atividade mais elevada frente a microrganismos Gram-positivos, em comparação com os primeiros cristais purificados, bem como apresentaram atividade frente a outros microrganismos que ainda não tinham sido testados (Gonçalves de Lima *et al.*, 1954).

Em 1958, desenvolveu-se um método com um melhor rendimento de purificação da biflorina, em comparação com os descritos anteriormente na literatura. No mesmo ano, as características físicas e químicas da biflorina foram elucidadas, utilizando-se os métodos de absorção no UV (Ultravioleta), IV (Infravermelho) e Análise Elementar, comprovando-se então a sua estrutura o-quinônica policíclica (Figura 1) (Prelog *et al.*, 1958; Comin, *et al.*, 1963; Grant *et al.*, 1963). No ano de 1962, devido a uma impossibilidade do desenvolvimento de uma rota de síntese da biflorina, foi elaborado um novo método de extração e purificação do princípio ativo, visando atender exigências industriais da época (Gonçalves de Lima *et al.*, 1958; Gonçalves de Lima *et al.*, 1962).

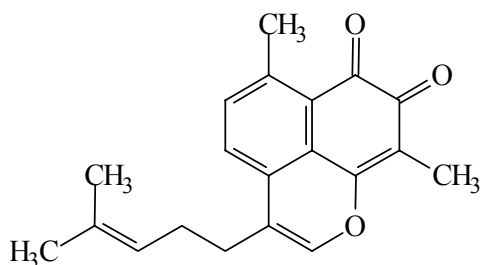


Figura 2. Estrutura química da biflorina isolada a partir das raízes de *Capraria biflora* L.

Heinrich e Rimpler, em 1989, isolaram dois glicosídeos de iridóides a partir das partes aéreas, sendo uma molécula com estrutura conhecida, harpagida, e a outra com um novo esqueleto, denominado 8-O-benzoilarpagida (Figura 3).

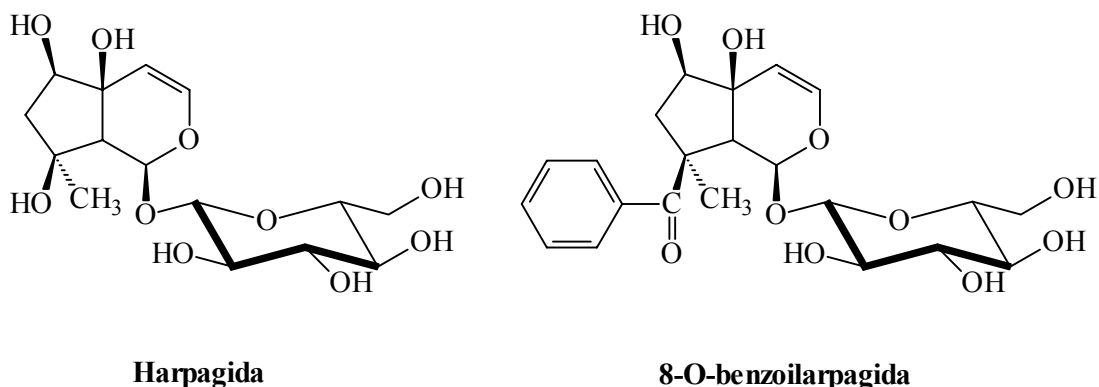


Figura 3. Estruturas químicas de iridóides glicosídeos isolados a partir das partes aéreas de *Capraria biflora* L.

Em 1999, Lyra Júnior retomou os estudos envolvendo a estrutura química da biflorina, com o intuito de comprovar o seu esqueleto carbônico anteriormente proposto. Foram realizados estudos de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) Protônica e de Carbono 13, Espectrometria de massas, Espectroscopia de absorção no IV e UV, os quais permitiram a sua confirmação estrutural.

Estudos realizados por Collins *et al.*(2000), evidenciaram a presença de isômeros sesquiterpênicos, os quais também foram isolados a partir das partes aéreas, sendo denominados Caprariolideos A-D (Figura 4).

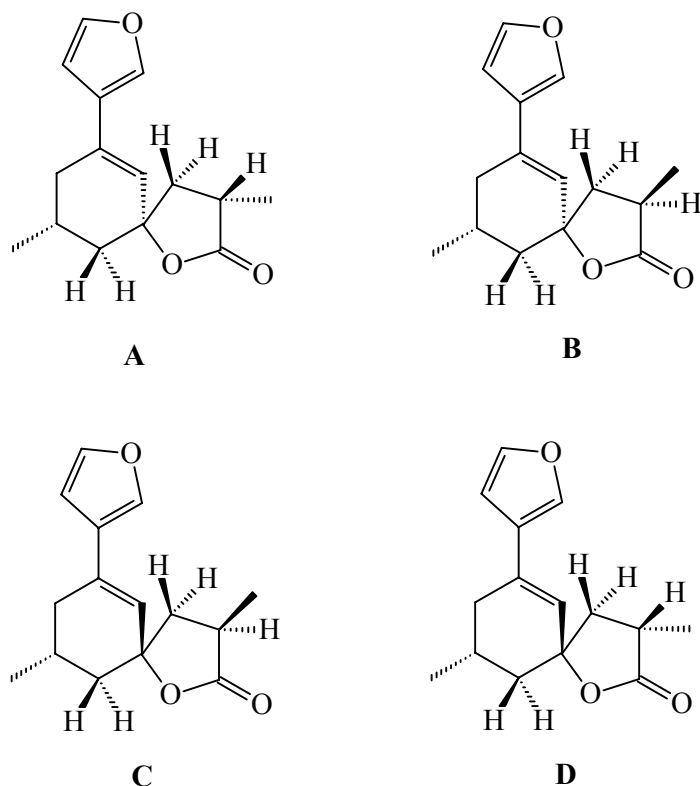


Figura 4. Estruturas químicas de sesquiterpenos (Caprariolideos A-D) isolados das partes aéreas de *Capraria biflora* L.

3.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Diversos ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados com a biflorina. Cada método diferente de obtenção da substância era seguido de teste para identificação da atividade da mesma. As tabelas 1 a 4 mostram os resultados de atividade da biflorina frente a vários microrganismos testados. Nota-se que no ano de 1958 (Tabelas 2 e 3), foram realizados dois ensaios distintos, diferenciados pelo grau de pureza em que se encontrava a biflorina obtida. Em geral, pode-se observar que a medida que se avançavam os estudos para a obtenção da biflorina, tinha-se como resultado uma substância mais pura, com um menor valor de CMI (Concentração Mínima Inibitória), conseqüentemente mais ativa (Gonçalves de

Lima *et al.*, 1954; Gonçalves de Lima & D’Albuquerque, 1958; Gonçalves de Lima *et al.*, 1958). Em 1962, desenvolveu-se um método de extração da biflorina, com o intuito de se tornar industrialmente viável. O produto obtido apresentou as mesmas características físicas em comparação com os métodos anteriores, porém para vários microrganismos testados, ocorreu um aumento da CMI (Gonçalves de Lima *et al.*, 1962).

Tabela 1. Espectro antimicrobiano e Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina em ensaio realizado no ano de 1954 pelo método de WAKSMAN-REILLY (Gonçalves de Lima *et al.*, 1954).

| Microrganismos | CMI (µg/mL) |
|---|-------------|
| <i>Micrococcus pyogenes var. aureus</i> | 5,25 |
| <i>Micrococcus pyogenes var. albus</i> | 2,7 |
| <i>Micrococcus pyogenes var. citreus</i> | 0,16 |
| <i>Sarcina lutea</i> | 0,15 |
| <i>Bacillus subtilis 9</i> | 0,81 |
| <i>Bacillus subtilis 27</i> | 00 |
| <i>Bacillus mycoides</i> | 0,05-2,7 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | 0,2 |
| <i>Mycobacterium phlei</i> | 0,81 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> | 8,1 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis hominis</i> | 0,54 |
| <i>Brucella suis</i> | 2,7 |
| <i>Brucella melitensis</i> | 1,35 |
| <i>Brucella abortus</i> | 13,5 |
| <i>Corinebacterium dyptheride</i> | 1,35 |
| <i>Escherichia coli R</i> | >100 |
| <i>Escherichia coli S</i> | >100 |
| <i>Shigella paradysenteriae</i> | >100 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | >100 |

Tabela 2. Espectro antimicrobiano e Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina no primeiro ensaio realizado no ano de 1958 (Gonçalves de Lima & D'Albuquerque, 1958).

| Microrganismos | CMI (µg/mL) |
|--|-------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> 9 | 0,3 |
| <i>Bacillus subtilis</i> 27 | 0,1 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | 0,2 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,2-0,4 |
| <i>Bacillus mycoides</i> | 0,20-0,40 |
| <i>Sarcina lutea</i> | 0,09 |
| <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> | 0,2 |
| <i>Streptococcus hemolyticus</i> | 0,8-1,0 |
| <i>Escherichia coli</i> R | >100 |
| <i>Brucella suis</i> | 0,4 |
| <i>Brucella melitensis</i> | 0,8 |
| <i>Brucella abortus</i> | >10 |
| <i>Candida albicans</i> 50 | 50-70 |
| <i>Candida albicans</i> IHM | 50-70 |
| <i>Candida tropicalis</i> | 50-70 |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | 70-100 |
| <i>Candida krusei</i> | 100 |
| <i>Candida parakrusei</i> | 70-100 |
| <i>Candida stellatoidea</i> | 70-100 |
| <i>Candida</i> sp. ME-51 | 70-100 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> ENCB | 1,0-1,5 |

Tabela 3. Espectro antimicrobiano e Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina no segundo ensaio realizado no ano de 1958 (Gonçalves de Lima *et al.*, 1958).

| Microrganismos | CMI (µg/mL) |
|-----------------------------------|-------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> 9 | 0,05 |
| <i>Bacillus subtilis</i> 28 | 0,01 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | 0,07 |
| <i>Bacillus mycoides</i> | 0,15 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATTC | 0,09 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> W | 0,07 |
| <i>Diplococcus pneumoniae</i> | 0,7 |
| <i>Sarcina lutea</i> | 0,01 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 0,7 |
| <i>Neisseria catharralis</i> | 0,45 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 0,25 |
| <i>Mycobacterium phlei</i> | 0,07 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> | 0,35 |
| <i>Nocardia asteroides</i> | 0,6 |
| <i>Escherichia coli</i> R | >100 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | >100 |
| <i>Shigella flexneri</i> | >100 |
| <i>Salmonella typhosa</i> | >100 |
| <i>Brucella melitensis</i> | 0,3 |
| <i>Brucella suis</i> | 1,5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 100 |

Tabela 4. Espectro antimicrobiano e Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina obtida por um método sugerido para escala industrial no ano de 1962 (Gonçalves de Lima *et al.*, 1962).

| Microrganismos | CMI (µg/mL) |
|---|-------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> 9 | 0,8-1,0 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | 0,2-0,4 |
| <i>Bacillus mycoides</i> | 0,8-1,0 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,6-0,8 |
| <i>Sarcina lutea</i> | 0,8-1,0 |
| <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>citreus</i> | 0,06-0,08 |
| <i>M. pyogenes</i> var. <i>aureus</i> | 0,6-0,8 |
| <i>Escherichia coli</i> N | >100 |
| <i>Shigella paradysenteriae</i> | >100 |
| <i>Salmonella typhi</i> | >100 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | >100 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis hominis</i> | 10-20 |
| <i>Mycobacterium phlei</i> | 0,8-1,0 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> | 20-40 |
| <i>Brucella suis</i> | 20-40 |
| <i>Brucella melitensis</i> | 10-20 |
| <i>Brucella abortus</i> | >100 |
| <i>Candida albicans</i> 50 IBB | 8-10 |
| <i>Candida albicans</i> IHM | 8-10 |
| <i>Candida krusei</i> | 80-100 |
| <i>Candida tropicalis</i> | 60-80 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 40-60 |

Estudos realizados por Gonçalves de Lima *et al.*, (1961), comprovaram experimentalmente a fotossensibilidade da biflorina, verificando sua degradação por exposição à luz natural. Foi observado que seu produto de degradação continha duas substâncias, uma solúvel e outra insolúvel em éter de petróleo, e que ambas apresentavam atividade antimicrobiana menor em relação a própria biflorina, como mostrado na tabela 5.

Tabela 5. Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da biflorina e de seus produtos de degradação pela luz natural (Gonçalves de Lima *et al.*, 1961).

| Microrganismos | CMI (µg/mL) | | |
|----------------------------------|-------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | Biflorina | Produto solúvel em éter de petróleo | Produto insolúvel em éter de petróleo |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 0,8-1,2 | 50,0 | 8,0-10,0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,2-1,6 | 50,0 | 6,0-8,0 |
| <i>Sarcina lutea</i> | 0,1-0,2 | 40,0-50,0 | 1,0-2,0 |
| <i>Streptococcus hemolyticus</i> | 20,0 | 50,0 | 50,0 |
| <i>Escherichia coli</i> N | 20,0 | 50,0 | 50,0 |
| <i>Brucella suis</i> | 3,2-4,0 | 30,0-40,0 | 10,0-20,0 |
| <i>Mycobacterium humanus</i> | 20,0 | 50,0 | 40,0-50,0 |
| <i>Nocardia asteroides</i> | 6,0-8,0 | 50,0 | 10,0-20,0 |
| <i>Candida albicans</i> | 1,6-3,2 | 50,0 | 8,0-10,0 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 20,0 | 50,0 | 50,0 |

Lyra Júnior, em 1999, realizou novos ensaios de atividade antimicrobiana com a biflorina, frente a fungos dermatófitos e leveduras, utilizando-se principalmente cepas de *Candida albicans*. Os resultados dos halos de inibição encontram-se nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Halos de inibição, expressos em mm, de diferentes concentrações de biflorina frente a fungos dermatófitos (Lyra Júnior *et al.*, 1999).

| Microorganismos | Halos de inibição (mm) | | | |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Biflorina 0,1mg/100mL | Biflorina 0,5mg/100mL | Biflorina 1,0mg/100mL | Biflorina 5,0mg/100mL |
| <i>Epidermophyton floccosum</i> | 09 | 12 | 15 | 16 |
| <i>Microsporum canis</i> | 14 | 15 | 18 | 20 |
| <i>Trichophyton gypseum</i> | 00 | 00 | 00 | 00 |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 14 | 15 | 17 | 18 |
| <i>Trichophyton rubrum</i> | 09 | 10 | 11 | 13 |
| <i>Trichophyton schoenlyni</i> | 16 | 20 | 22 | 25 |
| <i>Trichophyton sp</i> | 13 | 15 | 16 | 17 |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> | 10 | 10 | 12 | 15 |

Tabela 7. Atividade de diferentes concentrações de biflorina frente a leveduras. Halos expressos em mm (Lyra Júnior *et al.*, 1999).

| Microorganismos | Halos de inibição (mm) | | | |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Biflorina 0,1mg/100mL | Biflorina 0,5mg/100mL | Biflorina 1,0mg/100mL | Biflorina 5,0mg/100mL |
| <i>Candida albicans</i> n° 6148 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| <i>Candida albicans</i> n° 6286 | 15 | 15 | 17 | 18 |
| <i>Candida albicans</i> n° 6298 | 10 | 12 | 13 | 15 |
| <i>Candida albicans</i> n° 6302 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| <i>Candida albicans</i> n° 6307 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| <i>Candida albicans</i> n° 6332 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| <i>Candida albicans</i> n° 6370 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| <i>Candida albicans</i> n° 6372 | 20 | 20 | 21 | 23 |
| <i>Candida tropicalis</i> n° 1150 | 14 | 14 | 15 | 16 |

Estudos constataram que em diferentes valores de pH ocorrem alterações na atividade antimicrobiana da biflorina, que apresenta uma maior ação quando submetida a análise em pH 9,0, em comparação com o pH 7,2, frente a *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium tuberculosis homini* (Gonçalves de Lima *et al.*, 1954).

Em estudos de atividade moluscicida realizados com diversas plantas do Nordeste Brasileiro, constatou-se que os extratos aquoso e etanólico (95%) das raízes de *Capraria biflora* L. não apresentaram atividade citotóxica frente a *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata*, e o extrato etanólico frente a *Blastophagus piniperda* (Silva *et al.*, 1971; Souza *et al.*, 1974).

Experimentos de citotoxicidade com células CA-9KB indicaram que o extrato das raízes de *C. biflora* L. apresentou uma DE₅₀ (Dose Efetiva 50) igual a 3µg/mL (Nascimento *et al.*, 1984). Segundo os autores, o material apresenta considerável atividade antitumoral frente as células testadas, sendo indicado para futuros testes *in vivo*, os quais basearam-se nos protocolos do “*National Cancer Institute-USA*”.

Pérez *et al.* (1984) realizaram estudos com algumas plantas mexicanas, com o intuito de avaliar seus efeitos antihiperclêmicos em hiperglicemia induzida com aloxano. Os resultados indicaram que o extrato aquoso das folhas (50g em 250mL de água) de *C. biflora* L., através de administrações orais e intraperitoniais em ratos, apresentaram relativa atividade.

Dentre os sesquiterpenos isolados por Collins *et al.* (2000), os isômeros A e B apresentaram atividade inseticida contra *Cylas formicarius elegantulus* adulto, agente da peste destrutiva em batata doce (*Ipomoea* sp.).

3.4. ESTUDO DE CASO

Em 1958 foi preparada uma pasta com 1% de biflorina cristalizada, a qual foi utilizada em um paciente de 14 anos, do sexo masculino, com “lesão eritematosa peribucal, abrangendo a parte externa dos lábios, a qual se estendia para cima até a altura do nariz, para baixo em toda a região mentoniana e lateralmente, sobre a face, até uns 5 cm além da comissura labial. A pele da área atingida apresentava-se edematosa com uma coloração vermelho forte e deixava exudar constantemente líquido claro e de cheiro pútrido em face do que o paciente mantinha constantemente um lenço sobre a lesão. No caso, o paciente queixava-se de forte sensação de ardência e prurido na zona afetada”. Após coleta em diferentes pontos da lesão foi possível isolar um fungo identificado como *Trichosporon margaritipherum*. O paciente iniciou o uso da pasta de biflorina a 1%, veiculada em lanolina e vaselina, duas vezes ao dia. Após dois dias, a lesão apresentava-se com cor rósea, sem exudação, sem prurido e sem o odor pútrico. Após mais quatro dias o aspecto da pele em toda a área atingida era quase normal. O veículo da pasta foi trocado por uma substância de maior penetração, polietilenoglicol, constatando-se, após mais uma semana, o desaparecimento completo de qualquer vestígio de eritema (Serpa, 1958).

3.5. ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

A biflorina, extraída a partir das partes aéreas de *C. biflora* L., apresenta-se sob a forma de agulhas finas ou placas aciculadas, de cor âmbar, após recristalização em éter de petróleo. Seu ponto de fusão é 159 °C. Apresenta grande solubilidade em metanol, benzeno, etanol, propanol, butanol, dietilenoglicol, acetona, acetato de amila, ácido acético, éter de petróleo, hexano, tolueno e fenilalanina. Em etilenoglicol, glicerina, bicarbonato de sódio 5%,

hidróxido de sódio 5% e água, a substância é pouco solúvel, e praticamente insolúvel em ácido clorídrico 5% (Gonçalves de Lima *et al.*, 1954).

Ainda em relação à biflorina, foi observada termoestabilidade a 100°C em dietilenoglicol, e a 70 °C por 30 minutos em solução pH 6,0 (Gonçalves de Lima *et al.*, 1954).

Morais *et al.*, (1995), realizaram ensaios analíticos com *C. biflora* L., utilizando suas folhas secas, ou na forma de chá (4 g/100mL). Para as folhas secas, foram determinados os teores de umidade, cinzas totais e sílica. Com o chá, determinou-se o pH, e teores de tanino, cloreto, fosfato, potássio, sódio, cálcio, magnésio, alumínio e ferro. O pH do chá na concentração mencionada foi 6,5, durante cinco dias de análise. Os teores estão indicados nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Teores de umidade, cinzas totais e sílica de folhas secas de *Capraria biflora* L.

| Amostra | Teores (%) | | |
|--|------------|---------------|--------|
| | Umidade | Cinzas totais | Sílica |
| <i>C. biflora</i> L. (folhas secas) | 79,16 | 20,11 | 0,24 |

Tabela 9. Teores de taninos, ânions e metais em amostras de folhas secas, e na forma de chá de *Capraria biflora* L.

| Amostra | Teores (mg/100mL) | | | | | | | | |
|---|-------------------|-----------------|-------------------------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Tanino | Cl ⁻ | PO ₄ ³⁻ | K ⁺ | Na ⁺ | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | Al ³⁺ | Fe ²⁺ |
| <i>C. biflora</i> L. (chá) | 335,17 | 218,33 | 88,35 | 8,00 | 0,97 | 15,00 | 76,44 | 00 | 00 |
| <i>C. biflora</i> L. (soluções ácidas das cinzas) | 00 | 00 | 00 | 225,00 | 52,50 | 112,07 | 198,92 | 12,67 | 0,25 |

4. PROCEDIMENTOS INICIAIS

4. PROCEDIMENTOS INICIAIS

Capraria biflora L. foi coletada na ilha de Itamaracá, litoral norte do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). Material testemunho encontra-se depositado no herbário do Instituto de Pesquisas Agropecuária (IPA) sob o número 57.902.

A planta fresca foi submetida à secagem à temperatura ambiente por 120 h. Em seguida, as folhas, caule e raízes foram separados, triturados e pesados. Extratos brutos de ambas as partes foram obtidos através de extrações sucessivas até esgotamento, com álcool etílico 96 °GL (Graus Gay-Lussac). Após, foram concentrados à pressão reduzida sob temperatura controlada. Para cada uma das partes da planta, realizou-se o cálculo de rendimentos das extrações.

Realizou-se uma triagem fitoquímica das soluções de ambos os extratos, utilizando-se cromatoplas Merck sílica gel 60. Os sistemas eluentes e reveladores estão ilustrados na tabela a seguir (Tabela 10).

Tabela 10. Sistemas eluentes e reveladores utilizados na triagem fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de raízes, caule e folhas de *Capraria biflora* L.

| Classe fitoquímica | Sistema eluente | Revelador | Referência |
|---|---|----------------------------|-----------------------------|
| Alcalóides | AcOEt / HCOOH / AcOH / H ₂ O 100:11:11:27 | Dragendorff | Wagner, 1996 |
| Mono, Sesqui e Diterpenóides | Benzeno / AcOEt 97:3 | Vanilina sulfúrica | Wagner, 1996 |
| Triterpenóides e Esteróides | AcOEt / HCOOH / AcOH / H ₂ O 100:0,5:0,5:0,5 | Liberman / Burchard | Harborne, 1982 |
| Saponinas | AcOEt / HCOOH / AcOH / H ₂ O 100:11:11:27 | Vanilina sulfúrica | Wagner, 1996 |
| Açúcares e poliois | n-BuOH / Me ₂ CO / tamp. Fosfato pH=5 40:50:10 | Trifeniltetrazólio | Metz, 1961 |
| Iridóides | AcOEt / HCOOH / AcOH / H ₂ O 100:11:11:27 | Vanilina sulfúrica | Wagner, 1996 |
| Flavonóides | AcOEt / HCOOH / AcOH / H ₂ O 100:11:11:27 | Difenilboriloxidietilamina | Markham, 1982; Wagner, 1996 |
| Fenilpropanoglicosídeos | AcOEt / HCOOH / AcOH / H ₂ O 100:11:11:27 | NEU | Wagner, 1996 |
| Leucoantocianidinas e Proantocianidinas condensadas | AcOEt / HCOOH / AcOH / H ₂ O 100:11:11:27 | Vanilina clorídrica | Robertson, 1955 |

O extrato bruto das raízes foi submetido à coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel tolueno/acetato de etila 80:20, e como fase estacionária sílica gel 60 (230 - 400 mesh) da Vetec.

Na tabela 11 encontram-se os rendimentos obtidos para os extratos de raízes, caule e folhas.

Tabela 11. Rendimentos de extração na obtenção de extratos brutos para folhas caule e raízes de *Capraria biflora* L.

| Parte da planta | Peso inicial (g) | Peso do extrato obtido (g) | Rendimento (%) |
|-----------------|------------------|----------------------------|----------------|
| Folhas | 803 | 56,55 | 6,81 |
| Caule | 2.513 | 44,5 | 1,77 |
| Raízes | 742 | 31,38 | 4,26 |

Os resultados da triagem fitoquímica realizado com os extratos obtidos de *Capraria biflora* L. estão mostrados na tabela 12.

Tabela 12. Resultados da triagem fitoquímica realizada com os extratos hidroalcoólicos de raízes, caule e folhas de *Capraria biflora* L.

| Classe fitoquímica | Extratos hidroalcoólicos | | |
|---|--------------------------|-------|--------|
| | Raízes | Caule | Folhas |
| Alcalóides | - | - | - |
| Mono, Sesqui e Diterpenóides | + | + | + |
| Triterpenóides e Esteróides | + | + | + |
| Saponinas | - | - | - |
| Açúcares e poliois | + | + | + |
| Iridóides | - | - | - |
| Flavonóides | + | + | + |
| Fenilpropanoglicosídeos | + | + | + |
| Leucoantocianidinas e Proantocianidinas condensadas | + | - | - |

(-) ausência; (+) presença

No ensaio para a identificação de fenilpropanoglicosídeos, em ambos os extratos ocorreram o aparecimento de manchas com o mesmo valor de R_f que o verbascosídeo, e na identificação de triterpenóides e esteróides, ocorreram o aparecimento de substâncias com os mesmos valores de R_f que o β -sitosterol e β -amirina.

Extrato bruto das raízes (31,38 g) após cromatográfica em coluna forneceu uma fração de coloração roxa que foi evaporada à pressão reduzida, e recristalizada em éter diisopropílico, obtendo-se 701,9 mg de biflorina sob a forma de cristais violáceos, com um rendimento de 2,23% em relação ao extrato bruto. Este foi realizado baseando-se em trabalhos desenvolvidos principalmente por Gonçalves de Lima *et al.*, os quais tinham como objetivo principal a elaboração de um método de extração da biflorina que apresentasse um rendimento satisfatório (Gonçalves de Lima *et al.*, 1953; Gonçalves de Lima *et al.*, 1954; Gonçalves de Lima *et al.*, 1958; Prelog *et al.*, 1958; Gonçalves de Lima *et al.*, 1962;. Comin, *et. al.*, 1963; Grant *et. al.*, 1963).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFARO, M. A. M. **Medicinal Plants Used in a Totonac Community of the Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, México.** Journal of Ethnopharmacology 11, p. 203-221, 1984.
- AQUINO, T. M.; AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P. **Padronização Botânica de *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae).** Acta Farm. Bonaerense 20 (4), p. 259-63, 2001.
- AYENSU, E. S. **Medicinal Plants of the West Indies.** Unpublished Manuscript, p. 110, 1978.
- CAMINHOÁ, J. M. **Compêndio de Botânica Geral e Médica.** 6ª ed., Rio de Janeiro, Tipografia Nacional, p. 2772, 1884.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** V. 3. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 326p., 1991.
- COLLINS, D. O.; GALLIMORE, W. A.; REYNOLDS, W. F.; WILLIAMS, L. A. D.; REESE, P. B. **New Skeletal Sesquiterpenoids, Caprariolides A-D, from *Capraria biflora* and Their Insecticidal Activity.** Journal Natural Products 63, p. 1515-1518, 2000.
- COMERFORD, S. C. **Medicinal Plants of Two Mayan Healers from San Andrés, Petén, Guatemala.** Economic Botany (50), p. 327-336, 1996.
- COMIN, J.; GONÇALVES DE LIMA, O.; GRANT, H. N.; JACKMAN, L. M. & KELLERSCHIERLEIN, W. **Über die Konstitution des Biflorins, eines O-chinons der Diterpenreihe.** Helv. Chim. Acta 46, p. 409, 1963.
- CORDEIRO, R.; NUNES, V. A.; ALMEIDA, C. R. **Plantas Que Curam.** (1) p. 145. São Paulo, 1996.

- CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura 2, p. 205, 1931.
- ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde**. São Paulo, Manole, 163p., 2001.
- ELDRIDGE, J. **Bush Medicine in the Exumas and Long Island, Bahamas: A Field Study**. Economic Botany 29, p. 307-332, 1975.
- FRANCO, L. L. **As Sensacionais 50 Plantas Medicinais, Campeãs de Poder Curativo**. Curitiba, O Naturista, vol. 1, 235 p., 1996.
- GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L. **Método Simples de Extração da Biflorina**. Rev. Inst. Antibiot. 1, p. 7-9, 1958.
- GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LOUREIRO, P.; CARMONA, C. L.; BERNARD, M. Z. **Biflorina, Novo Antibiótico, Isolado da *Capraria biflora***. Rev. Quím. Industrial 14, p. 2-3, 1953.
- GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LOUREIRO, P.; CARMONA, C. L.; BERNARD, M. Z. **Novas Observações Sobre a Biflorina, Antibiótico Isolado da *Capraria biflora* L.** Rev. Quím. Industrial 249, p. 28-30, 1954.
- GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; NAVARRO, M. C. P. **Novo Método de Extração e Purificação da Biflorina com Possibilidade Industrial**. Rev. Inst. Antibiot. 1/2, p. 79-81, 1962.
- GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; NETO, B. M.; ALBUQUERQUE, M. M. **Breve Nota Sobre a Atividade Antimicrobiana da Biflorina Purificada por Partição Graig**. Rev. Inst. Antibiot. 1/2, p. 95-97, 1958.
- GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; MAIA, D.; BORBA, M. A. **Ação da Luz Sobre a Biflorina**. Rev. Inst. Antibiot. 3, p. 97-100, 1961.

- GRANT, H. N.; PRELOG, V. & SNEEDEN, R. P. A. **Sinthese eines 1-oxa-phenalen-derivatives mit dem Chromophoren System des Biflorins.** Helv. Chim. Acta 46, p. 415, 1963.
- HARBONE, J. B. **Phytochemical methods.** 2^a ed., London, Chapman & Hall, 288p., 1982.
- HEINRICH, M.; RIMPLER, H. **Harpagide and 8-O-Benzoylharpagide from the Mixe Medicinal Plant *Capraria biflora*.** Planta Medica 55, p. 626, 1989.
- LE COINTE, P. **Amazônia Brasileira: Árvores e Plantas Úteis.** São Paulo, Nacional, v. 251/3, p. 140, 1947.
- LYRA JÚNIOR, D. P. **Isolamento, Atividade Antifúngica e Validação do Método de Doseamento da 3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinona - Biflorina.** Recife, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, 1999, 106p. Dissertação de Mestrado.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil : Nativas e Exóticas Cultivadas.** Instituto Plantarum. p. 512, 2002.
- LUU, C. **Notes on the Tradicional Pharmacopeia of French Guyana.** Plant. Med. Phytoter. 9, p. 125-135, 1975.
- MARKHAN, K. R. **Techniques of Flavonoid Identification.** London, Acad. Press, p. 52-61, 1982.
- MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais.** Univ. Aberta. p. 2, 1988.
- MCCOWEN, M. C.; STONE, R. L. **Eli Lilly Research Records.** (18.953) Indianápolis, 1953.
- MENEZES, A. I. **Flora da Bahia.** São Paulo, Nacional, v. 264, p. 208, 1949.
- METZ, H. Naturwissenschaften. 48, 596, 1961.
- MORAIS, N. M. T.; NOGUEIRA, C. M. D.; LOPES, M. F. G.; VASCONCELOS, N. M. S.; SÁ, M. J. H. C. **Estudo Inorgânico Analítico de Plantas Medicinais.** Anais Ass. Bras. Quím. 44/4, 14-19, 1995.

- MORTON, J. F. **A Survey of Medicinal Plants of Curaçao.** Economic Botany 22, p. 87-102, 1968.
- NASCIMENTO, S. C.; MÉLLO, J. F.; CHIAPPETA, A. A. **Agentes Citotóxicos. Experimentos com Células KB.** Revista do Instituto de Antibióticos do Recife 22 1/2, p. 19-26, 1984/5.
- PANIZZA, S. **Plantas que Curam**, 20ª ed., São Paulo, Ibrasa, 279 p. 1999.
- PÉREZ G., R. M.; OCEGUEDA Z., A.; MUNOZ L., J. L.; AVILA A., J. G.; MORROW, W. W. **A Study of the Hypoglucemic Effect of Some Mexican Plants.** Journal of Ethnopharmacology 12, p. 253-262, 1984.
- PINTO, A. C. **O Papel da Fitoquímica na Obtenção de Fármacos.** In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Anais, Florianópolis, Edeme, 1996.
- PRELOG, V.; GONÇALVES DE LIMA, O. & KELLER-SCHIERLEIN, W. **Über das Biflorin.** Helv. Chim. Acta 41, p. 1386-1390, 1958.
- RAMIREZ, V. R.; MOSTACERO, L. J.; GARCIA, A. E.; MEJIA, C. F. **Vegetales Empleados en Medicina Tradicional Norperuana.** Banco Agrario del Peru & Nacional Universidad Trujillo. p. 54, 1988.
- SERPA, J. **Ticosporonose Cutânea Curada com Biflorina.** Anal. Fac. Med. Recife 18, p. 33-37, 1958.
- SILVA, M. J.; SOUZA, M. P.; ROUQUAYROL, M. Z. **Atividade Moluscicida de Plantas do Nordeste Brasileiro II.** Revista Brasileira de Farmácia Maio/Junho, p. 117-123, 1971.
- SOUSA, M. P. & ROUQUAYROL, M. Z. **Molluscicidal Activity of Plants from Northeast Brazil.** Rev. Brasil. Pesq. Med. Biol. 7/4, 389-394, 1974.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis.** 2ª ed., New York, Springer, p. 385, 1996.
- WONG, W. **Some Folk Medicinal Plants from Trinidad.** Economic Botany 30, p. 103-142, 1976.

6. FARMACOBOTÂNICA

6. FARMACOBOTÂNICA

ARTIGO PUBLICADO

Autores: AQUINO, T. M.; AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P.

Título: Padronização Botânica de *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae).

Revista: Acta Farmacêutica Bonaerence.

Volume: 20 (4).

Páginas: 259-263.

Ano: 2001.

PS: As fotos a partir das quais foram obtidas as figuras do artigo encontram-se no anexo I.

Padronização Botânica de *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae)

Thiago Mendonça de AQUINO¹, Elba Lúcia Cavalcanti de AMORIM¹,
Cláudia Sampaio de Andrade LIMA² e Ulysses Paulino de ALBUQUERQUE^{3*}

¹ Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Ciências Biológicas;

³ Laboratório de Etnobotânica e Botânica Aplicada, Departamento de Botânica,
Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária,
Recife-PE, Brasil. E-mail: upa@npd.ufpe.br

RESUMO. O estudo farmacobotânico de *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae) foi realizado para fins diagnósticos. A anatomia das folhas, caule e raízes foi descrita e a presença de características típicas da família Scrophulariaceae foi confirmada. No presente trabalho algumas características foram consideradas como importantes para o diagnóstico: a presença de numerosas e conspicuas células pétreas na medula do caule e a cutícula estriada em ambas as superfícies das folhas.

SUMMARY. "Botanical Standardization of *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae)". Pharmacobotanical study of *Capraria biflora* L. was realized with diagnostic aims. The anatomy of the leaves, stem and roots is described and the presence of features typical of Scrophulariaceae is confirmed. In the present study some characteristics were considered important for diagnosis: presence of conspicuous stone cells in the stem pith and the grooved cuticle in both surfaces of the leaves.

INTRODUÇÃO

Originária das Antilhas e da América do Sul, *Capraria biflora* L. é uma planta arbustiva ou herbácea, de aproximadamente 1,5 m de altura, pertencente à família Scrophulariaceae. Por se tratar de uma planta invasora, é encontrada em terrenos baldios, preferindo locais úmidos, próximos ao litoral, riachos ou lagoas¹.

No Brasil, *Capraria biflora* L. é encontrada principalmente em Goiás, Minas Gerais e faixa litorânea que se estende desde o Piauí até o Espírito Santo. Na região Nordeste, a planta vegeta principalmente nos estados do Ceará e Pernambuco. Pode-se encontrar, também, em outros países do continente americano como Bahamas, Guatemala, Trinidad-Tobago, Guiana Francesa e Peru²⁻⁶. Popularmente é conhecida por vários nomes, como: chá-das-antilhas, chá-da-calçada, chá-da-américa, chá-do-méxico, chá-de-lima, chá-da-martinica, chá-preto, chá-bravo ou chá-do-maranhão⁷. Dentre os usos populares, a infusão das partes aéreas é utilizada como febrífua,

ga, digestiva, diurética, estimulante, bem como para tosse, gripe, diarreia, dismenorréia e problemas renais. A tintura preparada a partir das raízes é comumente utilizada em afecções cutâneas^{3,8-10}. Na literatura não se encontra qualquer estudo científico com relação a efeitos tóxicos causados a partir da infusão de folhas e flores¹. Todavia, de acordo com a cultura popular, sabe-se que a administração em doses elevadas pode causar sonolência, vertigem, tontura e rigidez muscular¹¹.

A partir das raízes de *C. biflora*, é extraída uma substância denominada biflorina que possui uma estrutura o-quinônica, e que até o momento é a única substância isolada descrita para a planta em questão com ação medicinal comprovada, possuindo atividade antibiótica frente a bactérias, leveduras e fungos dermatófitos¹².

Há aproximadamente 50 anos se realizam trabalhos com *C. biflora* visando principalmente o estudo fitoquímico⁸ e de sua atividade biológica¹¹, havendo uma carência de pesquisas pa-

PALAVRAS CHAVE: *Capraria biflora* L., Controle Farmacobotânico, Padronização Botânica.

KEY WORDS: *Capraria biflora* L., Pharmacobotanical Control, Botanical Standardization.

* Autor a quem a correspondência deverá ser enviada.

ra a caracterização botânica da espécie, sendo, portanto este um trabalho oportuno. Assim, objetivou-se caracterizar as raízes, caule e folhas da espécie, contribuindo para a sua identificação e controle de qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudou-se raízes, caules e folhas, fixados em álcool etílico 70%, obtidos de materiais de *Capraria biflora* L. coletados de populações ruderais no município Ilha de Itamaracá, litoral norte do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). Material-testemunho encontra-se depositado no Herbário do Instituto de Pesquisa Agropecuária (IPA), sob o número 57.902.

A análise dos caracteres microscópicos foi feita a partir de cortes transversais (raízes, caules e folhas) e paradérmicos da lâmina foliar, realizados a mão livre, com o auxílio de lâmina de barbear, utilizando-se medula de embaúba (*Cecropia* sp.) como suporte. Os cortes foram submetidos à dupla coloração segundo a técnica sugerida por Etzold¹³, sendo em seguida montados em lâminas de microscopia com glicerina aquosa 50%. O amido foi testado com solução de lugol, substâncias lipídicas com Sudan III, e compostos fenólicos com cloreto férrico.

RESULTADOS

Caracterização macroscópica

A planta é perene, herbácea ou subarborescente, que pode atingir até 1,5 m de altura, glabra a pubescente. O caule é sublenhoso, com ramos alternos, cilíndricos, esverdeados e algumas vezes vináceos nas extremidades, glabros ou pilosos. As folhas são sésseis, alternas, 2,2-5,5 cm de comprimento e 0,7-1,3 cm de largura, oblongo-lanceoladas, agudas, cuneadas, serradas na metade superior, pilosas nas margens, penínervias, tendo as nervuras salientes na face inferior. As raízes são pouco espessas, numerosas e longas, apresentando-se tortuosas e de cor pardacenta, com 0,7-3,1 cm de circunferência.

Caracterização microscópica

Raízes (Figura 1A)

A periderme é bastante desenvolvida, provida de 8 a 25 camadas de células usualmente retangulares, com paredes relativamente delgadas, e de paredes radiais curtas. O parênquima cortical também é desenvolvido, constituído por células de contorno variado, predominando o retangular, que formam de 8 a 14 camadas. As células corticais apresentam uma considerável quantidade de amiloplastos. Essas células são

espassadas, com lúmen que se reduz à medida que se aproximam da região perivascular. A região floemática é razoavelmente desenvolvida, algumas vezes delimitada por grupos de fibras lenhosas de lúmen estreito que formam uma bainha descontínua, exibindo amiloplastos em abundância. A região central é maciçamente ocupada por xilema.

Caule (Fig. 1B-E)

No caule, em estrutura primária, a epiderme exibe células de contorno ligeiramente retangular, sendo algumas vezes nitidamente circulares (Figura 1B). Apresenta estrutura sifonostética contínua ectoflóica. As células possuem paredes bem espessadas, nas quais observa-se raros tricomas glandulares pedicelados de cabeça multicelular.

Os caules mais velhos exibem súber formado por felogênio desenvolvido logo abaixo da epiderme. A periderme é espessa, formada por cerca de 13 camadas de células de formato tabular, algumas vezes alongadas no sentido anticlinal (Figura 1C). Estas células coram-se discretamente de vermelho pelo Sudan III. O parênquima cortical é constituído por células de contorno circular, delimitado por um maciço de células de paredes espessadas, formado por 12 a 14 camadas (Figura 1C-D), abundantes em amiloplastos. O periciclo é fibroso e descontínuo (Figura 1D). O floema é constituído por células mais ou menos regularmente distribuídas em faixas radiais. A região medular é constituída por células de contorno circular e paredes fortemente espessadas, na qual também se observa numerosas e conspícuas células pétreas (Figura 1E). As células mais periféricas são abundantes em amiloplastos.

Lâmina foliar (Fig. 2A-E)

Em corte paradérmico, a epiderme foliar exibe células de paredes sinuosas. Em ambas as superfícies as células apresentam paredes delgadas, de formato bastante variado e irregular. São observados tricomas tectores simples, unicelulares e multicelulares, com parede externa lisa, muito raros em ambas as epidermes, e tricomas glandulares com cabeça pluricelular e pedicelos uni a pluricelulares (Figura 2C). Os tricomas distribuem-se por toda a epiderme sendo aparentemente mais abundantes na face abaxial. Ambas as epidermes são guarnecidas por estômatos anisocíticos e anomocíticos, estes notadamente mais raros. A cutícula apresenta-se nitidamente estriada, principalmente na face abaxial.

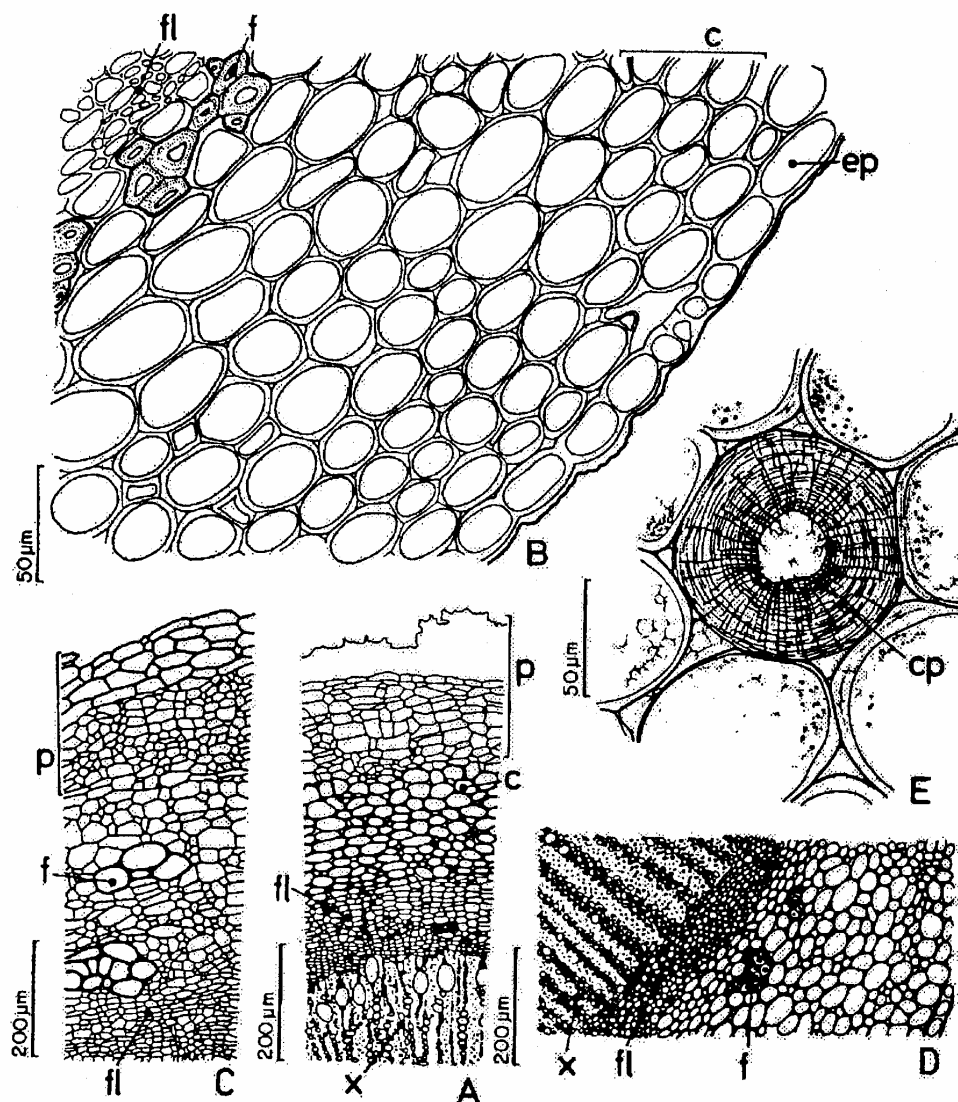


Figura 1. Representações esquemáticas de *Capraria biflora* L. A: Seção transversal da raiz em estrutura secundária; Seções transversais em caule: B: Estrutura primária; C-D: Estrutura secundária; E: Detalhe de célula pétreia na medula do caule. c: córtex; cp: célula pétreia; ep: epiderme; f: fibras; fl: floema; p: periderme; x: xilema.

A lâmina, em secção transversal, exibe uma epiderme uniestratificada com células de dimensões variadas. As células da epiderme adaxial são em geral alongadas anticlinalmente, enquanto que as da epiderme abaxial alongam-se periclinalmente. A cutícula é bastante espessada. Tricomas tectores são raramente observados e apresentam a parede finamente espessada e superfície lisa. Tricomas glandulares sésseis, além

dos pedicelados já descritos, são observados em ambas as superfícies. O conteúdo dos tricomas glandulares reage positivamente para compostos fenólicos.

O mesófilo é dorsiventral, com parênquima paliádico frouxo, uniestratificado e de células alargadas e curtas, ocupando cerca de 1/4 de todo o mesófilo. O parênquima lacunoso, com cerca de 7-8 camadas de células é frouxo e exi-

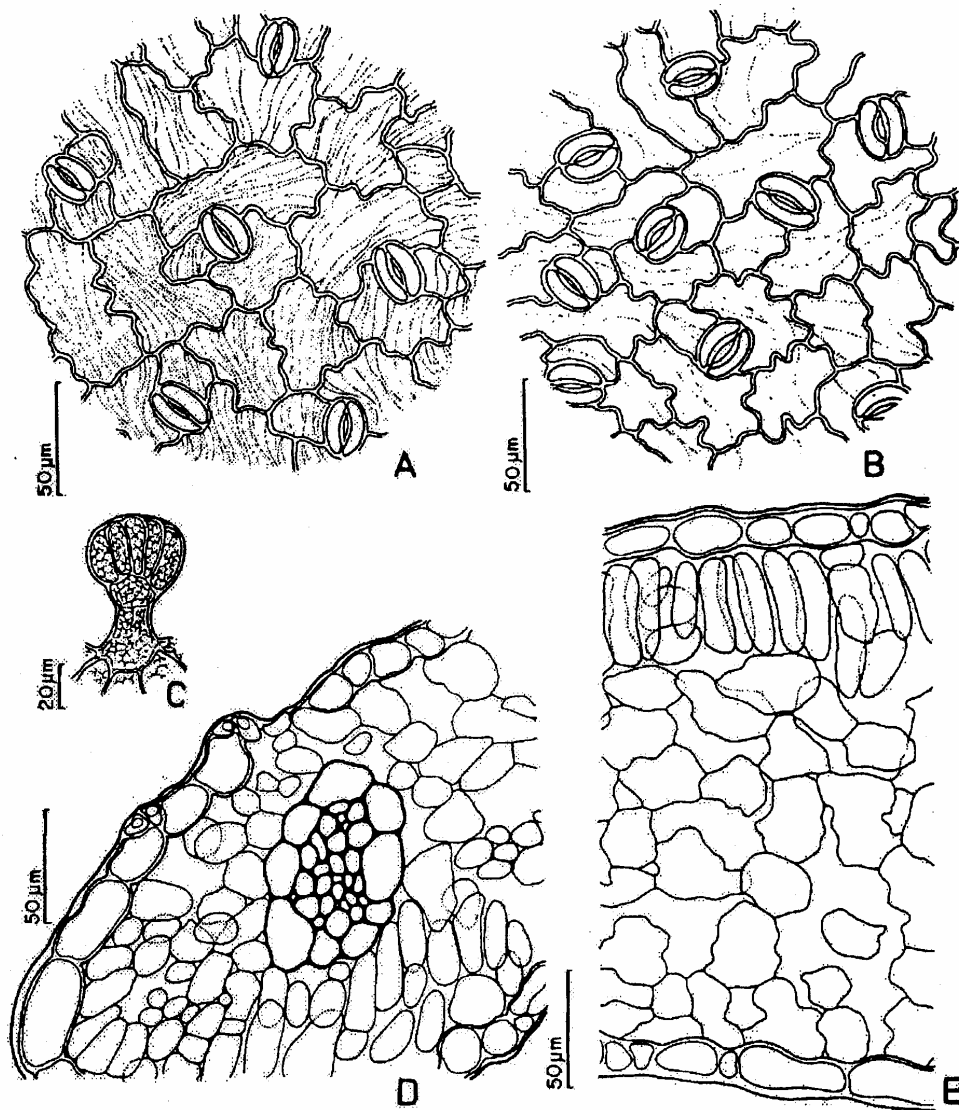


Figura 2. Representações esquemáticas de *Capraria biflora* L. Detalhes da lâmina foliar: A: Epiderme abaxial em vista frontal, com predominância de estômatos anisocíticos e cutícula fortemente estriada; B: Epiderme adaxial em vista frontal; C: Tricoma glandular observado em secção transversal da folha; D: Região do bordo da lâmina foliar em secção transversal; E: Região mediana do mesófilo foliar em secção transversal.

be células de secção circular ou lobada. No mesófilo são observados feixes vasculares, algumas vezes delimitados por uma bainha de células parenquimáticas. A nervura mediana, em secção transversal, apresenta contorno côncavo-convexo. Sob a epiderme observa-se colênquima an-

gular com cerca de 1 a 2 camadas. O parênquima exibe células de contorno arredondado e paredes delgadas com diminutos espaços intercelulares. O feixe vascular é colateral. Amiloplastos ocorrem em considerável quantidade em todo o mesófilo.

Na região do bordo observa-se que as células epidérmicas sofrem um maior espessamento na parede periclinal externa, ocorrendo também uma redução do tamanho das células epidérmicas da face abaxial (Figura 2D). A organização é no geral semelhante a já descrita para o restante da lâmina foliar, com a exceção de que nessa região o mesofilo parece ser muito mais homogêneo. São visualizados diminutos feixes vasculares colaterais delimitados por bainha parenquimática.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Existe uma boa quantidade de informações relacionadas à anatomia de espécies da família

Scrophulariaceae, inclusive em gêneros de interesse farmacognóstico como *Digitalis*^{14,15}. De um modo geral, *Capraria biflora* possui muitos elementos histológicos característicos de vários gêneros da família como: os estômatos anisocíticos e anomocíticos, os diversos tipos de tricomas glandulares, o periciclo fibroso no caule, a origem subepidérmica da casca referida para espécies de *Veronica* e *Dermatobotrys*, e também a presença de células pétreas na medula do caule¹⁵. Apesar das características observadas serem comuns nas Scrophulariaceae, a presença de uma cutícula estriada em ambas as faces da folha, e a ocorrência de notáveis células pétreas na medula do caule, indica a importância desses elementos na diagnose da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matos, F.J.A. (1988) *Plantas Mediciniais*, Universidade Aberta, Fortaleza
2. Morton, J.F. (1968) *Econ. Bot.* **22**: 87-102
3. Luu, C. (1975) *Plant. Med. Phytother* **9**: 125-35
4. Eldridge, J. (1975) *Econ. Bot.* **29**: 307-32
5. Alfaro, M.A.M. (1984) *J. Ethnopharm.* **11**: 203-21
6. Comerford, S.C. (1996) *Econ. Bot.* **50**: 327-36
7. Menezes, A.I. (1949) "*Flora da Bahia*", Ed. Nacional, São Paulo
8. Gonçalves de Lima, O., I.L. D'Albuquerque & P. Loureiro (1954) *Rev. Quím. Indust.* **249**: 28-30
9. Ramirez, V. R., L.J. Mostacero, A.E. Garcia & C.F. Mejia (1988) "*Vegetales Empleados en Medicina Tradicional Norperuana*", Banco Agrario del Perú (Nacional Universidad Trujillo
10. Ayensu, E.S. (1978) "*Medicinal Plants of the West Indies*", Unpublished Manuscript
11. Lyra Júnior, D.P. (1999) "*Isolamento, atividade antifúngica e validação do método de doseamento da 3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinona-biflorina*", Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife
12. Gonçalves de Lima, O., I.L. D'Albuquerque & P. Loureiro (1953) *Rev. Quím. Indust.* **14**: 2-3
13. Etzold, H. (1983) *Mikroskosmos* **72**: 213-8.
14. Oliveira, F., G. Akisue, G. & M.K. Akisue (1998) "*Farmacognosia*", Atheneu, São Paulo
15. Metcalfe, C.R. & L. Chalk (1955) "*Anatomy of dicotyledons*". Clarendon Press, Oxford

7. TERMOANÁLISE

7. TERMOANÁLISE

ARTIGO PUBLICADO

AUTORES: ARAGÃO, C. F. S.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; AQUINO, T. M. and MACÊDO, R. O.

TÍTULO: Thermal Behavior of Biflorin by Means TG and a DSC Photovisual System.

REVISTA: Revista Brasileira de Farmacognosia.

VOLUME: 12.

PÁGINAS: 110-111.

ANO: 2002.

PS: As fotos coloridas e ampliadas dos estágios de decomposição térmica da biflorina encontram-se no anexo II.

- Tract. Ed. Johnson, L.R. 1994; 2: 1139-1169
- ²⁵ Souza Brito ARM, Rodriguez JÁ, Hiruma-Lima CA, Haun M, Nunes DS. Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Medica*. 1998; 64: 126-129
- ²⁶ Souza-Fornigoni MLO, Oliveira MGM, Monteiro MG, Silveira-Filho NG, Braz S, Carlini EA. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991; 34: 21-27
- ²⁷ Stephenson RP. A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol.* 1956; 11: 379-393
- ²⁸ Takeuchi K, Yagi K, Kato S, Uakawa H. *Gastroenterology*. 1997; 113: 1553-1559
- ²⁹ Van der Berg. *Plantas medicinais da Amazônia - Contribuição ao seu conhecimento sistemático*, Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém. 1993; p. 223
- ³⁰ Vane JR. A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1957; 12: 344-349
- ³¹ Vuyyuru L, Schubert ML. Histamine, acting via H3 receptors, inhibits somatostatin and stimulates acid secretion in isolated mouse stomach. *Gastroenterology*. 1997; 113: 1545-1552
- ³² Weigert N, Schaffer K, Wegner U, Schusdziarra V, Classen M, Schepp W. Functional characterization of muscarinic receptor stimulating gastrin release from rabbit antral G-cells in primary culture. *European Journal of Pharmacology*. 1994; 264: 337-344

Thermal behavior of biflorin by beans TG and a DSC photovisual system

C. F. S. Aragão¹; C. S. A. Lima²; E. L. C. Amorin²; T. M. Aquino²; R. O. Macêdo^{1*}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB, Campus I, 59059-900, João Pessoa, PB, Brasil

²Departamento de Biofísica e Radiologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Recife, PE

ruimacedo@lft.ufpb.br

Abstract

This work proposes thermal characterization, of the biflorine, orto-quinon of *Capraria biflora* L., through the TG and DSC photovisual data. The thermogravimetric results showed that the decomposition reaction biflorine occurs three steps under air atmosphere, The DSC of biflorin presented five peaks relating to phase transitions. The DSC photovisual system demonstrated changes in biflorin.

Thermal behaviour studies in which thermal techniques are applied to naturally occurring substances are rather scarce in the literature^{1,5}.

Biflorin, a orto-quinon, (Figure 1) is constituent of the root of *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae). This plant is popularly is known as "chá da terra", "chá da américa", "chá das antilhas" and "chá da calçada" a plant used extensively in Northeast Brazil as antibiotic in the treatment of infections for fungi, dhermatofilus, yeasts and bacterias^{6,10}.

The present work deals with a thermal behavior of biflorin by means of TG and a DSC photovisual system.

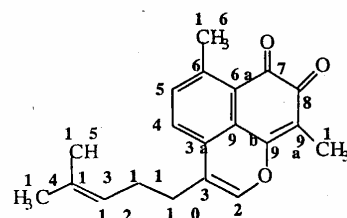


Figure 1. 3-prenyl-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinon (biflorin).

Results and discussion

The TG curves of the biflorine (Figure 2, curve 1) presents three thermal decomposition stages, with temperature

intervals: 218.89 - 424.50 °C (15.51 %), 375.52 - 529.36 °C (15.25%) and 530.29 - 687.28 °C (62.95 %), with mineral residue of 5.66%.

The DSC curve of biflorine (Figure 2, curve 2) presented five peaks relating to phase transitions. The first and second peaks corresponds to endothermic process, and presented temperature peaks and reaction heat, respectively: 83.20 °C; -1.40 J/g and 159.11 °C; -59.31 J/g. The third peak, exothermic, at 170.31 °C (116.78 J/g). The three first peaks there are no mass loss (Figure 2, curves 1 and 2), which indicate that the first and third phase transitions are related with changes in form of the biflorine molecule. The second peak is characteristic of the melting point transition.

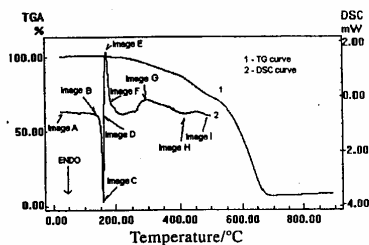


Figure 2. TG and DSC curves of biflorin

The picture from the photovisual system (Figure 3) showed changes in biflorine. This is verified in picture A, which show the presence of biflorin crystal with dark-red color. Picture B, at 140 °C, at this temperature, there is no colour change in form of the biflorine molecule. Pictures C and D, at 158 and 161 °C despite the melting point with darkness color. Pictures E and F, at 170 and 187 °C, revealed dark substance with energetic transformations in the molecule. Pictures G, at 200 °C, indicate the initial decomposition of the biflorin, followed by decomposition with mass loss (Figure 3, Pictures H - I and Figure 2, TG and DSC curves).



Figure 3. Images of DSC photovisual system from biflorine. Images were taken at A - 25 °C, B - 140 °C, C - 158 °C, D - 161 °C, E - 170 °C, F - 186 °C, G - 200 °C, H - 408 °C and I - 500 °C.

The photovisual system allowed visualization of a

physico-chemical change (melting point, decomposition and transformation molecule).

Material and Methods

The TG curves of biflorine were obtained with a Shimadzu thermobalance, model TGA-50H, under a synthetic air ($20 \pm 0.5\%$ oxygen and $80 \pm 0.5\%$ nitrogen) flow $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, at heating rate $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, up to temperature of $900 \text{ }^\circ\text{C}$. Sample mass about 4 mg were packed in an alumina cell.

The DSC coupled to the photovisual system data were obtained in Shimadzu differential scanning calorimeter, model DSC-50, constituted for Olympus microscope connected to high resolution camera, model VCC-D520, Sanyo and image capture software. The temperature interval was of $25 - 500 \text{ }^\circ\text{C}$, using aluminum pan, heating rates of $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. The nitrogen flow was of $50 \text{ ml}/\text{min}$. The sample amount was 2.00 mg. The TG and DSC curves were analyzed with TASYs software from Shimadzu. The DSC apparatus was calibrated by indium ($156.6 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2$) and zinc ($419.5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.3$) standards melting point. The heat flow and enthalpy were calibrated by indium heat of fusion ($28.58 \text{ J/g} \pm 0.3$) using the same conditions of samples.

Acknowledgements

The authors thank ANVISA/MS, CAPES and CNPq for financial support.

References

- Macêdo R O. An. Assoc. Bras. Quim., 47(4) (1998) 313-315.
- Aragão C F S, Macêdo R O, Do-Nascimento T G & Macêdo A M C J. Therm. Anal. Cal., 56 (1999) 1323-1327
- Macêdo R O, Aragão C F S, Do-Nascimento T G & Gomes A P B J. Therm. Anal. Cal., 59 (2000) 657-661
- Aragão C F S, Macêdo R O & Barbosa-Filho J M J. Therm. Anal. Cal., 64 (2001) 185-191
- Macêdo R O, Aragão C F S, Do-Nascimento T G & Medeiros A C D. Revista Brasileira de Alimentos, 06(jan/jun) (1998) 5-11
- Gonçalves de Lima O, D'Albuquerque I L, Loureiro P, Carmona C L & Bernard M Z. Rev. Quím. Indust., 14, 2-3 (1953)
- Gonçalves de Lima O, D'Albuquerque I L & Navarro M C P. Rev. Inst. Antibiot. (1/2), 79-81 (1962)
- Comin J, Gonçalves de Lima O, Grant H N, Jackman L N, Keller-Schierlein W. Prelog V. Helv. Chim. Acta, 46, 409 (1963)
- Lyra Jr D P, Aquino T M, Neves C S, Lima C S A, Gusmão N B, Wanderley A G & Santana D P. Rev. Farm. Quim. 32, 1, 19-23 (1999)
- Lyra Jr D P, Aquino T M, Neves C S, Lima C S A, Amorim E L C, Wanderley A G & Santana D P. Boll. Chim. Pharmacist. 138, 2, 309 (1999)

ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

AUTORES: Aquino, T.M., Aragão, C.F.S., Araújo, A.A.S., Grangeiro-Jr, S., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., Lima, C.S.A.

TÍTULO: Estudo Cinético Isotérmico e Não-isotérmico da Biflorina por Termogravimetria

REVISTA: *Thermochimica Acta*.

PS: O artigo encontra-se nas normas estabelecidas pela *Thermochimica Acta*.

ESTUDO CINÉTICO ISOTÉRMICO E NÃO-ISOTÉRMICO DA BIFLORINA POR TERMOGRAVIMETRIA

Aquino, T.M.^{1*}, Aragão, C.F.S.², Araújo, A.A.S.³, Grangeiro-Jr, S.¹, Amorim, E.L.C.¹,
Albuquerque, U.P.⁴, Lima, C.S.A.⁵

¹*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil*

²*Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Brazil*

³*Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, Brazil*

⁴*Departamento de Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil*

⁵*Departamento de Biofísica e Radiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil*

Keywords: Thermogravimetry; Isothermal; Non-isothermal; Thermal decomposition; biflorin.

*Corresponding author. E-mail address thiago@ufpe.br (T.M. Aquino)

Abstract

A study of biflorin, an o-quinone deriving from *Capraria biflora* L. has been realized using a thermogravimetry technique (TG). Both the isothermal and non-isothermal methods are performed to investigate the thermal degradation process of biflorin. The runs were performed in a synthetic air. In the non-isothermal method was used use the equations established by Ozawa, and the isothermal method was based on the “method of fit” using zero-order, first-order and second-order equations based on the Arrhenius’s principles. The TG results showed that the decomposition of biflorin is in three steps. The TG data allowed the calculation of the kinetic parameters of biflorin, and a zero-order process appeared to be the best fit mechanism, to two methods. The activation energy values obtained by isothermal and non-isothermal methods were 149 and 80.86 KJ.mol⁻¹, respectively.

1. Introdução

A biflorina, substância presente nas raízes de *C. biflora* L., apresenta uma estrutura o-quinônica, e fórmula geral $C_{20}H_{17}O_3$ (Fig. 1). Este composto possui potente atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, álcool-ácido-resistentes e fungos dermatófitos (Fig. 1) [1,2].

INSERIR FIGURA 1

Através de estudos de caracterização térmica da biflorina, sua curva TG revelou a presença de três estágios de decomposição térmica: 218,89 – 424,50°C (15,51 %), 375,52 – 529,36 °C (15,25%) e 530,29 – 687,28 °C (62,95 %), com um resíduo mineral de 5,66%. A curva DSC apresentou cinco picos referentes à fases de transição, sendo o segundo pico endotérmico a 159,11 °C, característico de seu ponto de fusão (Fig. 2) [3].

INSERIR FIGURA 2

Em geral, a análise térmica descreve as propriedades temperatura-dependente dos materiais, incluindo compostos sintetizados e produtos naturais, onde os métodos termoanalíticos possuem uma larga variedade de possibilidades de utilização. Os campos de aplicações variam na obtenção de parâmetros termodinâmicos e cinéticos, sendo estes utilizados na caracterização, estudos de estabilidade e controle de qualidade de drogas [4,5].

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento do estudo do mecanismo de decomposição térmica da biflorina e determinação dos parâmetros cinéticos utilizando-se curvas TG pelos métodos isotérmico e não-isotérmico.

2. Parte experimental

Biflorina, sob a forma de cristais violáceos, foi obtida a partir do extrato hidroalcoólico das raízes de *Capraria biflora* L., que foi submetido à coluna cromatográfica em sílica gel 60 (230-400 mesh), utilizando-se como sistema eluente uma mistura de tolueno e acetato de etila (80:20 v/v).

Utilizou-se termobalança modelo TGA-50 (SHIMADZU). A calibração foi realizada a partir de um padrão de oxalato de cálcio monohidratado, conforme norma da American Society for Testing and Materials [6]. As curvas termogravimétricas (TG) para ambos os métodos, foram obtidas em fluxo de ar sintético a 10 mL.min⁻¹. Para o método isotérmico, utilizou-se célula de alumínio, com massa da amostra de 3,5 mg, e para o método dinâmico, célula de platina com massa da amostra de 4 mg.

2.1. Termogravimetria Isotérmica

As análises isotérmicas foram obtidas nas temperaturas de 220 a 260 °C, de acordo com as condições presentes na tabela 1. As temperaturas isotérmicas utilizadas foram aquelas observadas antes do início da decomposição da biflorina, através de sua curva termogravimétrica dinâmica, já que esta é a etapa principal em função de sua ação biológica.

INSERIR TABELA 1

Na determinação do processo de decomposição para a biflorina, a análise cinética foi baseada no “método ajustado”, onde utilizou-se equações de ordem zero, primeira e segunda ordem para se determinar qual melhor se ajusta à equação de Arrhenius.

Para a reação de ordem zero, relaciona-se a massa em função do tempo de acordo com a equação:

$$m = m_0 - kt \quad (1)$$

Para a reação de primeira ordem, relaciona-se o logaritmo da massa em função do tempo:

$$\ln m = \ln m_0 - kt \quad (2)$$

E para a reação de segunda ordem, relaciona-se o inverso da massa em função do tempo:

$$\frac{1}{m} = \frac{1}{m_0} + kt \quad (3)$$

2.2. Termogravimetria dinâmica

Os experimentos pelo método dinâmico foram conduzidos na faixa de temperatura entre 25 e 800 °C nas razões de aquecimento 2.5 - 5.0 - 7.5 - 10 e 15 °C.min⁻¹. No estudo cinético de decomposição pelo método não-isotérmico, a energia de ativação (E_a), ordem da reação (n) e fator de frequência (Z) foram calculados para o começo do primeiro estágio de decomposição das curvas TG (aproximadamente entre 150 e 250 °C), com perda de massa de 5%, utilizando-se a equação matemática de Ozawa (4) [7].

$$\log \phi = \log \left[\frac{AE}{R(\alpha)} \right] - 2.315 - 0.4567 \frac{E}{RT} \quad (4)$$

onde: α - fração decomposta; T - temperatura; A - fator de frequência; R - constante geral dos gases; E - energia de ativação; ϕ - razão de aquecimento.

3. Resultados e Discussão

As curvas termoanalíticas para o experimento isotérmico estão representadas no gráfico perda de massa (%) versus tempo (min.), onde a taxa da perda de peso é depende da temperatura isoterma (Fig. 3). Todas as curvas isotermas ocorreram em uma única etapa, e em ambas a degradação completa da biflorina não foi alcançada.

INSERIR FIGURA 3

Para o cálculo da energia de ativação, obteve-se o gráfico do logaritmo das constantes de decomposição ($\ln k$) (Tab. 1) versus o inverso das temperaturas em Kelvin multiplicado por 1000 ($T^{-1} \times 1000$). A partir da regressão linear, obteve-se a equação $Y = - 18,013X + 31,07$, onde $X = 1/T$ (T em Kelvin), $Y = \log K$ e $R^2 = 0,9747$ foi obtido (Fig. 4). A energia de ativação finalmente foi calculada como $- a \times R$ (a= coeficiente angular), obtendo-se o valor 149 KJ.mol^{-1} .

INSERIR TABELA 1

INSERIR FIGURA 4

A análise dos resultados obtidos mostrou que a reação de decomposição térmica da biflorina pelo método isotérmico segue o mecanismo de ordem zero, já que o valor da

constante de velocidade (k), obtido pela equação $m = m_0 - Kt$ (1) é o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais.

No ensaio pelo método não isotérmico, as curvas TG apresentaram três estágios de decomposição térmica. A figura 5 mostra as curvas TG para as diferentes razões de aquecimento e a tabela 3 relaciona os percentuais de perda de massa com a energia cinética envolvida na sua decomposição térmica. Os valores das energias cinéticas aparentes neste processo estão na faixa de 77,53 a 85,27 KJ.mol^{-1} , mostrando resultados sistemáticos proporcionais com o decréscimo dos percentuais de perda de massa e conduzindo a um valor médio de 80,86 KJ.mol^{-1} .

INSERIR FIGURA 5

INSERIR TABELA 2

A figura 6 mostra as curvas para a determinação da energia cinética da biflorina que relaciona o logaritmo da razão de aquecimento (ϕ) em função do inverso da temperatura ($1/T$). Isto possibilita a obtenção das conversões para o fenômeno de decomposição da referida amostra.

INSERIR FIGURA 6

A relação entre a massa residual da amostra pelo tempo reduzido é mostrada na figura 7. A proposta para o fenômeno relacionado com o processo de decomposição térmica pelo método não-isotérmico sugere também uma ordem de reação de zero, uma vez que nesta

situação os valores experimentais apresentam melhor correlação com a curva teórica. O fator de frequência médio calculado foi de $1,473 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$.

INSERIR FIGURA 7

4. Conclusão

Os estudos cinéticos isotérmico e não-isotérmico desenvolvidos com a biflorina mostraram que para ambos os métodos ocorre uma reação de decomposição de ordem zero. Foi observado pela análise das curvas TG que a droga possui três estágios de decomposição térmica, sendo calculados os valores das energias de ativação. A análise dos dados são concordantes com os perfis termoanalíticos da biflorina, evidenciando a alta estabilidade térmica desta substância.

5. Referências

- [1] T.M. Aquino et al, Acta Farm. Bonae. 20 (2001) 259-263.
- [2] D.P. Lyra Jr. et al, Rev. Farm. Quim. 32 (1999)19-23.
- [3] C.F.S. Aragão et al, Rev. Bras. Farm. 12 (2002) 110-111.
- [4] P. Wessels et al., Drug Dev. Ind. Pharm. 1997 23(5), 427-439.
- [5] P. Mura et al., Drug Dev. Ind. Pharm. 1998 34(8), 747-756.
- [6] American Society for Testing and Materials (ASTM). Standard practice for calibration of temperature scale, E-1582, 1993.
- [7] T. Ozawa, Bull. Chem. Soc. Japan 38 (1965) 1881-1886.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estrutura química da biflorina (3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinona).
- Figura 2** Curvas TG e DSC da biflorina.
- Figura 3** Percentagem de perda de massa (%) versus tempo (min.) das curvas isotermas para a biflorina sob fluxo de ar sintético..
- Figura 4** Gráfico $\log K \times T^{-1}$ para o primeiro estágio de decomposição da biflorina pelo método isotérmico.
- Figura 5** Curvas TG para a biflorina pelo método não-isotérmico, nas razões de aquecimento 2.5 - 5.0 - 7.5 - 10 e 15°C.min⁻¹.
- Figura 6** Logaritmo da razão de aquecimento ($\log\phi$) em função do inverso da temperatura (1/T) para o primeiro estágio de decomposição térmica da biflorina.
- Figura 7** Relação entre percentagem de massa residual (α) pelo tempo reduzido para as curvas TG da biflorina pelo método não-isotérmico .

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Condições experimentais utilizadas para obtenção dos parâmetros isotérmicos da decomposição térmica da biflorina por TG.
- Tabela 2** Valores das constantes da decomposição térmica da biflorina utilizando-se método isotérmico.
- Tabela 3** Relação entre os percentuais de perda de massa e energia cinética envolvida na decomposição térmica da biflorina pelo método não-isotérmico.

Tabela 1

Condições experimentais utilizadas para obtenção dos parâmetros isotérmicos da decomposição térmica da biflorina por TG.

| Condições (°C) | Razão de aquecimento (°C.min ⁻¹) | Temperatura isotérmica (°C) | Tempo de reação (min.) |
|-------------------|---|--------------------------------|---------------------------|
| 260 | 40 | 240 | 0 |
| | 5 | 260 | 120 |
| 250 | 40 | 230 | 0 |
| | 5 | 250 | 120 |
| 240 | 40 | 220 | 0 |
| | 5 | 240 | 120 |
| 230 | 40 | 210 | 0 |
| | 5 | 230 | 120 |
| 220 | 40 | 200 | 0 |
| | 5 | 220 | 120 |

Tabela 2

Valores das constantes da decomposição térmica da biflorina utilizando-se método isotérmico.

| Amostra | Temperatura (°C) | Constantes de decomposição [k] (mg.s ⁻¹) |
|-----------|------------------|---|
| Biflorina | 220 | 1.04 x 10 ⁻⁶ |
| | 230 | 1.22 x 10 ⁻⁶ |
| | 240 | 1.50 x 10 ⁻⁶ |
| | 250 | 2.02 x 10 ⁻⁶ |
| | 260 | 2.26 x 10 ⁻⁶ |

Tabela 3

Relação entre os percentuais de perda de massa e energia cinética envolvida na decomposição térmica da biflorina pelo método não-isotérmico.

| Perda de massa | Energia cinética | |
|------------------------------|------------------|----------|
| | KJ/mol | Kcal/mol |
| % | | |
| 96,19 | 77,53 | 18,52 |
| 94,78 | 78,28 | 18,70 |
| 93,37 | 80,47 | 19,22 |
| 91,95 | 82,76 | 19,77 |
| 90,54 | 85,27 | 20,37 |
| Média | 80,86 | 19,32 |
| Desvio padrão | 3,199 | 0,764 |
| Coefficiente de variação (%) | 3,957 | 3,956 |
| Faixa de análise (°C) | 34,26 - 604,14 | |
| Faixa de cálculo (%) | 96,89 - 89,84 | |

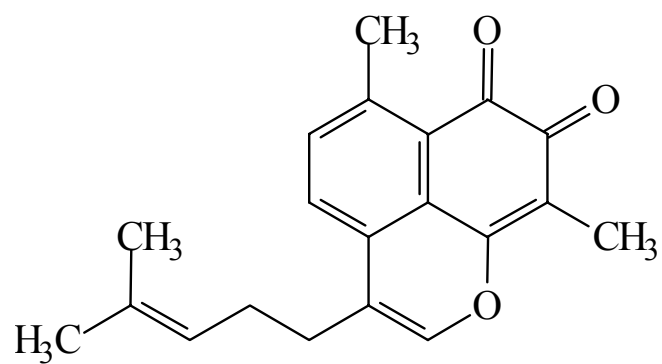


Fig. 1. Estrutura química da biflorina (3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinona).

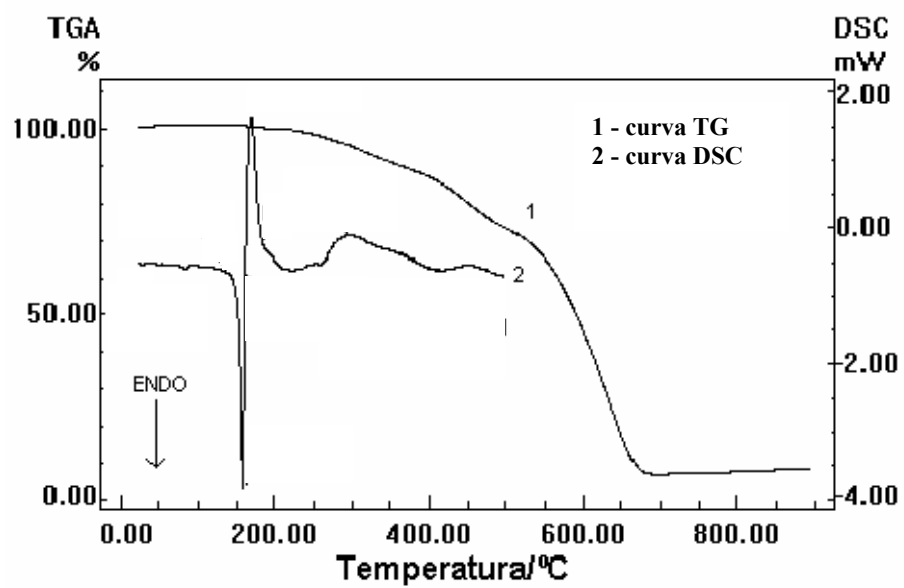


Fig. 2. Curvas TG e DSC da biflorina.

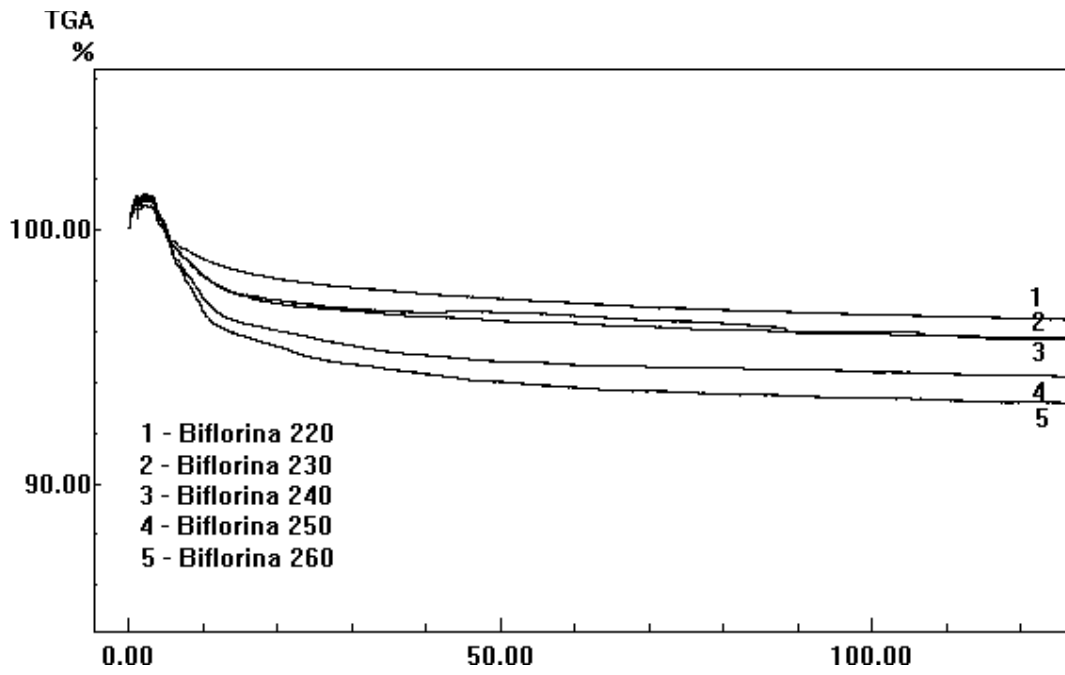


Fig. 3. Percentagem de perda de massa (%) versus tempo (min.) das curvas isotermas para a biflorina sob fluxo de ar sintético.

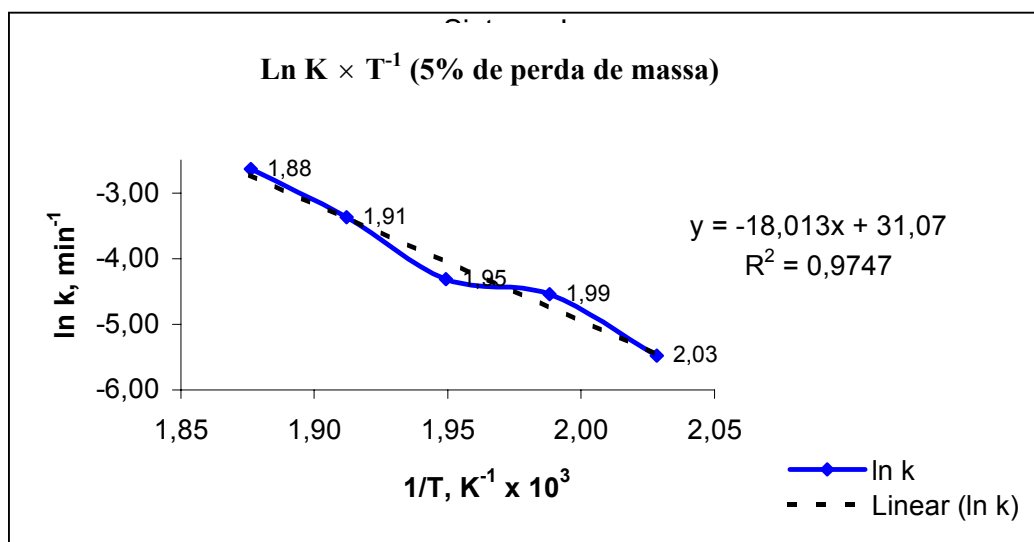


Fig. 4. Gráfico $\ln K \times T^{-1}$ para o primeiro estágio de decomposição da biflorina pelo método isotérmico.

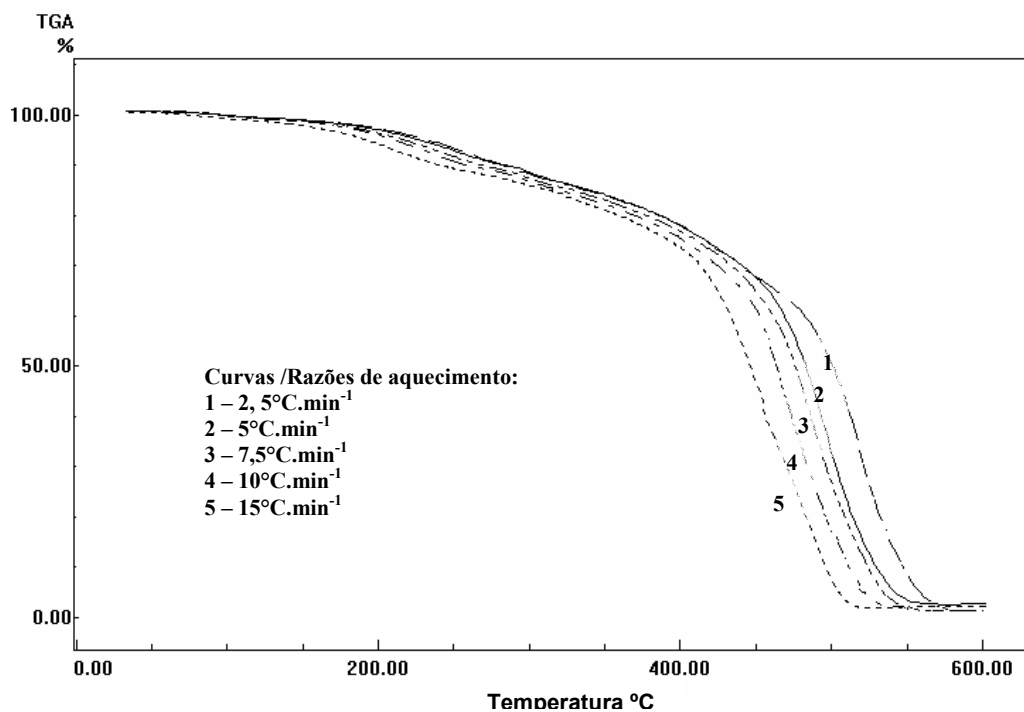


Fig. 5. Curvas TG para a biflorina pelo método não-isotérmico, nas razões de aquecimento 2.5 - 5.0 - 7.5 - 10 e 15 °C.min⁻¹.

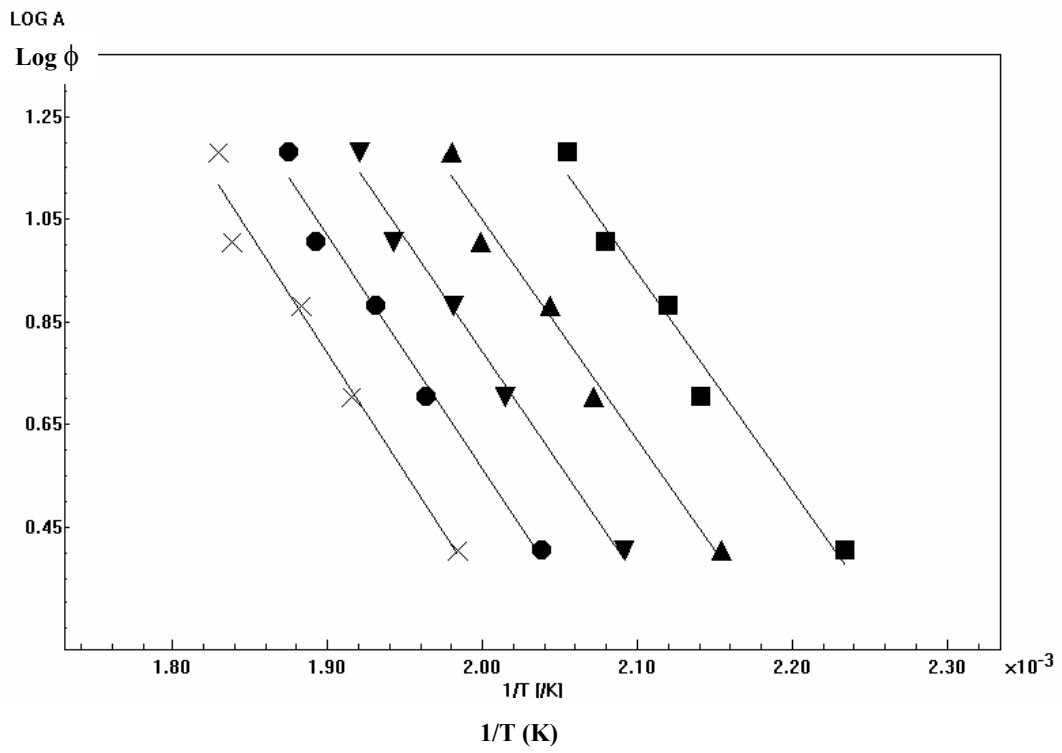


Fig. 6. Logaritmo da razão de aquecimento ($\log\phi$) em função do inverso da temperatura ($1/T$) para o primeiro estágio de decomposição térmica da biflorina.

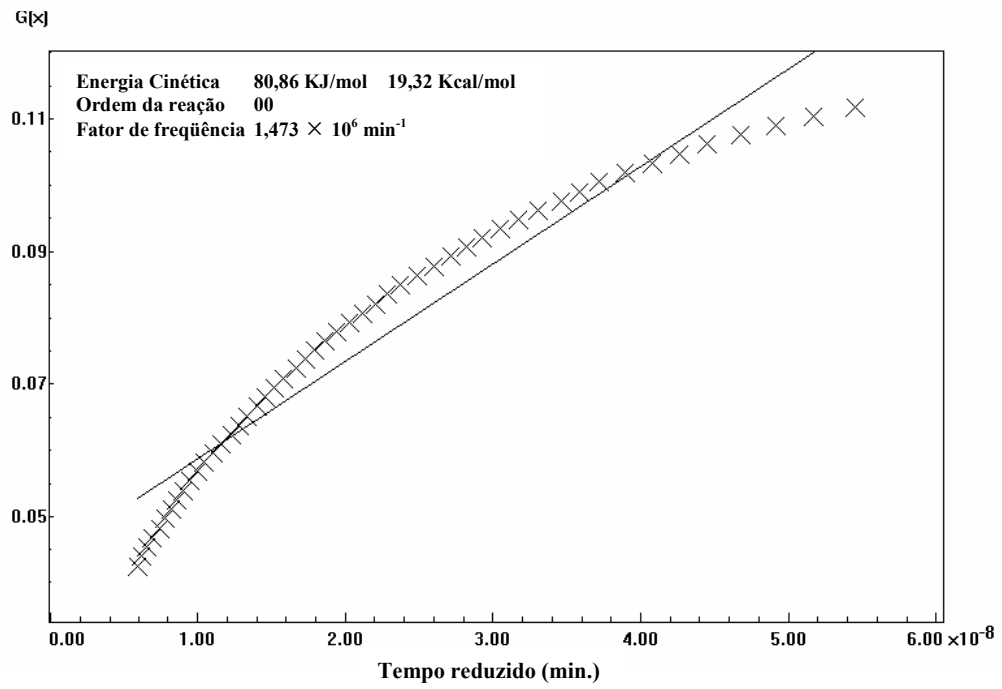


Fig. 7. Relação entre percentagem de massa residual (α) pelo tempo reduzido para as curvas TG da biflorina pelo método não-isotérmico.

8. VALIDAÇÃO

8. VALIDAÇÃO

ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

AUTORES: AQUINO, T. M.; NASCIMENTO, J. E.; SILVA, M. B.; ALBUQUERQUE, U.P.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; ALVES, A. J.

TÍTULO: Validação de Método Isocrático para Doseamento da biflorina em HPLC-UV.

REVISTA: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

PS: O artigo encontra-se nas normas estabelecidas pelo *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ISOCRÁTICO PARA DOSEAMENTO DA BIFLORINA EM HPLC-UV

Aquino, T.M.¹, Nascimento, J.E.¹, Silva, M.B.², Albuquerque, U.P.³, Lima, C.S.A.⁴,
Amorim, E.L.C.¹, Alves, A.J.^{2*}

¹LQF – Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Arthur Sá, Cidade Universitária, 50740-520,
Recife, PE, Brasil

²LTQF – Laboratório de Tecnologia Químico-Farmacêutica, Departamento de Ciências
Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Arthur Sá, Cidade
Universitária, 50740-520, Recife, PE, Brasil

³Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Área de Botânica,
Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Recife, PE 52171-900, Brazil

⁴Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof.
Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, PE, Brasil

Keywords: *Capraria biflora* L.; biflorin; HPLC-UV; validation

* Corresponding author. E-mail address: leac@nlink.com.br (A.J. Alves)

Abstract

A selective high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection for measure of the biflorin was developed and validated, which mansonona F was utilized as internal standard, according USP and ICH specifications. The analytical HPLC-UV method was linear for concentrations ranging 0.5-50 $\mu\text{g/mL}$, showing satisfactory linearity, good sensibility, short time analysis, accuracy mean of 100%, and coefficients of variation less than 6%. Limits of detection and quantification were 0.1862 $\mu\text{g/mL}$ and 0.2822 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The proposed method could be used as reference for assays of the quantification of biflorin raw material or pharmaceutical forms, and photodegratation tests.

INTRODUÇÃO

A partir de extratos de *Capraria biflora* L., espécie pertencente à família Scrophulariaceae, tem-se descobertos compostos biologicamente ativos, incluindo biflorina (3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxiquinona), com propriedades antibióticas, Harpagida e 8-O-benzoylharpagida, dois iridóides com atividades analgésicas e antiflogística, e caprariolideos, que apresentam atividade inseticida [1-3].

A biflorina (figura 1), apresenta uma excelente atividade frente à fungos dermatófitos (*Epidemophyton floccosum*, *Microsporium canis* e espécies do gênero *Trichophyton*), álcool-ácido-resistentes e bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus citreus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus mycoides* e *Mycobacterium phlei*), bactérias Gram-negativas (*Brucella sp*) e em especial leveduras (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*) [4].

INSERIR FIGURA 1

Um método para dosagem da biflorina em HPLC foi proposto, apresentando curva padrão com intervalo entre 1-10 µg/mL, tempo total de análise 7,5 min., e ausência de um padrão interno. Nos ensaios de validação, os coeficientes de variação estiveram próximos a 15% [5].

O objetivo deste trabalho foi a validação de um método simples, rápido e reprodutível de doseamento da biflorina em fase reversa, utilizando-se HPLC-UV, com a introdução de um padrão interno, mansonona F, seguindo as diretrizes da USP e ICH [6, 7].

EXPERIMENTAL

Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando HPLC WATERS, auto injetor WATERS 717 plus, bomba WALTERS 515, detector UV WALTERS 474. A fase móvel foi constituída de uma mistura de metanol e água (90:10 v/v). A eluição foi realizada com um fluxo de 1mL/min., utilizando-se coluna Novapak C₁₈ 39 x 300 cm com I.D. de 10 µm, e um volume de injeção de 20 µl. O sistema foi operado à temperatura ambiente (25 ± 1°C), e o comprimento de onda selecionado foi 245 nm.

Parâmetros da validação

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros operacionais: linearidade, exatidão e precisão (intra-dia, inter-dia e precisão intermediária), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Materiais e solventes

Cristais de biflorina foram isolados a partir do extrato hidroalcoólico das raízes de *Capraria biflora* L., através de cromatografia em sílica gel 60 (230-400 mesh), utilizando-se como sistema eluente um mistura de tolueno e acetato de etila (80:20 v/v). Foram utilizados Metanol grau HPLC e água Milli-Q (Millipore Corporation).

Preparação das soluções padrão

A solução estoque foi preparada dissolvendo-se 10 mg de biflorina em metanol até o volume final de 100 mL. Diluições sucessivas foram realizadas até as concentrações padrões da curva de calibração (0,5-50 µg/mL). A concentração do padrão interno, mansonona F, foi 5 µg/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2 mostra o cromatograma com os picos de biflorina e mansonona F, com boa definição e separação. O tempo médio de retenção da biflorina foi de aproximadamente 4,5 min., e 2,8 min. para mansonona F. O tempo total de análise foi de 6 min.

INSERIR FIGURA 2

Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da média de três curvas autênticas, com onze concentrações cada, contemplando-se um intervalo de 0,5-50 µg/mL. A regressão linear da curva padrão de calibração demonstrou a linearidade do método onde o ponto de interseção da reta não foi significativamente diferente de zero. A equação de regressão linear representativa foi $Y = 0,1673X - 0,0113$ ($n = 11$), com um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9999 (figura 3).

INSERIR FIGURA 3

A análise de variância (ANOVA) dos dados indica que não houve diferença significativa na inclinação das retas das três curvas de calibração, com um intervalo de confiança de 95% (tabela 1).

INSERIR TABELA 1

Precisão e Exatidão

A precisão do método foi avaliada em níveis de repetibilidade (intra e inter-dia) e precisão intermediária das áreas dos picos calculadas para as diferentes concentrações de biflorina. A exatidão do método foi expressada como percentagem de recuperação do analito. Em ambas as análises, foram utilizados três controles em três níveis de concentração diferentes (1, 20 e 40 µg/mL): *CQ-B* (controle de qualidade baixo), *CQ-M* (controle de qualidade médio), *CQ-A* (controle de qualidade alto), respectivamente.

A tabela 2 mostra o ensaio de repetibilidade intra-dia realizado com 18 determinações (6 determinações para cada controle), utilizando-se as mesmas condições experimentais, e pelo mesmo operador. Os coeficientes de variação (CV) obtidos variaram entre 0,05 - 4,58%.

INSERIR TABELA 2

A tabela 3 mostra o ensaio inter-dia, verificado com 9 determinações, durante 3 dias diferentes (3 determinações por dia para cada controle) ambas pelo mesmo operador. Os valores de CV variaram entre 0,22 - 3,20%.

INSERIR TABELA 3

No ensaio de precisão intermediária, os três níveis de controles foram injetados por três analistas diferentes em três dias distintos, com um total de 9 determinações (3 determinações por dia para cada controle), utilizando-se o mesmo equipamento (tabela 4). Os valores de CV variaram entre 0,19 - 5,77%.

INSERIR TABELA 4

Os valores dos CV ($< 6\%$) mostraram a alta precisão obtida com o método. Em todos os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, os valores de exatidão estão próximos a 100%. Todos os resultados foram comparados estatisticamente utilizando-se análise de variância (ANOVA), onde os valores de F-calculado foram bem menores que os valores de F-crítico, indicando que não houve diferença significativa entre os valores encontrados dentro de cada nível dos controles estabelecidos (tabela 5).

INSERIR TABELA 5

Limite de Detecção(LD) e Limite de Quantificação(LQ)

Os valores de LD e LQ foram determinados através da razão entre o desvio padrão do primeiro ponto das três curvas de linearidade e o coeficiente angular (inclinação da reta) da curva de calibração, utilizando os fatores apropriados (ICH, 1995).

O limite de detecção e limite de quantificação calculados para a biflorina foram 0,1862 µg/mL e 0,2822 µg/mL, respectivamente.

CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método de doseamento para a biflorina em HPLC-UV de acordo com as especificações da USP e ICH. Os ensaios mostraram que o método possui uma ampla e satisfatória linearidade, boa sensibilidade, curto tempo de análise, exatidão média de 100%, e coeficientes de variação abaixo de 6%. Sendo assim, o método descrito poderá ser utilizado como referência em ensaios de fotodegradação ou de quantificação da biflorina em materiais brutos ou formas farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

- [1] T. M. Aquino, E.L.C. Amorim, C.S.A. Lima, U.P. Albuquerque, *Acta Farm. Bonae.* 20 (2001) 259-263.
- [2] D.O. Collins, W.A. Gallimore, W.F. Reynolds, L.A.D. Williams, P.B. Reese, *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 1515-1518.
- [3] M. Heinrich, H. Rimpler, *Plant. Med.* 55 (1989) 626.
- [4] D.P. Lyra Jr, T.M. Aquino, C.S. Neves, C.S.A. Lima, E.L.C. Amorim, A.G. Wanderley, D.P. Santana, *Rev. Farm. Quím.* 32 (1999) 19.
- [5] D.P. Lyra Jr, T.M. Aquino, C.S. Neves, C.S.A. Lima, E.L.C. Amorim, A.G. Wanderley, D.P. Santana, *Boll. Chim. Farm.* 138 (1999) 309.
- [6] ICH: Q2B, *Analytical Validation-Methodology* (1996).
- [7] United States Pharmacopeia, Section (1225) "Validation of Compendial Methods", United States Pharmacopeial Convention, Rockville, (1995).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estrutura química da biflorina (3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinona).
- Figura 2** Cromatograma representativo do analito – biflorina e do padrão interno – mansonona F.
- Figura 3** Linearidade da curva de calibração do método, com um intervalo de concentração para a biflorina de 0,5-50 µg/mL.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Análise de variância (ANOVA) para as três curvas de calibração (n=33), com um intervalo de confiança de 95%.
- Tabela 2** Precisão e exatidão do método (ensaio intra-dia) n=18.
- Tabela 3** Precisão e exatidão do método (ensaio inter-dia) n = 9.
- Tabela 4** Precisão intermediária do método (n = 27).
- Tabela 5** Análise de variância (ANOVA) para os três níveis de controle (n=18 para cada nível), com intervalo de confiança de 95%.

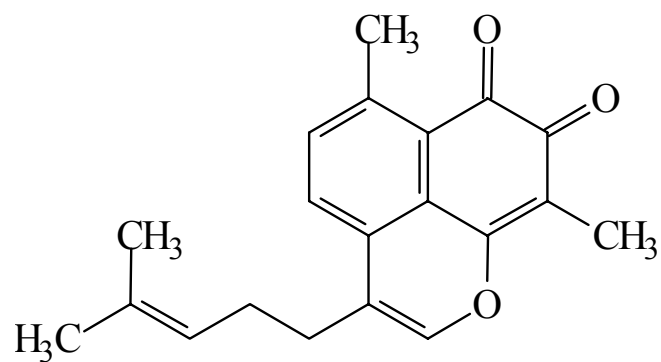


Fig. 1. Estrutura química da biflorina (3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinona).

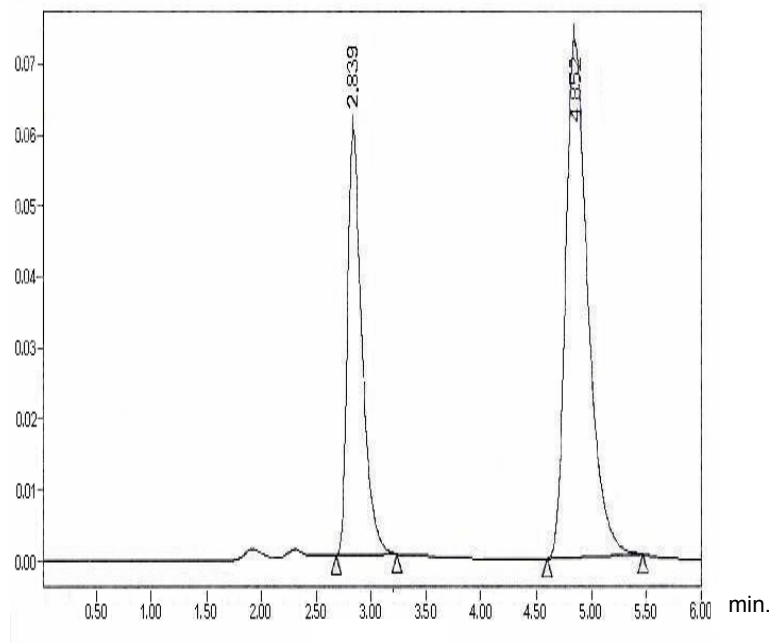


Fig. 2. Cromatograma representativo do analito – biflorina e do padrão interno – mansonona F.

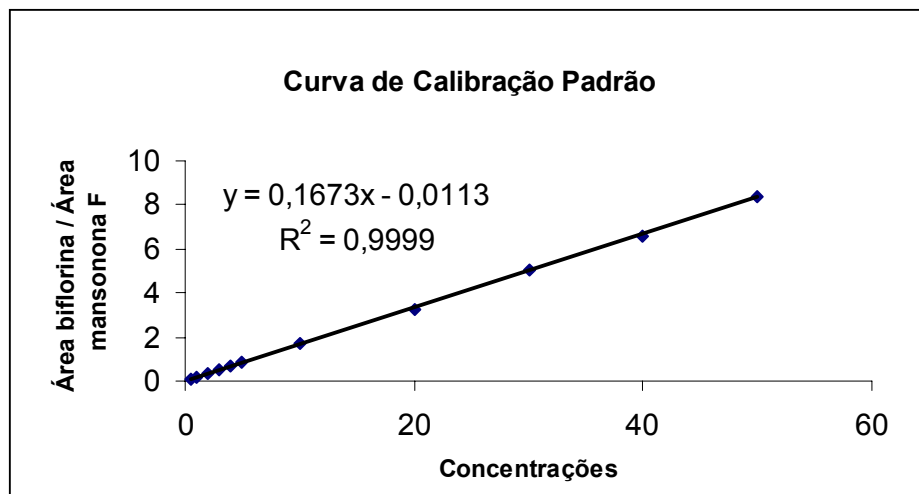


Fig. 3. Linearidade da curva de calibração padrão do método, com um intervalo de concentração para a biflorina de 0,5-50 µg/mL.

Tabela 1

Análise de variância (ANOVA) para as três curvas de calibração (n=33), com um intervalo de confiança de 95%.

| Fonte de variação | SQ | gl | MQ | F-calculado | F-crítico |
|-------------------|-------------|----|-------------|-------------|-----------|
| MODELO | 257,2428097 | 1 | 257,2428097 | 4368,46 | 4,1596 |
| RESIDUAL | 1,825477146 | 31 | 0,05888636 | | |
| FALTA DE AJUSTE | 0,038165816 | 1 | 0,038165816 | | 4,1709 |
| ERRO | 0,937058211 | 30 | 0,031235274 | 1,22188 | |
| TOTAL | 259,0682868 | 32 | 8,095883963 | | |

gl - graus de liberdade.

Tabela 2

Precisão e exatidão do método (ensaio intra-dia) n=18.

| | Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$) | Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$) | σ | precisão (CV%) | Exatidão (%) |
|-------|---|--|----------|-------------------|-----------------|
| Manhã | 1 | 1,02 | 0,021 | 2,11 | 101,67 |
| | 20 | 19,89 | 0,044 | 0,22 | 99,47 |
| | 40 | 40,05 | 0,022 | 0,05 | 100,13 |
| Tarde | 1 | 1,02 | 0,047 | 4,58 | 101,59 |
| | 20 | 19,99 | 0,263 | 1,32 | 99,94 |
| | 40 | 40,01 | 0,128 | 0,32 | 100,01 |

 σ - desvio padrão; CV% - coeficiente de variação.

Tabela 3

Precisão e exatidão do método (ensaio inter-dia) n = 9.

| Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$) | Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$) | σ | precisão (CV%) | Exatidão (%) |
|---|--|----------|-------------------|-----------------|
| 1 | 1,03 | 0,033 | 3,20 | 103,00 |
| 20 | 19,86 | 0,183 | 0,92 | 99,28 |
| 40 | 40,07 | 0,089 | 0,22 | 100,17 |

 σ - desvio padrão; CV% - coeficiente de variação.

Tabela 4

Precisão intermediária do método (n = 27).

| | Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$) | Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$) | σ | precisão (CV%) | Exatidão (%) |
|------------|---|--|----------|-------------------|-----------------|
| Operador 1 | 1 | 1,01 | 0,019 | 1,85 | 101,40 |
| | 20 | 19,76 | 0,153 | 0,78 | 98,82 |
| | 40 | 40,12 | 0,075 | 0,19 | 100,29 |
| Operador 2 | 1 | 1,02 | 0,059 | 5,77 | 102,03 |
| | 20 | 20,01 | 0,338 | 1,69 | 100,06 |
| | 40 | 39,99 | 0,165 | 0,41 | 99,98 |
| Operador 3 | 1 | 1,03 | 0,057 | 5,58 | 102,92 |
| | 20 | 19,84 | 0,596 | 3,01 | 99,20 |
| | 40 | 40,08 | 0,291 | 0,72 | 100,20 |

 σ - desvio padrão; CV% - coeficiente de variação.

Tabela 5

Análise de variância (ANOVA) para os três níveis de controle (n=18 para cada nível), com intervalo de confiança de 95%.

| Fonte de variação | SQ | gl | MQ | F-calculado | F-crítico |
|-------------------|-----------|----|-----------|-------------|-----------|
| 1 µg/mL | 3,35 E-07 | 1 | 3,35 E-07 | 0,00016 | 4,49 |
| 20 µg/mL | 0,00752 | 1 | 0,00750 | 0,06275 | 4,49 |
| 40 µg/mL | 0,00178 | 1 | 0,0018 | 0,06252 | 4,49 |

gl - graus de liberdade.

9. RADIOMARCAÇÃO

9. RADIOMARCAÇÃO

ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

AUTORES: AQUINO, T.M.; AMORIM, E.L.C.; DIRÉ, G.; LIMA, E.A.C.; GOMES, M.L.; LIMA, C.S.A.; ALBUQUERQUE, U.P.; BERNARDO-FILHO, M.

TÍTULO: Influência da Biflorina na Marcação de Células Sangüíneas, Proteínas Plasmáticas, Proteínas Celulares e Linfócitos com Tecnécio-99m: Estudo *In Vitro*.

REVISTA: Fitoterapia.

PS: O artigo encontra-se nas normas estabelecidas pela *Fitoterapia*.

**INFLUÊNCIA DA BIFLORINA NA MARCAÇÃO DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS,
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS, PROTEÍNAS CELULARES E LINFÓCITOS COM
TECNÉCIO-99M: ESTUDO IN VITRO**

**T.M. Aquino^a, E.L.C. Amorim^a, G. Diré^b, E.A.C. Lima^b, M.L. Gomes^b, C.S.A. Lima^c,
U.P. Albuquerque^d, M. Bernardo-Filho^{b*}**

*^aUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de
Ciências Farmacêuticas, Av. Professor Artur de Sá, S/N, Recife, PE 50521-741, Brazil*

*^bUniversidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes,
Departamento de Biofísica e Biometria, Av. 28 de Setembro, 87, Rio de Janeiro, RJ 20551-
030, Brazil*

*^cUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de
Biofísica e Radiobiologia, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901 Brazil*

*^dUniversidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Área de Botânica,
Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Recife, PE 52171-900, Brazil*

* Corresponding author. Tel.: +55-21-587-6432; fax: +55-21-5876432.

E-mail address: bernardo@uerj.br (M. Bernardo-Filho)

Keywords: biflorine, *Capraria biflora*, Technetium-99m.

Abstract

In this paper is reported results of studies involving the influence of biflorin, o-quinone isolated from of *Capraria biflora* L., which has potent antimicrobial active, on the labeling of red blood cells, plasma proteins, cells proteins and lymphocytes with Tc-99m using an *in vitro* study. Blood was withdrawn from *Wistar* rats and incubated with various concentrations of the biflorin. Solution of stannous chloride and Tc-99m were added. Plasma (P) and red blood cells (RBC) were isolated, also precipitated, centrifuged and soluble (SF) and insoluble (IF) fractions isolated. The analysis of the results shows that the highest concentration (100%) of the extract is capable to reduce the uptake of Tc-99m (%ATI) on RBC and the fixation on the IF-P. In the influence of biflorin on the labeling of lymphocytes with 99mTc, Blood withdrawn from *Wistar* rats and using a technique with Ficoll-Hypac, centrifuged and white cells were isolated. Lymphocytes (2.5 mL; 1.0×10^6 cells/mL) were obtained. After that, 0.2mL of this solution of lymphocytes was incubated with biflirin (0.1 mL). Solutions of stannous chloride and 99mTc were added. Lymphocytes were separated and the %ATI bound in these cells was evaluated. It was observed a reduction of %ATI from 97.85 ± 0.99 to 88.86 ± 5 for RBC and from 73.24 ± 5.51 to 20.72 ± 6.95 for the IF-P. The analysis of the results showed that there is not a decrease in %ATI in lymphocytes with the biflorin. In conclusion, probably, biflorin can be abolishing or reducing the SnCl₂ effect.

1. Introdução

Capraria biflora L. é uma espécie pertencente à família Schrophulariaceae, originária das Antilhas e América do Sul. No Brasil, distribui-se nos estados de Minas Gerais, Goiás e na faixa litorânea entre o Piauí e Espírito Santo [1]. Nesta região, pode ser conhecida como chá-da-terra, chá-do-méxico, chá-da-martinica, chá-do-rio, chá-da-américa, chá-das-antilhas e chá-de-lima [2].

A partir de suas raízes, pode-se isolar um composto denominado biflorina, com estrutura o-quinônica, a qual apresenta atividade antimicrobiana comprovada frente a bactérias gram-positivas, leveduras e fungos (fig. 1) [3-6].

INSERIR FIGURA 1

Radiofármacos são moléculas ou células que contêm um átomo radioativo em sua estrutura, sendo apropriados para uso em seres humanos, com fins de diagnóstico e para o tratamento de doenças. Nas ciências da saúde, as aplicações primordiais são como fonte de radiação ou como traçadores radioativos [7].

A interação de radiofármacos com drogas medicamentosas é um dos fatores que tem merecido grande atenção por parte dos pesquisadores, uma vez que podem modificar a natureza química do radiotraçador, alterar o meio bioquímico do alvo e do não alvo no qual o radiofármaco estaria relacionado, e favorecer ou dificultar a ligação do mesmo às proteínas plasmáticas e aos elementos sanguíneos [8-10]. Desta forma, a distribuição normal dos radiofármacos pode ser alterada, resultando em diagnósticos imprecisos e também, levando, muitas vezes, a repetição de exames e expondo pacientes a doses de radiação desnecessárias [8, 11-15].

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da biflorina na marcação *in vitro* de hemácias, proteínas plasmáticas, proteínas celulares e linfócitos com Tc-99m.

2. Metodologia

2.1. Obtenção de biflorina

O extrato hidroalcoólico das raízes de *Capraria biflora* L., após concentrado sob vácuo, foi submetido à coluna cromatográfica em sílica gel 60 (230-400 mesh), utilizando-se como fase móvel tolueno/acetato de etila (8:2), obtendo-se, após purificação, biflorina sob a forma de cristais violáceos.

2.2. Preparação das soluções

Uma solução inicial foi preparada diluindo-se 25mg da droga em 10ml de uma solução de salina 0,9% / etanol 8:2 (v/v), onde após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, foi considerada como 100% (2,5mg/mL). A partir de diluições sucessivas, foram preparadas as soluções 50% (1,25mg/mL), 25% (0,625mg/mL), 12,5% (0,3125mg/mL) e 6,25% (0,1562mg/mL).

2.3. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (200-250g) de ambos os sexos obtidos na Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em condições ambiente (22±5°C, 12h de ciclo dia/noite).

2.4. Obtenção dos linfócitos

Amostras de sangue humano de voluntários foram tratadas com Ficoll-Hypac (...) e centrifugadas, isolando-se as células brancas. Posteriormente, os linfócitos foram lavados por centrifugação com solução salina 0,9%, obtendo-se 2,5mL de uma solução com 10^6 células/mL.

2.5. Protocolo de estudo

O Tc-99m utilizado, foi obtido no setor de medicina nuclear do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, eluído de gerador Mo-99/Tc-99m, produzido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo (IPEN), pertencente a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), Brasil.

A contagem de radioatividade foi realizada em cintilador sólido (Automatic Gamma Counter, modelo C 5002, Packard, Canadá) provido de cintilador de poço com cristal de iodeto de sódio, contendo impureza de Tálcio. Todos os procedimentos foram feitos seguindo-se as normas de proteção radiológica da CNEN Brasil.

Amostras de 0,5mL de sangue de ratos *Wistar*, com anticoagulante heparina, foram incubadas à temperatura ambiente, por uma hora, com 100 μ L de biflorina, nas concentrações pré-determinadas, sendo realizada em quadruplicata para cada concentração. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de solução de SnCl₂ (1,2 μ g/mL), também à temperatura ambiente. Após mais uma hora de incubação, foram adicionados 0,1 mL de Tc-99m (3,7 MBq) na forma de pertecnetato de sódio (^{99m}NaTcO₄), e a incubação continuou nas mesmas condições por mais 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, com o objetivo de separar as frações contendo plasma (P) e células (C), respectivamente. Aliquotas de 20 μ L de P

e C foram diluídas em 1mL de água destilada, realizando-se então a contagem de radioatividade (CR), calculando-se assim a percentagem de atividade (%ATI) em cada uma delas. Aliquotas de 20 µL de P e C foram precipitadas em 1ml de ácido tricloroacético (TCA 5%), sendo posteriormente centrifugadas (1500 rpm; 5 min.), isolando-se as frações solúvel e insolúvel do plasma (FS-P; FI-P) e célula (FS-C; FI-C), sendo em ambas realizada a contagem de radioatividade e conseqüentemente o cálculo da percentagem de atividade. Para os controles utilizou-se solução salina 0,9%.

Amostras de 200µL da solução de linfócitos (10^6 células/mL) foram incubadas com 100µL de biflorina (100%), por 60 minutos. Após este período, foram adicionados 0,5 mL de solução de SnCl₂ (1,2 µg/mL). Após mais uma hora de incubação, adicionou-se 0,1 mL de Tc-99m (3,7 MBq) na forma de pertecnetato de sódio (^{99m}NaTcO₄), e a incubação continuou nas mesmas condições por mais 10 minutos. Para o controle, a incubação foi realizada com salina 0,9%. Em ambos os grupos controle e tratado, os ensaios foram realizados em triplicata. A solução aquosa (S) e os linfócitos (L) foram separados, calculando-se a percentagem de atividade (%ATI) em cada um deles.

Os resultados dos experimentos foram comparados empregando-se a análise de variância (ANOVA), considerando-se $p < 0,05$.

3. Resultados

A tabela 1 mostra a percentagem de radioatividade no plasma e células sanguíneas, das amostras de sangue incubadas *in vitro* com as diferentes concentrações de biflorina. Os resultados indicam que as concentrações 50 e 100% são capazes de reduzir, ambos de forma significativa ($p < 0,001$) a %ATI nas células, passando de $92,92 \pm 4,50$ para $79,51 \pm 3,15$ na concentração de 50%, e para $64,06 \pm 1,95$ na concentração de 100%.

INSERIR TABELA 1

A tabela 2 mostra a fixação de radioatividade nas frações solúvel e insolúvel do plasma de amostras de sangue incubadas *in vitro* com as diferentes concentrações de biflorina. Os resultados indicam que todas as concentrações reduzem, de forma extremamente significativa ($p < 0,001$), a %ATI na fração insolúvel do plasma, exceto a concentração de 12,5%, que foi de forma apenas significativa ($p < 0,01$), passando de $71,68 \pm 1,70$ para $6,30 \pm 2,09$, na concentração de 6,25%, para $49,42 \pm 3,37$, na concentração de 12,5%, para $46,83 \pm 3,01$, na concentração de 25%, para $34,52 \pm 9,16$, na concentração de 50%, e para $29,51 \pm 7,11$, na concentração de 100%.

INSERIR TABELA 2

A tabela 3 mostra a distribuição de radioatividade nas frações solúvel e insolúvel das células de amostras de sangue incubadas *in vitro* com as diferentes concentrações de biflorina. Os resultados indicam que apenas a concentração de 100% é capaz de reduzir a %ATI na fração insolúvel da célula, passando de $80,83 \pm 4,82$ para $56,45 \pm 8,71$, sendo considerado um resultado extremamente significativo ($p < 0,001$).

INSERIR TABELA 3

A tabela 4 mostra a percentagem de radioatividade na solução aquosa e linfócitos incubados com biflorina (100%). Os resultados indicam que a concentração da droga utilizada não promoveu decréscimo da percentagem de radioatividade nos linfócitos tratados, quando comparados com o grupo controle.

INSERIR TABELA 4

4. Discussão e Conclusão

Semelhante à drogas já comercializadas, como hidralazina, prazosin, digoxina e metildopa, as quais diminuem significativamente a eficiência de marcação de hemácias com Tc-99m, os ensaios *in vitro* revelaram que a biflorina também possui esta propriedade. Outras drogas, como propanolol, verapamil, clorotiazida e furasemida, em doses clínicas, também podem produzir uma significativa redução neste processo de marcação [10]. Os testes *in vitro* também revelaram que a biflorina diminuem a marcação do Tc-99m nas proteínas celulares, o que poderia estar comprometendo o processo de entrada da mesma através da membrana plasmática das hemácias, diminuindo a marcação no seu interior.

O processo pelo qual ocorre a entrada do SnCl₂ e do íon pertecnetato de sódio na célula ainda não foi completamente estabelecido, porem, há dados que sugerem que o primeiro atravesse a membrana plasmática das células através dos canais seletivos de cálcio, e o segundo pelo sistema de transporte “ânion banda-3” [10, 16-19].

Quando uma determinada droga ou extrato vegetal altera a percentagem de atividade (%ATI) de hemácias ou outros elementos sangüíneos, pode-se sugerir competição com o SnCl₂ ou íon pertecnetato pelos mecanismos de transporte da membrana plasmática, anteriormente citados; Modificações morfológicas a nível de membrana plasmática nas células sangüíneas, favorecendo ou bloqueando, em geral, o transporte de elementos para o interior das mesmas; Competição por outros sítios de ligação do SnCl₂, íon pertecnetato, ou do próprio radiofármaco; Desfavorecimento da ligação do Tc-99m às proteínas plasmáticas, alterando assim o seu processo de biodistribuição no organismo através do sangue; Atuação como agentes oxidantes ou redutores, modificando assim a valência dos íons estano ou

pertecnato, aumentando ou diminuindo o processo da marcação no interior das células sanguíneas [8, 14].

Em geral, foi demonstrado que a biflorina, possui a propriedade de alterar o processo de marcação de elementos sanguíneos com o radiofármaco Tc-99m. Com isso, administrações conjuntas de futuras formas farmacêuticas contendo o princípio ativo, e o radioisótopo tecnécio, podem acarretar em uma má interpretação de exames para fins diagnósticos, devido a um comportamento não esperado apresentado pelo radiofármaco [20].

5. Referências Bibliográficas

1. Menezes AI. Flora da Bahia. São Paulo: Nacional, 1949.
2. Comerford SC. Econ Bot 1996; 50: 327-336.
3. Gonçalves de Lima O, D'Albuquerque IL, Loureiro P, Carmona CL, Bernard MZ. Rev Quím Ind 1954; 249: 28-30.
4. Gonçalves de Lima O, D'Albuquerque IL. Rev Inst Antibiot. 1958; 1: 7-9.
5. Gonçalves de Lima O, D'Albuquerque IL, Neto BM, Albuquerque MM. Rev Inst Antibiot 1958; 1/2: 95-97.
6. Gonçalves de Lima O, D'Albuquerque IL, Navarro MCP. Rev Inst Antibiot 1962; 1/2: 79-81.
7. Saha GB. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. New York: Springer-Verlag, 1998.
8. Hladik III WB, Saha GB, Study KT. Essentials of Nuclear Medicine Science. Sidney: Williams and Wilkings, 1987.
9. Srivastava SC, Straub RF. Semin Nucl Med 1990; 1: 41-51.
10. Sampson CB. Nucl. Med. Commun. 1996; 17: 648-658.
11. Hicks RJ, Arkles LB. Eur J Nucl Med 1992; 19: 1050-1053.

12. Kelly MJ, Cowie AR, Antonino A, Barton H, Kalff V. J Nucl Med 1992; 33: 2222-2225.
13. Bernardo-filho M, Gutfilen B, Maciel OS. Nucl Med Commun 1994; 15: 730-734.
14. Santos JS, Paula EF, Correa TG, Freitas LC, Fonseca LM, Gutfilen B, Bernardo-Filho M. Braz J Med Biol Res 1995; 28: 131-135.
15. Eising EG, Reiners C. Nucl Med Commun 1998; 19: 241-250.
16. Callahan RJ, Rabito AC. J Nucl Med 1990; 31: 2004-2008.
17. Gutfilen B, Boasquevisque EM, Bernardo-Filho M. Rev Esp Med Nucl 1992;11: 195-199.
18. Smith EL. Bioquímica dos mamíferos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.
19. Stryer L. Bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
20. Carlsson S. Acta Oncol 1995; 34: 1095-1102.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química da biflorina, isolada a partir das raízes de *C. biflora* L.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Influência da biflorina na marcação de células sanguíneas e plasma com Tc-99m.
- Tabela 2** Efeito da biflorina na marcação de proteínas plasmáticas com Tc-99m.
- Tabela 3** Influência da biflorina na marcação de proteínas celulares com Tc-99m.
- Tabela 4** Percentagens de atividade de linfócitos incubados *in vitro* com biflorina.

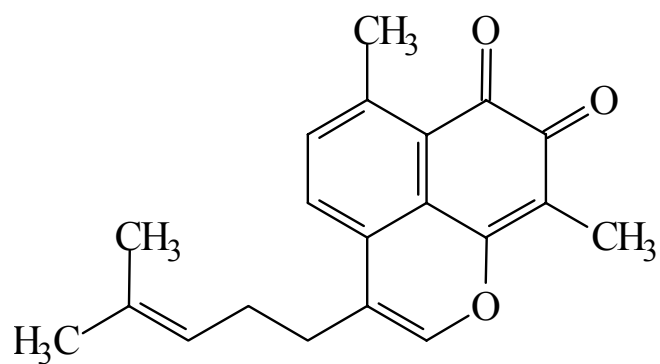


Figura 1. Estrutura química da biflorina, isolada a partir das raízes de *C. biflora* L.

Tabela 1. Influência da biflorina na marcação de células sanguíneas e plasma com Tc-99m.

| Concentração de biflorina (%) | %ATI | |
|-------------------------------------|---------------------------|------------|
| | C | P |
| 0,0 (control) | 92,92±4,50 | 7,06±4,50 |
| 6,25 | 97,07±1,16 ^{ns} | 2,92±1,16 |
| 12,5 | 96,70±0,64 ^{ns} | 3,28±0,64 |
| 25,0 | 92,14±1,53 ^{ns} | 7,85±1,53 |
| 50,0 | 79,51±3,15 ^{***} | 20,48±3,15 |
| 100,0 | 64,06±1,95 ^{***} | 35,92±1,95 |

*** - valor de $P < 0,001$, considerado extremamente significativo; ns - não significativo; P – plasma; C – células; %ATI – percentagem de atividade.

Tabela 2. Efeito da biflorina na marcação de proteínas plasmáticas com Tc-99m.

| Concentração de biflorina (%) | %ATI | |
|-------------------------------------|---------------|------------|
| | FI-P | FS-P |
| 0,0 (control) | 71,68±1,70 | 28,30±1,70 |
| 6,25 | 6,30±2,09*** | 93,68±2,09 |
| 12,5 | 49,42±3,37** | 50,57±3,37 |
| 25,0 | 46,83±3,01*** | 53,15±3,01 |
| 50,0 | 34,52±9,16*** | 65,46±9,16 |
| 100,0 | 29,51±7,11*** | 70,47±7,11 |

** - valor de $P < 0,01$, considerado muito significativo; *** - valor de $P < 0,001$, considerado extremamente significativo; FS-P – fração solúvel do plasma; FI-P – fração insolúvel do plasma; %ATI – percentagem de atividade.

Tabela 3. Influência da biflorina na marcação de proteínas celulares com Tc-99m.

| Concentração de biflorina (%) | %ATI | |
|-------------------------------------|---------------------------|------------|
| | FI-C | FS-C |
| 0,0 (control) | 80,83±4,82 | 19,15±4,82 |
| 6,25 | 88,70±3,76 ^{ns} | 11,28±3,76 |
| 12,5 | 79,38±1,60 ^{ns} | 20,60±1,60 |
| 25,0 | 81,17±2,47 ^{ns} | 18,81±2,47 |
| 50,0 | 77,75±2,68 ^{ns} | 22,23±2,67 |
| 100,0 | 56,45±8,71 ^{***} | 43,53±8,71 |

*** - valor de $P < 0,001$, considerado extremamente significativo; ns - não significativo; FS-C – fração solúvel da célula; FI-C – fração insolúvel da célula; %ATI – percentagem de atividade.

Tabela 4. Percentagens de atividade de linfócitos incubados *in vitro* com biflorina

| Amostra | controle | Biflorina (100%) |
|---------|------------|--------------------------|
| | %ATI | |
| S | 9,54±2,18 | 10,43±7,47 ^{ns} |
| L | 90,45±2,18 | 89,56±7,47 ^{ns} |

%ATI - percentagem de radioatividade; ns - valor não significativo; S - solução aquosa; L - linfócitos.

ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

AUTORES: AQUINO, T.M.; AMORIM, E.L.C.; DIRÉ, G.; LIMA, E.A.C.; GOMES, M.L.; LIMA, C.S.A.; ALBUQUERQUE, U.P.; BERNARDO-FILHO.

TÍTULO: Efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Capraria biflora* L. na Marcação *In Vitro* e *In Vivo* de Elementos Sanguíneos com Tecnécio-99m, na Biodistribuição do Radiofármaco, e na Morfologia e Fragilidade Osmótica de Células Sanguíneas.

REVISTA: *Journal of Ethnopharmacology*.

PS: O artigo encontra-se nas normas estabelecidas pelo *Journal of Ethnopharmacology*.

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *CAPRARIA BIFLORA* L. NA MARCAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS COM TECNÉCIO-99M, NA BIODISTRIBUIÇÃO DO RADIOFÁRMACO, E NA MORFOLOGIA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

**T.M. Aquino^a, E.L.C. Amorim^a, G. Diré^b, E.A.C. Lima^b, M.L. Gomes^b, C.S.A. Lima^c,
U.P. Albuquerque^d, M. Bernardo-Filho^{b*}**

^aUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Av. Professor Artur de Sá, S/N, Recife, PE 50521-741, Brazil

^bUniversidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Biofísica e Biometria, Av. 28 de Setembro, 87, Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil

^cUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901 Brazil

^dUniversidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Área de Botânica, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Recife, PE 52171-900, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55-21-587-6432; fax: +55-21-5876432.

E-mail address: bernardo@uerj.br (M. Bernardo-Filho)

Keywords: *Capraria biflora* L.; Technetium-99m; Oxidant agent

Abstract

This study evaluated the influence of hydroalcoholic extract of leaves of *Capraria biflora* L. on the labeling of red blood cells, plasma proteins, cells proteins (*in vitro* and *in vivo* studies) and lymphocytes (*in vitro* study) with Tc-99m, on the biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate, and on the morphology of red blood cells. The analysis of the results shows that the highest concentration of the extract reduced, *in vivo*, the uptake of Tc-99m (%ATI) on RBC and IF-P. In the *in vitro* study was observed a reduction of %ATI for RBC and IF-P when utilized several concentrations. The analysis of the results showed that there is not a decrease in %ATI in lymphocytes. The results have shown that the %ATI/g has not been significantly altered ($p>0.05$) in the treated animals. Slides were prepared for each sample of blood treated with different concentrations of *C. biflora* L. There was quantitative differences in morphology to RBCs. This extract, probably, has oxidative properties, acting in stannous ion.

1. Introdução

Radiofármacos são substâncias ou células que contêm um átomo radioativo em sua estrutura, sendo apropriados para uso em seres humanos, com fins diagnóstico para o tratamento de doenças. Nas ciências da saúde, as aplicações primordiais são como fonte de radiação ou como traçadores radioativos (Saha, 1998).

Para que ocorra o processo de marcação de células e moléculas com o Tc-99m, geralmente utiliza-se um agente redutor, o qual possui o objetivo de promover a redução do radionuclídeo da valência +7 para valências mais baixas (+3, +4, +5), facilitando assim a sua penetração em estruturas e moléculas de interesse biológico (Rao et al, 1986; Saha, 1998; Bernardo-Filho, 1999). Dentre os diferentes agentes químicos utilizados para a redução do tecnécio-99m, o cloreto estanoso (SnCl_2) é o mais frequentemente utilizado para esta finalidade (Dewanjee et al, 1990; Srivastava & Straub, 1990; Harbert et al, 1996).

A interação com drogas medicamentosas é um dos fatores que tem merecido grande atenção por parte dos pesquisadores, uma vez que podem modificar a natureza química de um radiofármaco, alterar o meio bioquímico do alvo e do não alvo no qual o radiofármaco está exposto, e favorecer ou dificultar a ligação do mesmo às proteínas plasmáticas e aos elementos sanguíneos (Hladik III et al, 1987; Srivastava et al, 1990; Sampson, 1996). Desta forma, a distribuição normal destes radiotraçadores pode ser alterada, resultando em diagnósticos imprecisos e também, levando, muitas vezes, a repetição de exames e expondo pacientes a doses de radiação desnecessárias (Hladik III et al, 1987; Hicks et al, 1992; Kelly et al, 1992; Bernardo-Filho et al, 1994; Santos et al, 1995; Eising and Reiners, 1998).

Uma série de trabalhos relatam que determinadas drogas podem provocar alterações estruturais e morfológicas em hemácias, como: anemia hemolítica, anemia megaloblástica, lesões mitocondriais, hemólise oxidativa e alterações da membrana celular.

Com isto, o processo de marcação do radiofármaco nas hemácias estaria comprometido, pois alterariam a entrada ou permanência do marcador no interior da célula. As alterações morfológicas a nível de membrana, em especial, podem tornar a mesma frágeis, alterando-se assim a pressão osmótica, induzindo a lise pelo movimento interno de água e externo de hemoglobina, comprometendo também a função e permanência do radiomarcador no interior da célula (Didelon et al, 2000).

A partir dos trabalhos descritos na literatura, os quais comprovaram que extratos vegetais poderiam interferir na marcação de elementos sanguíneos com Tc-99m, alterando-se assim diagnósticos ou tratamentos nos quais utilizam-se radiofármacos que contêm o tecnécio (Oliveira et al, 1997; Oliveira et al, 2000; Vidal et al, 1998) cresceu o interesse de se identificar outras espécies vegetais que também sejam capazes de alterar esta marcação.

Capraria biflora L. é uma espécie pertencente à família Schrophulariaceae, originária das Antilhas e América do Sul, a qual habita zonas temperadas ou áreas de clima tropical (Matos, 1988). A espécie é amplamente distribuída no continente americano, em países como Peru, Guiana Francesa, Trinidad-Tobago, México, Curaçao, Guatemala e Bahamas. No Brasil, distribui-se nos estados de Minas Gerais, Goiás e na faixa litorânea entre o Piauí e Espírito Santo (Menezes, 1949). Dentre os nomes populares, pode ser conhecida no Brasil como chá-de-marajó, chá-da-balsaminha, chá-do-maranhão, chá-bravo e chá-de-preto (Le Cointe, 1947; Morton, 1968; Luu, 1975; Eldridge, 1975; Wong, 1976; Alfaro, 1984; Comerford, 1996).

Diversas utilizações populares estão associadas à *C. biflora* L. A espécie poderia substituir o chá-da-índia para o combate de dores no estômago, dispepsia, bem como ser utilizada em associação com outras plantas como febrífuga, diurética, estimulante e digestiva (Corrêa, 1931). No Brasil, tem-se relatos da utilização de uma associação de plantas, incluindo a *C. biflora* L., como diurética, calmante, bem como para o tratamento de afecções no aparelho urinário (Cordeiro, 1996). Já o infuso feito com suas folhas e extremidades

floridas pode ser utilizado como estomacal, sudorífico, febrífugo e para afecções do trato urinário (Lorenzi & Matos, 2002).

Em países da América do Sul, como Trinidad, Peru e Guiana Francesa, as folhas de *C. biflora* L. são usadas contra febres, gripes, dismenorréia, urticária, vômitos, sarampo, e para lavagens oftálmicas (Wong, 1976). Já seu decocto, por via oral, é utilizado como estimulante, colagogo, adstringente, estupefaciente, bem como na cura de feridas e paralisia dos músculos (Luu, 1975; Ramirez et al, 1988). Em países das Américas Central e do Norte, como Guatemala, Bahamas, Curaçao e México, a decoção das folhas é indicada para o tratamento de edemas e câimbras nas pernas, dores no corpo e dores no estômago, bem como para problemas urinários (Perez et al, 1984; Comerford, 1996). A infusão das folhas é indicada em casos de indigestão, diarreia e afecções ovarianas. Já o extrato aquoso quente das folhas é indicado para diabetes, diarreia, gonorréia, debilidade geral, ducha vaginal bem como para perda de memória (Morton, 1968; Ayensu, 1978). Na Índia, utiliza-se o extrato quente para casos de febre, diarreia e dismenorréia (Ayensu, 1978). Já a infusão e decoção das folhas é utilizada para diabetes, bem como no intuito de apressar o parto e diminuir a dor (Eldridge, 1975).

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas (EHF) de *C. biflora* L. na marcação in vitro e in vivo de hemácias, proteínas plasmáticas, proteínas celulares e na marcação in vitro de linfócitos com Tc-99m; na biodistribuição do radiofármaco Tc-99m na forma de íon pertecnetato; na morfologia de hemácias marcadas com Tc-99m.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material botânico

Capraria biflora L. foi coletada na ilha de Itamaracá, litoral norte do estado de Pernambuco. As suas folhas foram secas, trituradas, e maceradas com etanol 96% até esgotamento. Após, o extrato bruto foi obtido através de concentração sob vácuo. Material testemunho encontra-se depositado no herbário do Instituto de Pesquisas Agropecuária (IPA) sob o número 57.902.

2.2 Preparação das soluções

As soluções do EHF foram preparadas inicialmente diluindo-se 100mg do extrato bruto em 10mL de solução salina 0,9%. Esta solução, após centrifugação a 1500rpm por 5 minutos, utilizando-se centrífuga clínica Alpha ICA (Instrumentos Científicos Alpha Ltda.), foi considerada 100% (10mg/mL). A partir de diluições sucessivas, foram preparadas as soluções 50% (5mg/mL), 25% (2,5mg/mL), 12,5% (1,25mg/mL) e 6,25% (0,625mg/mL).

2.3 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, todos de uma mesma ninhada e de sexo masculino, com peso entre 250-300g, obtidos no biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

2.4. Obtenção dos linfócitos

Amostras de sangue humano de voluntários foram tratadas com Ficoll-Hypac e centrifugadas, isolando-se as células brancas. Posteriormente, os linfócitos foram lavados por centrifugação com solução salina 0,9%, obtendo-se 2,5mL de uma solução com 10^6 células/mL.

2.5 Protocolo de estudo

O Tc-99m utilizado, foi obtido no setor de medicina nuclear do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, eluído de gerador Mo-99/Tc-99m, produzido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo (IPEN), pertencente a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), Brasil.

A contagem de radioatividade foi realizada em equipamento contendo um cintilador sólido (Automatic Gamma Counter, modelo C 5002, Packard, Canadá) provido de cintilador de poço com cristal de iodeto de sódio, contendo impureza de Tálcio. Todos os procedimentos foram feitos seguindo-se as normas de proteção radiológica da CNEN Brasil.

Amostras de 0,5mL de sangue de ratos *Wistar*, com anticoagulante heparina, foram incubadas à temperatura ambiente, por uma hora, com 100 μ L do EHF nas concentrações pré-determinadas, sendo realizada em quadruplicata para cada concentração. Após, adicionou-se 0,5 mL de solução de SnCl₂ (1,2 μ g/mL), também à temperatura ambiente. Após mais uma hora de incubação, foram adicionados 0,1 mL de Tc-99m (3,7 MBq) na forma de pertecnetato de sódio (^{99m}NaTcO₄), e a incubação continuou nas mesmas condições por mais 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, com o objetivo de separar as frações contendo plasma (P) e células (C), respectivamente. Aliquotas de 20 μ L de P e C

foram diluídas em 1mL de água destilada, realizando-se então a contagem de radioatividade (CR), calculando-se assim a percentagem de atividade (%ATI) em cada uma delas. Aliquotas de 20 µL de P e C foram precipitadas em 1ml de ácido tricloroacético (TCA 5%), sendo posteriormente centrifugadas (1500 rpm; 5 min.), isolando-se as frações solúvel e insolúvel do plasma (FS-P; FI-P) e célula (FS-C; FI-C), sendo em ambas realizada a contagem de radioatividade e conseqüentemente o cálculo da percentagem de atividade. Para os controles substituiu-se a incubação do EHF por solução salina 0,9%.

Amostras de 200µL da solução de linfócitos (10^6 células/mL) foram incubadas com 100µL do EHF (100%) por 60 minutos. Após, foram adicionados 0,5 mL de solução de SnCl_2 (1,2 µg/mL). Após mais uma hora de incubação, adicionou-se 0,1 mL de Tc-99m (3,7 MBq) na forma de pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{NaTcO}_4$), e a incubação continuou nas mesmas condições por mais 10 minutos. Para o controle, a incubação foi realizada com salina 0,9%. Em ambos os grupos controle e tratado, os ensaios foram realizados em triplicata. A solução aquosa (S) e os linfócitos (L) foram separados, calculando-se a percentagem de atividade (%ATI) em cada um deles.

Para a determinação da influência do EHF na marcação *in vivo* do Tc-99m, animais (n=8) foram separados, de forma randômica, nos grupos tratado (n=4) e controle (n=4). Nos animais do grupo tratado, foram administrados diariamente, por via oral (gavagem), 1mL da concentração 100% do EHF, por sete dias consecutivos. Para os animais do grupo controle, as administrações foram realizadas com salina 0,9%. Amostras de 0,5 mL de todos os animais dos grupos tratado e controle foram obtidas com anticoagulante heparina. Em seguida, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para a marcação *in vitro*.

Para o ensaio de biodistribuição, Foram realizadas administrações da solução 100% do EHF em animais, seguindo o mesmo procedimento descrito no ensaio de marcação *in vivo*. Após uma hora da última dose administrada, foram injetados, através do plexo ocular, 0,3mL

de pertecnetato de sódio (3,7 MBq). Após 10 minutos, os animais foram sacrificados. De todos os animais, foram retirados os seguintes órgãos: tireóide, estômago, duodeno, rim, fígado, pâncreas, cérebro, osso (fêmur), pulmão, coração, baço, músculo e testículo, para a realização de contagem, bem como amostras de 1mL de sangue (sangue total). As percentagens de atividade de todos os órgãos (%ATI) foram calculadas dividindo-se a contagem em cada órgão pela contagem da amostra de pertecnetato de sódio. Em seguida, foram calculadas as percentagens de atividade por grama de cada órgão (%ATI/g). Para as amostras de sangue, considerou-se 1mL como o equivalente a 1 grama.

Para a determinação da influência do EHF na morfologia de hemácias, foram realizados estiraços em lâminas de microscopia de amostras de sangue *in vitro* e *in vivo*. As lâminas foram coradas através do método de May-Grünwald-Giemsa, e análise das lâminas e as fotomicrografias foram realizadas utilizando-se microscópio óptico.

Todos resultados foram comparados empregando-se a análise de variância (ANOVA), considerando-se $p < 0,05$.

3. Resultados

As tabelas 1 a 3 mostram as percentagens de radioatividade incorporadas aos elementos sangüíneos, das amostras de sangue incubadas *in vitro* com as diferentes concentrações utilizadas do EHF. Os resultados indicam que apenas a concentração de 100% foi capaz de reduzir a fixação de Tc-99m nas hemácias, onde a %ATI passou de $97,85 \pm 0,99$ para $88,86 \pm 5,94$, obtendo-se um valor de $p < 0,05$, considerando-se a redução significativa, e na fração insolúvel do plasma, a %ATI passou de $73,24 \pm 5,51$ para $20,72 \pm 6,95$, com um valor de $p < 0,0001$, considerando-se a redução extremamente significativa. Nenhuma das concentrações utilizadas promoveu alteração na fixação do Tc-99m às proteínas celulares.

INSERIR TABELAS 1 A 3

A tabela 4 mostra os resultados das percentagens de atividade (%ATI) nas amostras de linfócitos incubadas com as concentrações 100% do EHF. Os resultados indicam que não houve diferença significativa na fixação do Tc-99m sobre os linfócitos incubados *in vitro* com EHF quando comparados com o controle ($p < 0,05$).

INSERIR TABELA 4

As percentagens de radioatividade (%ATI) dos elementos sanguíneos tratados *in vivo* com o EHF estão indicadas na tabela 5. Os resultados demonstraram que a concentração 100% do EHF reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) apenas a %ATI ligada na fração insolúvel do plasma (FI-P), passando de $76,09 \pm 1,74$ para $57,54 \pm 6,09$.

INSERIR TABELA 5

A tabela 6 mostra os valores das percentagens de atividade por grama (%ATI/g) de cada órgão dos animais dos grupos controle e tratado. Os resultados indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na comparação dos valores de %ATI/g de cada órgão entre os grupos, concluindo assim que a concentração 100% do EHF não foi capaz de alterar a biodistribuição do Tc-99m na forma de pertecnetato de sódio, considerando um período total de administração da droga de 7 dias.

INSERIR TABELA 6

As figuras 1 e 2 mostram fotomicrografias a partir do ensaio *in vitro*, de amostras de sangue dos grupos controle e tratado com a concentração 100% do EHF, nas quais pode-se observar alterações na morfologia das células sanguíneas.

INSERIR FIGURAS 1 E 2

As figuras 3 e 4 mostram fotomicrografias , a partir do ensaio *in vivo*, de amostras de sangue dos grupos controle e tratado com a concentração 100% do EHF, onde semelhante ao ensaio *in vitro* com o próprio extrato, também ocorreram alterações morfológicas nas hemácias.

INSERIR FIGURAS 3 E 4

4. Discussão

Alguns trabalhos comprovam que a forma das células depende da organização das proteínas presentes na membrana, ou absorvidas na sua superfície. Então, quando um determinado extrato vegetal ou droga altera a morfologia de uma célula, conseqüentemente pode estar alterando as estruturas protéicas, dificultando assim os sistemas de transporte para o interior das células. Estudos realizados com extratos de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) e espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) relacionam a diminuição da marcação das células sanguíneas com as alterações morfológicas ocorridas nas mesmas (Vidal et al, 1998; Oliveira et al, 2000). Como as fotomicrografias das distensões sanguíneas obtidas de amostras de sangue de animais tratados *in vitro* e *in vivo* com a concentração 100% do EHF de *C. biflora* L. revelaram diferenças morfológicas entre as hemácias dos grupos controle e tratado,

podemos também relacionar as diferenças morfológicas entre as hemácias dos dois grupos distintos com a diminuição na marcação do tecnécio-99m, em ambos os ensaios.

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* com o EHF de também indicam que o mesmo possui a propriedade de diminuir a marcação do Tc-99m nas proteínas plasmáticas, o que poderia acarretar numa alteração do processo de biodistribuição do radiofármaco. Porém, a concentração da dose ou o período de administração do próprio extrato no ensaio de biodistribuição não foi capaz de demonstrar esta possível alteração.

Pode-se deduzir também que os resultados positivos com o EHF obtidos na marcação de hemácias com Tc-99m não são devido a alterações na osmometria das membranas celulares, pois o mesmo possui a propriedade de diminuir ou proteger a célula contra hemólise, por alterações na concentração do meio extracelular, impedindo assim alterações nesta marcação com radiofármacos.

Em geral, foi demonstrado que o EHF possui a propriedade de alterar o processo de marcação de elementos sanguíneos com o radiofármaco Tc-99m. Com isso, administrações conjuntas entre a droga analisada e o radioisótopo, podem acarretar em uma má interpretação de exames para fins diagnósticos, devido a um comportamento não esperado apresentado pelo radiofármaco (Carlsson, 1995).

5. Referências Bibliográficas

Alfaro, M.A.M., 1984. Medicinal Plants Used in a Totonac Community of the Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology* 11, 203-221.

- Bernardo-Filho, M. Parâmetros físicos, químicos e biológicos associados à marcação de radiotraçadores com Tecnécio-99m. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro-Brasil, 1999.
- Bernardo-Filho, M., Gutfilen, B., Maciel, O.S., 1994. Effect of different anticoagulants on the labeling of red blood cells and plasma proteins with Tc-99m. *Nuclear Medicine Comm.* 15, 730-734.
- Carlsson, S., 1995. A glance at history of nuclear medicine. *Acta Oncologica* 34, 1095-1102.
- Comerford, S.C., 1996. Medicinal Plants of Two Mayan Healers from San Andrés, Petén, Guatemala. *Economic Botany* 50, 327-336.
- Dewanjee, M.K., 1990. The chemistry of Tc-99m labeled radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine* 1, 5-27.
- Didelon, J., Mazon, P., Muller, S., Stoltz, J.F., 2000. Osmotic Fragility of the erythrocyte membrane: characterization by modeling of the transmittance curve as a function of the NaCl concentration. *Biorheology* 37, 409-416.
- Eising, E.G., Reiners, C., 1998. Influences on evaluability of radionuclide ventriculography in chemotherapy patients. *Nuclear Medicine Comm.* 19, 241-250.
- Eldridge, J., 1975. Bush Medicine in the Exumas and Long Island, Bahamas: A Field Study. *Economic Botany* 29, 307-332.
- Harbert, J.C., Eckelman, W.C., Neumann, R.D., 1996. *Nuclear Medicine Diagnosis and Therapy*. Thieme Medical Publishers, Inc., New York.
- Hicks, R.J., Arkles, L.B., 1992. Efficiency of labeling of red blood cells with technetium-99m after dipyridamole infusion for thallium-201 stress testing. *European Journal of Nuclear Medicine* 19, 1050-1053.
- Hladik III, W.B., Saha, G.B., Study, K.T., 1987. *Essentials of Nuclear Medicine Science*. Williams and Wilkins, London.

- Kelly, M.J., Cowie, A.R., Antonino, A., Barton, H., Kalff, V., 1992. An assessment of factors which influence the effectiveness of the modified in vivo technetium-99m erythrocyte labeling technique in clinical use. *Journal of Nuclear Medicine* 33, 2222-2225.
- Le Cointe, P., 1947. *Amazônia Brasileira: Árvores e Plantas Úteis*. Nacional, São Paulo, p. 140.
- Luu, C., 1975. Notes on the Traditional Pharmacopeia of French Guyana. *Plantes Médicinales Phytothérapie* 9, p. 125-135.
- Matos, F.J.A., 1988. *Plantas Mediciniais*. Univ. Aberta, Ceará, p. 2.
- Morton, J.F., 1968. A Survey of Medicinal Plants of Curaçao. *Economic Botany* 22, 87-102.
- Oliveira, J.F., Braga, A.C.S., Ávila, A.S.R., Araújo, A.C., Cardoso, V.N., Bezerra, R.J.A.C., Bernardo-Filho, M., 2000. Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 179-184.
- Oliveira, J.F., Braga, A.C.S., Ávila, A.S.R., Gutfilen, B., Bernardo-Filho, M., 1997. Effect of *Thuya occidentalis* on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. *Yale Journal of Biology and Medicine* 69, 489-494.
- Rao, S.A., Knobel, J., Collier, B.D., Isitman, A.T., 1986. Effect of Sn (II) ion concentration and heparin on Technetium-99m red blood cell labeling. *Journal of Nuclear Medicine* 27, 1202-1206.
- Saha, G.B., 1998. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. Springer-Verlag, New York.
- Sampson, C.B., 1996. Complications and difficulties in radiolabelling blood cells: a review. *Nuclear Medicine Comm.* 17, 648-658.
- Santos, J.S., Paula, E.F., Correa, T.G., Freitas, L.C., Fonseca, L.M., Gutfilen, B., Bernardo-Filho, M., 1995. Effect of cyclophosphamide on the binding of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ and $^{99m}\text{Tc-MDP}$

- to blood cells and plasma proteins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 28, 131-135.
- Srivastava, S.C., Straub, R.F., 1990. Blood cell labeling with tc-99m: progress and perspectives. *Seminars in Nuclear Medicine* 1, p. 41-51.
- Vidal, M.V., Gutfilen, B., Fonseca, L.M.B., Bernardo-Filho, M., 1998. Influence of tobacco on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 17, 1-6.
- Wong, W., 1976. Some Folk Medicinal Plants from Trinidad. *Economic Botany* 30, 103-142.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Influência do extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L. na marcação de células sanguíneas e plasma com Tc-99m.
- Tabela 2** Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L. na marcação de proteínas plasmáticas com Tc-99m.
- Tabela 3** Influência do extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L. na marcação de proteínas celulares com Tc-99m.
- Tabela 4** Percentagens de atividade de linfócitos incubados *in vitro* com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L.
- Tabela 5** Percentagem de atividade (%ATI) dos elementos sanguíneos após incubação de sangue *in vivo* com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L.
- Tabela 6** Percentagem de atividade por grama (%ATI/g) dos órgãos dos animais tratados com solução salina 0,9% (grupo controle) e com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L. (grupo tratado).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fotomicrografia obtida em microscópio óptico (x100) de distensão sanguínea do grupo controle incubado *in vitro* com solução salina 0,9% e submetido à marcação com Tc-99m.
- Figura 2** Fotomicrografia obtida em microscópio óptico (x100) de distensão sangüínea do grupo tratado incubado *in vitro* com EHF e submetido à marcação com Tc-99m.
- Figura 3** Fotomicrografia obtida em microscópio óptico (x100) de distensão sanguínea do grupo controle incubado *in vivo* com solução salina 0,9% e submetido à marcação com tc-99m.
- Figura 4** Fotomicrografia obtida em microscópio óptico (x100) de distensão sangüínea do grupo tratado incubado *in vivo* com EHF e submetido à marcação com tc-99m.

Tabela 1. Influência do extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L. na marcação de células sanguíneas e plasma com Tc-99m.

| Concentração de EHF (%) | %ATI | |
|----------------------------|--------------------------|------------|
| | C | P |
| 0,0 (control) | 97,85±0,99 | 2,80±0,67 |
| 6,25 | 97,40±1,14 ^{ns} | 2,59±1,14 |
| 12,5 | 97,11±1,23 ^{ns} | 2,87±1,23 |
| 25,0 | 96,03±1,42 ^{ns} | 3,96±1,42 |
| 50,0 | 98,47±1,30 ^{ns} | 1,52±1,31 |
| 100,0 | 88,86±5,94* | 11,14±5,94 |

* - valor de $p < 0,05$, considerado significativo; ns - não significativo; P – plasma; C – células; EHF - extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L.; %ATI – percentagem de atividade.

Tabela 2. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L. na marcação de proteínas plasmáticas com Tc-99m.

| Concentração de EHF (%) | %ATI | |
|----------------------------|---------------------------|------------|
| | FI-P | FS-P |
| 0,0 (control) | 73,24±5,51 | 26,61±5,69 |
| 6,25 | 66,50±4,94 ^{ns} | 33,48±4,94 |
| 12,5 | 65,07±5,39 ^{ns} | 34,92±5,39 |
| 25,0 | 66,63±6,44 ^{ns} | 33,36±6,44 |
| 50,0 | 64,57±0,42 ^{ns} | 36,41±2,00 |
| 100,0 | 20,72±6,95 ^{***} | 79,27±6,95 |

*** - valor de $P < 0,001$, considerado extremamente significativo; ns - não significativo; FS-P – fração solúvel do plasma; FI-P – fração insolúvel do plasma; EHF - extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L.; %ATI – percentagem de atividade.

Tabela 3. Influência do extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L. na marcação de proteínas celulares com Tc-99m.

| Concentração de EHF (%) | %ATI | |
|----------------------------|--------------------------|------------|
| | FI-C | FS-C |
| 0,0 (control) | 75,47±7,03 | 22,85±6,47 |
| 6,25 | 77,42±0,65 ^{ns} | 22,56±0,65 |
| 12,5 | 74,04±1,37 ^{ns} | 25,94±1,37 |
| 25,0 | 72,73±0,42 ^{ns} | 27,25±0,43 |
| 50,0 | 76,45±4,04 ^{ns} | 23,55±4,05 |
| 100,0 | 72,80±3,94 ^{ns} | 27,19±3,94 |

ns - não significativo; FS-C – fração solúvel da célula; FI-C – fração insolúvel da célula; EHF - extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L.; %ATI – percentagem de atividade.

Tabela 4. Percentagens de atividade de linfócitos incubados *in vitro* com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L.

| Amostras | %ATI | |
|----------|------------|--------------------------|
| | controle | EHF (100%) |
| S | 9,54±2,18 | 3,64±1,15 ^{ns} |
| L | 90,45±2,18 | 96,35±1,15 ^{ns} |

ns - valor não significativo; EHF - extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L.;

%ATI – percentagem de atividade.

Tabela 5. Percentagem de atividade (%ATI) dos elementos sanguíneos após incubação de sangue *in vivo* com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L.

| Concentração | | P | C | FS-P | FI-P | FS-C | FI-C |
|-----------------|--|-------------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
| do EHF (%) | | | | | | | |
| Zero (controle) | | 1,30±0,14 | 98,68±0,14 | 23,89±1,74 | 76,09±1,74 | 18,96±5,02 | 81,02±5,02 |
| 100 | | 2,88±0,47 ^{ns} | 97,11±0,47 ^{ns} | 42,44±6,09* | 57,54±6,09* | 13,4±1,36 ^{ns} | 86,59±1,36 ^{ns} |

* - valor de $P < 0,05$, considerado significativo; ns - não significativo; P – plasma; C – células; FS-P – fração solúvel do plasma; FI-P – fração insolúvel do plasma; FS-C – fração solúvel da célula; FI-C – fração insolúvel da célula; EHF - extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L.; %ATI – percentagem de atividade.

Tabela 6. Percentagem de atividade por grama (%ATI/g) dos órgãos dos animais tratados com solução salina 0,9% (grupo controle) e com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Capraria biflora* L. (grupo tratado).

| Órgãos | %ATI/g | |
|-----------------|------------------------|--------------------|
| | Controle (salina 0,9%) | Tratado (EHF 100%) |
| Tireóide | 3,70±0,96 | 2,29±0,97 |
| Estômago | 1,72±1,25 | 2,90±1,09 |
| Duodeno | 0,94±0,52 | 0,90±0,23 |
| Rim | 0,77±0,24 | 0,71±0,20 |
| Fígado | 0,62±0,36 | 0,62±0,17 |
| Pâncreas | 0,19±0,08 | 0,15±0,06 |
| Cérebro | 0,11±0,07 | 0,05±0,02 |
| Osso | 0,17±0,07 | 0,23±0,12 |
| Pulmão | 1,17±0,76 | 0,54±0,23 |
| Coração | 0,58±0,55 | 0,29±0,07 |
| Baço | 0,40±0,24 | 0,40±0,08 |
| Músculo | 0,12±0,02 | 0,10±0,02 |
| Testículo | 0,15±0,09 | 0,14±0,02 |
| Sangue | 1,41±1,02 | 0,96±0,35 |

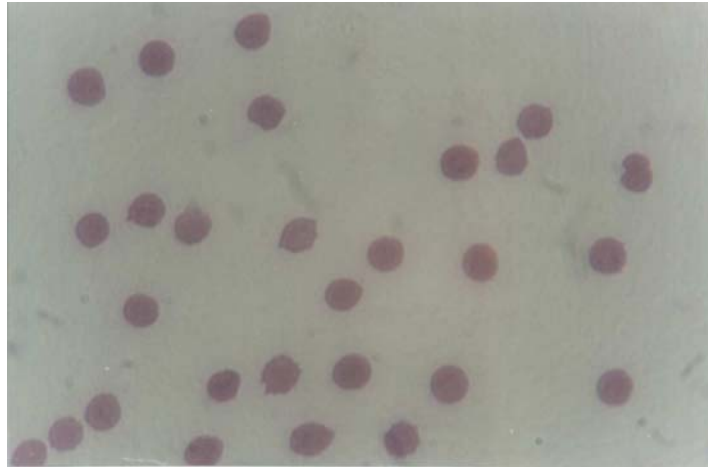


Figura 1. Fotomicrografia obtida em microscópio óptico (x100) de distensão sanguínea do grupo controle incubado *in vitro* com solução salina 0,9% e submetido à marcação com Tc-99m.

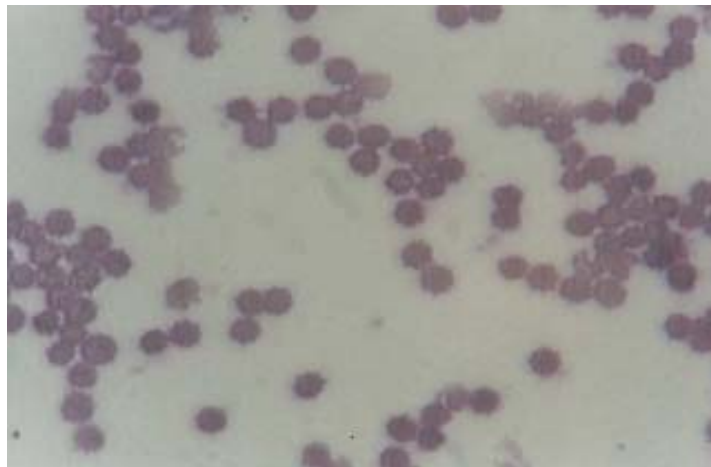


Figura 2. Fotomicrografia obtida em microscópio óptico (x100) de distensão sangüínea do grupo tratado incubado *in vitro* com EHF e submetido à marcação com Tc-99m.

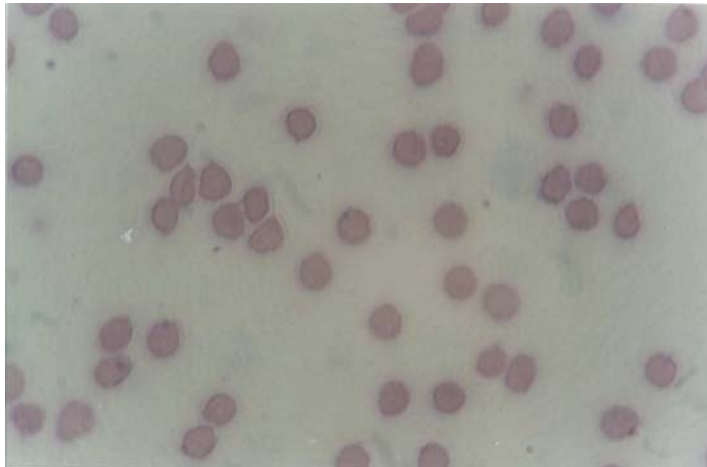


Figura 3. Fotomicrografia obtida em microscópio óptico (x100) de distensão sanguínea do grupo controle incubado *in vivo* com solução salina 0,9% e submetido à marcação com tc-99m.

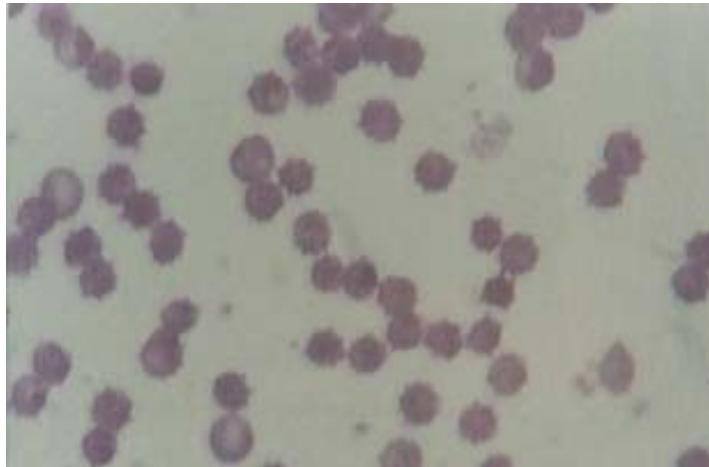


Figura 4. Fotomicrografia obtida em microscópio óptico (x100) de distensão sangüínea do grupo tratado incubado *in vivo* com EHF e submetido à marcação com tc-99m.

10. CONCLUSÕES

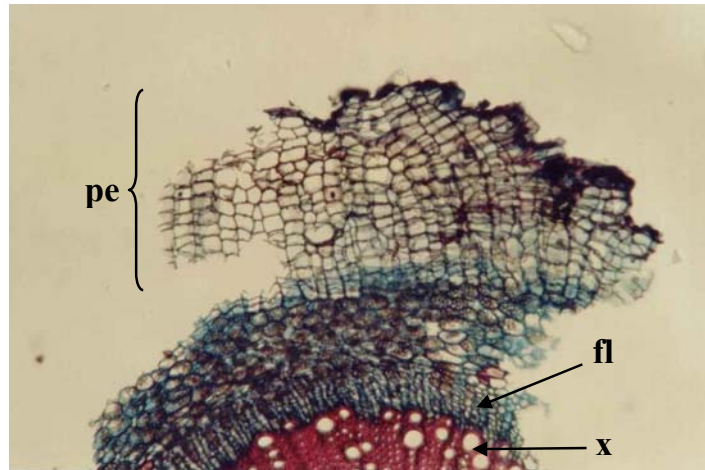
10. CONCLUSÕES

- A padronização botânica de *C. biflora* L., evidenciou a presença de caracteres importantes na espécie, os quais podem ser utilizados no diagnóstico e controle de qualidade da planta em futuras utilizações como fitoterápico.
- Os ensaios de caracterização térmica da biflorina forneceram dados úteis para o controle de qualidade da droga pura em futuros processos de semi-síntese ou novos ensaios de extração e purificação.
- Os estudos de cinética de degradação térmica da biflorina obtidos podem ser utilizados no controle de qualidade de futuras formas farmacêuticas contendo a biflorina, através da detecção de possíveis incompatibilidades entre o princípio ativo e excipientes utilizados.
- O método proposto para doseamento da biflorina em HPLC-UV, de acordo com as diretrizes da ICH, pode ser utilizado como base para o doseamento da biflorina em futuras formas farmacêuticas ou ensaios de fotodegradação.
- Considerando que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. biflora* L. e a biflorina demonstraram possuir a capacidade de alterar processos de radiomarcção, administrações conjuntas podem acarretar em uma má interpretação de exames para fins diagnósticos.

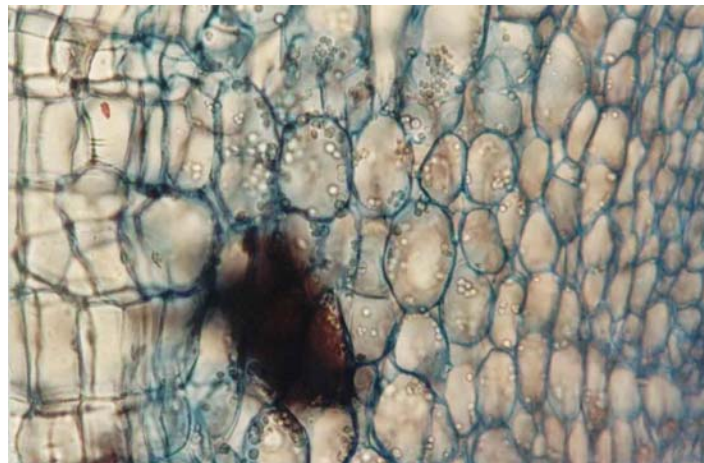
11. ANEXOS

12. ANEXOS

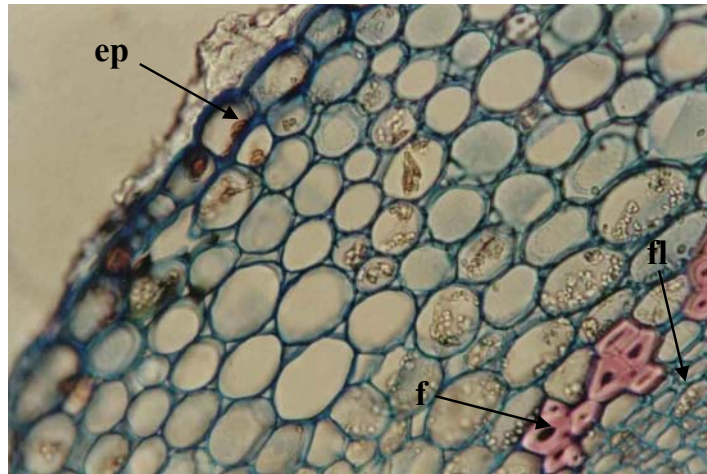
ANEXO I



Corte transversal da raiz de *Capraria biflora* L. em estrutura secundária (100×). **fl**: floema; **pe**: periderme; **x**: xilema.



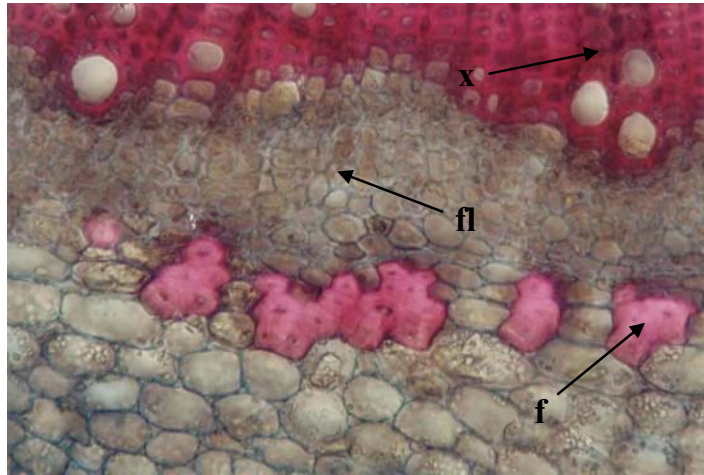
Corte transversal da raiz de *Capraria biflora* L. em estrutura secundária, evidenciando a periderme e o parênquima cortical com amiloplastos (400×).



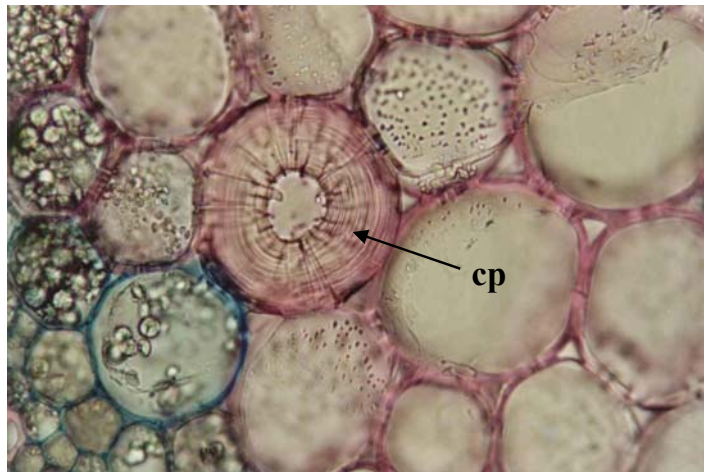
Corte transversal do caule em estrutura primária de *Capraria biflora* L., evidenciando a região cortical (400×). **ep**: epiderme; **f**: fibras; **fl**: floema.



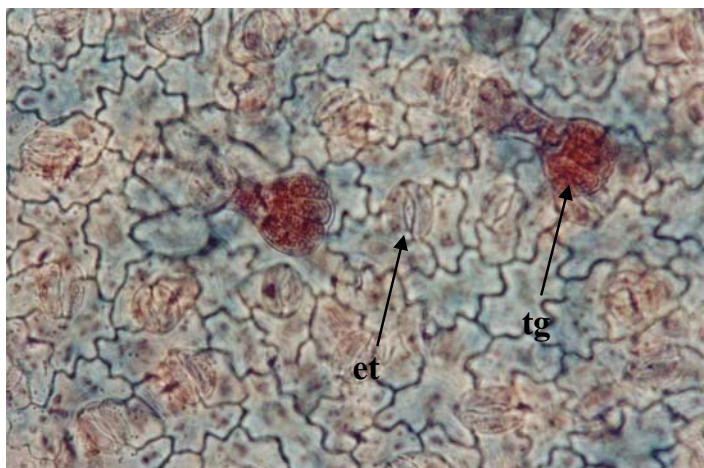
Corte transversal da casca do caule de *Capraria biflora* L. (100×). **fl**: floema; **pe**: periderme.



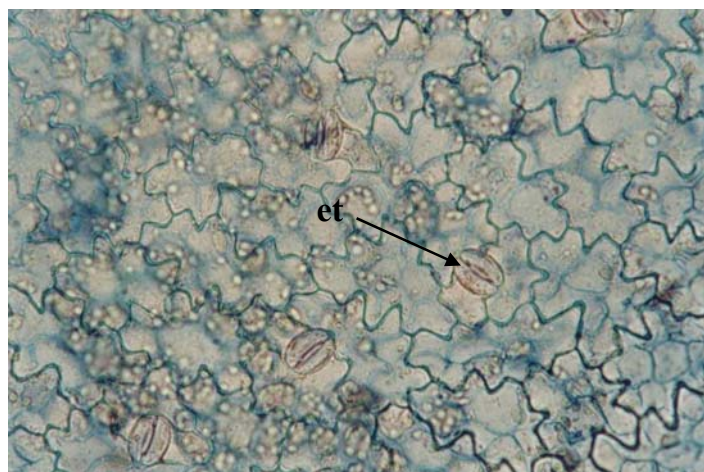
Corte transversal do caule em estrutura primária de *Capraria biflora* L., evidenciando a região do cilindro central (400×). **f**: fibras; **fl**: floema; **x**: xilema.



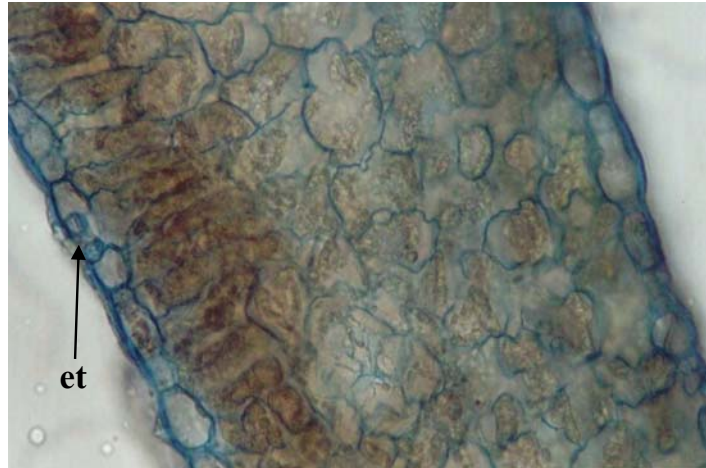
Detalhe da região medular do caule em estrutura primária de *Capraria biflora* L., evidenciando as células pétreas (400×). **cp**: célula pétreas.



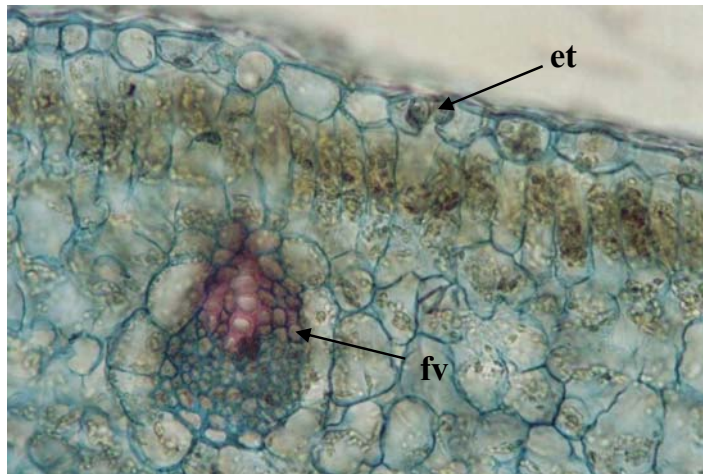
Face abaxial da lâmina foliar de *Capraria biflora* L., evidenciando a cutícula estriada, estômatos e tricomas glandulares (400×). **et**: estômato; **tg**: tricoma glandular.



Face adaxial da lâmina foliar de *Capraria biflora* L. (400×). **et**: estômato.

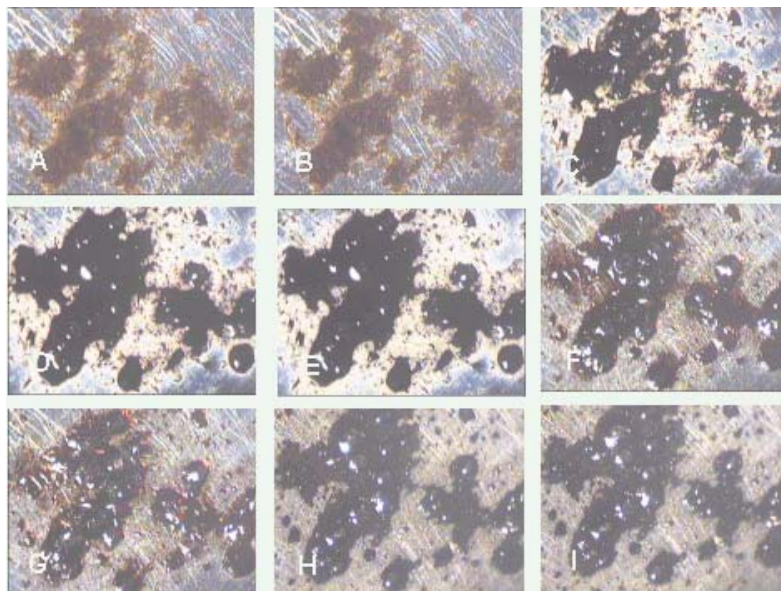


Corte transversal da lâmina foliar na região da nervura central de *Capraria biflora* L. (400×).
et: estômato.



Corte transversal da lâmina foliar no eixo do bordo de *Capraria biflora* L. (400×). **et:** estômato; **fv:** feixe vascular.

ANEXO II



Ampliação das imagens do DSC acoplado a sistema fotovisual para a biflorina. Imagens realizadas a **A** - 25 °C, **B** - 140 °C, **C** - 158 °C, **D** - 161 °C, **E** - 170 °C, **F** - 186 °C, **G** - 200 °C, **H** - 408 °C e **I** - 500 °C.