



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ISABELA INGRID RODRIGUES DE LEMOS

**DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANSIOLÍTICA DE
EXTRATOS DAS RAÍZES DE *Capraria biflora***

FORTALEZA

2023

ISABELA INGRID RODRIGUES DE LEMOS

DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANSIOLÍTICA DE
EXTRATOS DAS RAÍZES DE *Capraria biflora*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharela em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L577d Lemos, Isabela Ingrid Rodrigues de.
Determinação das atividades antioxidante e ansiolítica de extratos das raízes de *Capraria biflora* / Isabela Ingrid Rodrigues de Lemos. – 2023.
38 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.

1. *Capraria biflora*. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade ansiolítica. 4. Manitol. I. Título.
CDD 661

ISABELA INGRID RODRIGUES DE LEMOS

DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANSIOLÍTICA DE
EXTRATOS DAS RAÍZES DE *Capraria biflora*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Biotecnologia Bacharelado do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Francisco Erivaldo Freitas da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

À minha mãe, Eliza Lemos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades e por me manter firme quando desacreditava de mim mesma.

À minha mãe, Eliza, pelas batalhas que enfrentou por mim, pelo amor e dedicação.

Aos meus tios-avós, que foram tão presentes e essenciais ao longo da minha vida. Vocês são inspiração para mim.

Aos meus sobrinhos, Caio e Júlia, que coloriram meus dias desde o início dessa jornada acadêmica.

Às minhas amigas de infância, Máisa, Mariane e Adrícia, que de perto ou de longe continuam sendo como irmãs para mim.

Ao meu amigo João, que desde o colégio divide aprendizados, não solta minha mão e me incentiva em todos os planos da vida.

À minha orientadora Telma Leda, pela oportunidade de ser sua orientanda e pela sua dedicação profissional, a senhora é admirável.

À Maria Daiane, mestranda no Laboratório de Biotecnologia e Produtos Naturais (LBPN), que sempre esteve disposta a ajudar e pacientemente me esclareceu cada dúvida e me corrigiu. Você foi essencial.

Ao Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará por ceder o material vegetal para o estudo.

Ao Professor Edilberto, responsável pelo Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM), da Universidade Federal do Ceará, pelos espectros de RMN.

A todos os colaboradores do Grupo de Pesquisa Biotecnologia em Recursos Naturais (BIOREN), do Centro de Educação, Ciências e Tecnologia da Região dos Inhamuns (CECITEC), Tauá-CE, da Universidade Estadual do Ceará.

À Universidade Federal do Ceará e aos seus colaboradores por todo recurso e suporte disponibilizado durante todo o percurso.

A todos os professores do curso de Biotecnologia que fizeram parte dessa jornada, compartilharam seus conhecimentos e tempo. Admiro imensamente o papel de vocês.

Ao CNPq (PIBIC) pelo suporte financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Desde o princípio, o ser humano dependia da natureza para sua sobrevivência, confiando principalmente em plantas, que consideravam medicinais, para sua cura. Ao longo da evolução, foram descobertas novas formas de terapia e novas fontes de matéria orgânica além da matéria vegetal, mineral ou animal. Isso implica que a maior parte da história da cura na humanidade está ligada ao uso de plantas medicinais. A espécie *Capraria biflora*, vulgarmente conhecida com chá-do-rio e pertencente à família Scrophulariaceae, é uma erva bastante utilizada na medicina popular por seu potencial anti-inflamatório, diurético e analgésico, por exemplo. Ademais, na literatura há relatos da presença de uma quinona de nome biflorina, com várias atividades biológicas comprovadas como efeitos antitumoral, antimutagênico e antimicrobiano. Neste trabalho foi feito o estudo do potencial biotecnológico da espécie selecionada, a partir de extratos hexânico e etanólico obtidos das raízes da planta, realizando a determinação das atividades antioxidante, através do método de captura do radical livre DPPH^o, e ansiolítica utilizando peixes zebra como animais modelo. No extrato hexânico a atividade antioxidante resultou em um IC₅₀ de 0,1091 mg/mL, enquanto do extrato etanólico obteve-se IC₅₀ de 0,1965 mg/mL, sendo considerados resultados moderados. Do extrato hexânico ainda foram obtidas 3 frações (F1, F2 e F3), as quais foram testadas apenas a atividade antioxidante, onde F1 não apresentou resultado positivo. A atividade ansiolítica referente ao extrato hexânico, apresentou resultado promissor próximo ao efeito do Diazepam utilizado como controle, e a amostra foi considerada segura frente à peixes zebra. Um sólido isolado a partir do extrato etanólico foi caracterizado pelos métodos espectroscópicos de infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C, podendo ser identificado como Manitol, um carboidrato de cadeia simples e aberta.

Palavras-chave: *Capraria biflora*. Atividade antioxidante. Atividade ansiolítica. Manitol.

ABSTRACT

From the beginning, human beings depended on nature for their survival, relying mainly on plants, which they considered medicinal, for their healing. Over the course of evolution, new forms of therapy and new sources of organic matter were discovered in addition to plant, mineral or animal matter. This implies that most of the history of healing in humanity is linked to the use of medicinal plants. The species *Capraria biflora*, commonly known as river tea and belonging to the Scrophulariaceae family, is an herb widely used in folk medicine for its anti-inflammatory, diuretic and analgesic potential, for example. In addition, there are reports in the literature of the presence of a quinone called biflorin, with various proven biological activities such as antitumor, antimutagenic and antimicrobial effects. In this work, the biotechnological potential of the selected species was studied using hexanic and ethanolic extracts obtained from the roots of the plant, determining the antioxidant activity using the DPPH^o free radical scavenging method and the anxiolytic activity using zebra fish as model animals. The antioxidant activity of the hexanolic extract resulted in an IC₅₀ of 0.1091 mg/mL, while the IC₅₀ of the ethanolic extract was 0.1965 mg/mL, which are considered moderate results. Three fractions were obtained from the hexanic extract (F1, F2 and F3), which were only tested for antioxidant activity, where F1 did not show a positive result. The anxiolytic activity of the hexenic extract showed promising results, close to the effect of Diazepam used as a control, and the sample was considered safe against zebra fish. A solid isolated from the ethanolic extract was characterized by infrared (IR) and ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopic methods, and could be identified as Mannitol, a simple, open-chain carbohydrate.

Keywords: *Capraria biflora*. Antioxidant activity. Anxiolytic activity. Manitol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Chá-do-rio (<i>Capraria biflora</i>) do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará. A) Planta coleada; B) Raízes preparadas para o estudo.....	17
Figura 2 -	Estrutura da biflorina.....	18
Figura 3 -	Reação de captura do radical DPPH° frente a um agente antioxidante.....	24
Figura 4 -	Efeito ansiolítico-símile do EHRCb em ZFa no Teste do Claro & Escuro.....	32
Figura 5 -	Espectro na região de infravermelho do CBS-1.....	33
Figura 6 -	Espectro de RMN ¹ H (500, 05 MHz, D ₂ O) de CBS-1.....	34
Figura 7 -	Espectro de RMN ¹³ C (125,75 MHz, D ₂ O) de CBS-1.....	34
Figura 8-	Estrutura de CBS-1.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de calibração da atividade antioxidante do EHRC.....	28
Gráfico 2 - Curva de calibração da atividade antioxidante da fração F2.....	28
Gráfico 3 - Curva de calibração da atividade antioxidante da fração F3.....	29
Gráfico 4 - Curva de calibração da atividade antioxidante do EERCb.....	29
Gráfico 5 - Curva de calibração da atividade antioxidante do padrão Ácido ascórbico.....	30
Gráfico 6 - Curva de calibração da atividade antioxidante do padrão positivo Trolox.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de concentração inibitória das amostras de EHRCb, F1-3, EERCb e dos padrões positivos (trolox e ácido ascórbico) para determinação da capacidade antioxidante.....	30
Tabela 2 - Resultados dos testes de toxicidade aguda do EHRCb frente ao peixe zebra adulto	31
Tabela 3 - Análise comparativa de dados de RMN ¹³ C (125,75 MHz, D ₂ O) de CBS-1 com os dados reportados na literatura para o manitol.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
CBS-1	Sólido do Extrato Etanólico de <i>Capraria. biflora</i>
D ₂ O	Água deuterada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH°	2,2 difenil-1-picril-hidrazil
DZP	Diazepam
EERCb	Extrato Etanólico da Raíz de <i>C. biflora</i>
EHRCb	Extrato Hexânico da Raíz de <i>C. biflora</i>
F1	Fração 1 do EHRCb
F2	Fração 2 do EHRCb
F3	Fração 3 do EHRCb
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de Potássio
MHz	Mega hertz
p.f	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
ZFa	Zebrafish ou peixe zebra adulto

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
λ	Comprimento de onda
δ_C	Deslocamento químico de Carbono-13
δ_H	Deslocamento químico de Hidrogênio
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
®	Marca Registrada
μ	Micro (10^{-6})
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 <i>Capraria biflora</i>	17
2.2 Composição química da espécie <i>Capraria biflora</i>	17
2.3 Potencial biológico dos extratos de <i>Capraria biflora</i>	18
2.3.1 <i>Atividade antioxidante</i>	18
2.3.2 <i>Atividade ansiolítica-símile</i>	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Coleta das raízes	21
4.2 Obtenção dos extratos em hexano e em etanol	21
4.3 Fracionamento do extrato hexânico	21
4.4 Métodos Analíticos, físicos e espectroscópicos	22
4.4.1 <i>Cromatografia de Camada Delgada (CCD)</i>	22
4.4.2 <i>Ponto de Fusão</i>	22
4.4.3 <i>Espectroscopia de absorção na região infravermelho (IV)</i>	22
4.4.4 <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	23
4.5 Atividades Biológicas	23
4.5.1 <i>Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH°</i>	23
4.5.2 <i>Avaliação da segurança não clínica – toxicidade aguda 96h</i>	25
4.5.3 <i>Efeito ansiolítico-símile</i>	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Extração	27
5.2 Ensaio biológicos	27
5.2.1 <i>Análise da atividade antioxidante</i>	27
5.2.2 <i>Análise da toxicidade aguda 96h</i>	31
5.2.3 <i>Avaliação do efeito ansiolítico-símile</i>	31
5.3 Caracterização do constituinte CBS-1	32
6 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS	40

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, diversas plantas têm sido utilizadas para atender às necessidades humanas, desempenhando papéis que vão desde sua aplicação como substâncias tóxicas até sua utilização em práticas terapêuticas. No contexto terapêutico, essas plantas são comumente referidas como plantas medicinais (PATRÍCIO *et al.*, 2022).

Calcula-se que aproximadamente 80% da população global recorre a plantas medicinais e seus derivados para atender às suas demandas essenciais de cuidados de saúde. O território brasileiro se destaca por sua vasta diversidade biológica, e as abordagens integrativas e complementares na promoção da saúde, incluindo a aplicação de fitoterápicos e ervas medicinais, fazem uso desse aspecto distintivo. Além de representarem uma fonte natural, esses recursos são economicamente acessíveis e, em muitos casos, são cultivados pelos próprios usuários dos serviços de saúde pública. Tendo isto em vista, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem promovido ativamente o uso dessas plantas e produtos fitoterápicos na esfera da Atenção Primária à Saúde (APS) desde o ano de 1978 (GOÉS *et al.*, 2019; GONÇALVEZ *et al.*, 2022).

As plantas medicinais e os fitoterápicos podem ser usados, por exemplo, como recursos terapêuticos no tratamento da ansiedade e/ou depressão, sendo opções que podem apresentar menores índices de efeitos colaterais (DA SILVA *et al.*, 2020).

A espécie *Capraria biflora*, Scrophulariaceae, popularmente conhecida como “chá-de-pé-da-calçada, chá-do-rio, chá-de-goteira, chá-da-terra”, é uma erva bastante utilizada na medicina popular por suas propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, diurética e com diversos usos, como no tratamento de dor, febre, gripe, vômitos, hemorroidas, reumatismo e estimulante digestiva. Ela é encontrada em países de zonas tropicais e temperadas. No entanto trata-se uma planta invasora, a qual pode ser encontrada em terrenos baldios, preferencialmente em locais úmidos como riachos ou lagoas. No Brasil, é encontrada no estado de Ceará, mas principalmente nos estados de Goiás, Minas Gerais e na faixa litorânea estendida do Piauí até o Espírito Santo (SOUZA *et al.*, 2012).

Em estudos químicos e biológicos realizados anteriormente com a *Capraria biflora*, já foram determinadas atividades biológicas a partir de extrato aquoso de suas raízes, como a atividade antioxidante e anti-inflamatória. Ademais foram identificadas diversas substâncias na planta, como naftoquinonas, sesquiterpenos, iridoides, fenóis e flavonóides. Além destas, também há relatos de uma *orto*-naftoquinona identificado como biflorina, presente nas raízes de *Capraria biflora*. Esta quinona foi objeto de estudo científico o qual apresentou atividade

antimetastásica e citotóxica significativa contra vários tipos de células tumorais como CEM, HL-60, HCT-8, B-16, sarcoma 180 e outras linhagens de células tumorais (FONSECA, 2003; VACONCELLOS *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2016; RODRÍGUEZ-GARCÍA *et al.*, 2019).

Tendo em vista o amplo uso na medicina tradicional e as atividades já relatadas na literatura, o presente estudo teve como foco uma reinvestigação do potencial biotecnológico de extratos obtidos com os solventes orgânicos hexano e etanol a partir das raízes de *Capraria biflora*, determinando atividade antioxidante através do método da captura do radical livre DPPH^o (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). e buscando uma nova aplicação, como a determinação da atividade ansiolítica-símile, a qual foi explorada através do teste de Claro & Escuro. Além disso, foi realizada a análise de segurança não-clínica.

A partir do extrato etanólico foi isolado um precipitado sólido de coloração branca o qual foi caracterizado por métodos físicos e espectroscópicos (Ponto de Fusão, Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C) e identificado como Manitol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Capraria biflora*

A espécie *Capraria biflora* é pertencente à família Scrophulariaceae, que apresenta distribuição cosmopolita, e inclui cerca de 270 gêneros e aproximadamente 5100 espécies. Dentro do gênero *Capraria*, a espécie *C. biflora* é a única encontrada no Brasil (SOUZA et al., 2009). Esta planta pode atingir cerca de 150 cm de altura, possui caule ramoso, ereto, com ramos alternos, cilíndricos, pubescentes e pilosos. Suas folhas são alternas, com até 8cm de comprimento, oblongo-lanceoladas-agudas, serradas irregularmente, inteiras na base, ponteagudas e estreitando-se para o pecíolo. As folhas são peninervadas, com nervura média saliente na página inferior. Suas flores são pequenas, de coloração brancas, pediceladas, geminadas, axilares e campanuladas. Suas raízes são numerosas e longas, tortuosas, e de coloração parda escura (Figura 1) (MENDONÇA, 2003).

Figura 1- Chá-do-rio (*Capraria biflora*) do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará. A) Planta coleada; B) Raízes preparadas para o estudo.



Fonte: Autoria própria

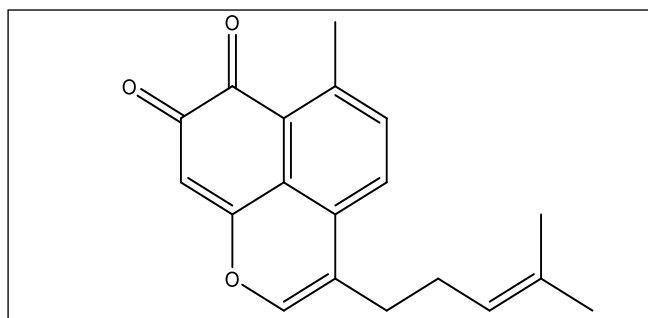
2.2 Composição química da espécie *Capraria biflora*

A literatura reporta que a investigação fitoquímica das raízes já levou à caracterização do β -sitosterol, de uma naftoquinona biflorina e seu dímero bis-biflorina

(FONSECA *et al.*, 2003) enquanto iridóides e sesquiterpenos foram isolados das partes aéreas (FONSECA, 2002). Flavonoides foram identificados tanto nas raízes como nas partes aéreas (MENDONÇA, 2003). E além destes, há relatos do isolamento de manitol a partir do extrato metanólico do caule da planta (SOUZA, 2011).

Dentre os compostos relatados, a biflorina (Figura 2) tem bastante notoriedade devido ao seu potencial antimicrobiano, antifúngico e antitumoral (MENDONÇA *et al.*, 2006).

Figura 2- Estrutura da biflorina



Fonte: Vasconcellos (2011).

2.3 Potencial biológico dos extratos de *Capraria biflora*

2.3.1 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são agentes sintéticos ou naturais, que podem ser substâncias orgânicas ou enzimas, os quais são responsáveis por bloquear ou diminuir os danos provocados pelos radicais livres nas células, substâncias que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, gerados durante processos oxidativos (HALLIWELL, 1994; ROCHA, SARTORI, NAVARRO, 2016). Esses, agem doando um átomo de hidrogênio a espécie reativa, tornando tais compostos estáveis e inibindo sua ação. O excesso de radicais livres, ou espécie reativa, apresenta efeitos tóxicos e deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, se encontram envolvidos em diversas doenças a exemplo de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas (ALVES *et al.*, 2010; ESPINOSA-DIEZ *et al.*, 2015). Entre os antioxidantes naturais pode-se citar a vitamina C, vitamina E, os flavonoides, betacaroteno, entre outros.

Diversas técnicas têm sido utilizadas na determinação da atividade antioxidante *in vitro*, possibilitando assim uma seleção rápida de substâncias ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre essas técnicas, destacam-se o método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o método de captura de radicais

livres, como o DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil) (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

2.3.2 Atividade ansiolítica-símile

A ansiedade trata-se de uma reação comum que pode provocar medo, apreensão, expectativas, podendo causar sintomas físicos como dores no peito, fadiga e palpitações. Os transtornos de ansiedade são comuns e prejudiciais, e são uma das principais causas na redução de anos de vida em todo o mundo. Em 2019, aproximadamente um bilhão de pessoas viviam com algum tipo de transtorno mental incluindo 14% dos adolescentes do mundo. Pessoas com condições graves de saúde mental morrem em média 10 a 20 anos mais cedo que a população em geral. Os transtornos de ansiedade comumente observados incluem transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de ansiedade social e transtorno de estresse pós-traumático (um transtorno relacionado a trauma e estressor) (CRASCKE *et al.*, 2017; OMS, 2022; RODRIGUES, 2022).

Devido tratar-se de uma doença complexa, o estudo sobre medicamentos voltados para o tratamento ou controle da ansiedade torna-se cada vez mais comum. Assim sendo, há uma vasta lista de fármacos utilizados no tratamento de ansiedade e depressão, onde muitos desses apresentam efeitos indesejados como dependência e síndrome de abstinência. Variados medicamentos fitoterápicos também já são utilizados para esta finalidade, com o intuito de se ter uma maior segurança e com maior adesão dos usuários (DA SILVA *et al.*, 2020; RODRIGUES, 2022).

Diante desse contexto, e com o objetivo de determinar atividades biológicas ainda não reportadas da espécie em estudo, foi avaliado o efeito ansiolítico-símile do extrato hexânico das raízes de *Capraria biflora*.

Dentre os diversos testes para se avaliar ansiedade o Teste do Claro & Escuro em peixe zebra adulto é um dos testes específicos mais empregados, pois se baseia no paradigma da aversão inata dos peixes zebra a áreas bem iluminadas, similar ao dos roedores. Em tal teste, os animais não tratados com drogas ansiolíticas apresentam o mesmo comportamento apresentado em camundongos, tendo aversão a zonas claras (MAXIMINO *et al.*, 2010 a-b; GEBAUER *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter extratos hexânico e etanólico a partir das raízes de *C. biflora* e investigar suas atividades biológicas: antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^o) e ansiolítica-símile com o uso de peixes conhecidos como peixe zebra.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter os extratos hexânico (EHRCb) e etanólico (EERCb) das raízes de *C. biflora*;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos e frações (F1, F2 e F3) pelo método DPPH^o;
- Investigar a atividade ansiolítica-símile do extrato hexânico pelo teste Claro & Escuro;
- Determinar a segurança não-clínica do EHRCb frente à peixes zebra adultos;
- Fracionar o extrato EHRCb utilizando a técnica de cromatografia em coluna (CC);
- Análise em cromatografia em camada delgada (CCD) das frações do EHRCb;
- Caracterizar os constituintes dos extratos através dos métodos de p.f, IV, RMN ¹H e ¹³C.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta das raízes

As raízes de *C. biflora* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos, da Universidade Federal do Ceará, às 14:50 horas do dia 23 de março de 2023. O material botânico teve as partes aéreas e as raízes separadas. As raízes foram higienizadas com água destilada para a retirada de incrustantes, cortadas com o auxílio de uma faca de mesa e em seguida foram secas ao ar livre. Após secagem, foram trituradas, pesadas, totalizando 114 gramas, e submetidas ao processo de extração com solventes, respectivamente hexano e etanol.

4.2 Obtenção dos extratos em hexano e em etanol

Todo o material das raízes (114g) foi alocado em um Erlenmeyer com capacidade de 3 litros, onde foi adicionado em torno de 1,8 a 2 litros de hexano P.A. da marca Synth[®], onde o material ficou totalmente submerso. Em seguida o frasco foi vedado e mantido em repouso por dois dias. Na sequência, o solvente foi filtrado em funil simples com auxílio papel de filtro e, em seguida, foi concentrado sob pressão reduzida em um rotaevaporador da marca Heidolph, modelo Laborota 4000, à temperatura ambiente fornecendo assim o extrato hexânico, codificado como EHRCb. Posteriormente, estas mesmas raízes foram submersas em álcool etílico absoluto P.A. da marca Synth[®] (etanol), repetindo-se o mesmo processo para obtenção do extrato etanólico, codificado como EERCb. A escolha dos solventes baseia-se no fato de extrair primeiramente com um solvente de menor polaridade (hexano), seguido de outro com maior polaridade (etanol).

4.3 Fracionamento do extrato hexânico

O extrato hexânico (EHRCb) foi submetido ao processo de cromatografia de coluna (CC), usando sílica gel 60-230 mesh como fase estacionária. Inicialmente foi homogeneizado 200 mg do extrato junto com a sílica para a obtenção de uma farofa. Em seguida, a coluna de sílica foi empacotada com hexano. Adicionou-se a farofa de EHRCb à coluna, que foi eluída com os seguintes solventes: hexano/acetato de etila (80:20), acetato de etila (100:0) e metanol (100:0), todos da marca Synth[®], fornecendo as frações F1, F2 e F3, respectivamente. Foi

utilizado aproximadamente 150 mL de cada solvente. Posteriormente essas frações foram concentradas sob pressão reduzida no rotaevaporador e submetidas a Cromatografia em Camada Delgada para a observação dos perfis das frações.

4.4 Métodos Analíticos, físicos e espectroscópicos

4.4.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

O extrato hexânico e as frações obtidas anteriormente por cromatografia de coluna de sílica, descritas no tópico 4.3, foram submetidos a análise de cromatografia em camada delgada (CCD). realizada com cromatoplaça (DC-Alufolien, Sílica gel 60 F254, 0,2 mm Merck) com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm e 365 nm. Utilizou-se como eluentes hexano/acetato de etila 1:1 e acetato de etila 100%. A revelação das substâncias nas cromatoplaças foi realizada pela pulverização com solução (1:1) de vanilina a 1% em etanol com solução de ácido perclórico a 4,5% seguido de aquecimento, sendo possível observar a presença de vários constituintes.

4.4.2 Ponto de Fusão

O sólido branco purificado a partir do extrato etanólico, codificado como CBS-1, foi submetido à caracterização, um dos métodos utilizados foi a determinação do ponto de fusão.

O ponto de fusão foi estabelecido no equipamento de microdeterminação digital da marca Mettler Toledo equipado com uma estação de aquecimento FP82HT e microscópio ótico monocular acoplado. A taxa de aumento de temperatura foi ajustada para 1,5 °C/min e mantida, de acordo com o manual do equipamento, que sugere realizar as análises com a taxa em uma variação de 1 a 2 °C/min.

4.4.3 Espectroscopia de absorção na região infravermelho (IV)

A análise espectroscópica na região do infravermelho de CBS-1 foi realizada pelo Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, usando um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF), marca Perkin Elmer[®], modelo FT-IR SPECTRUM 100. Foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio

(KBr) na proporção de 1% de amostra. A análise foi adquirida na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

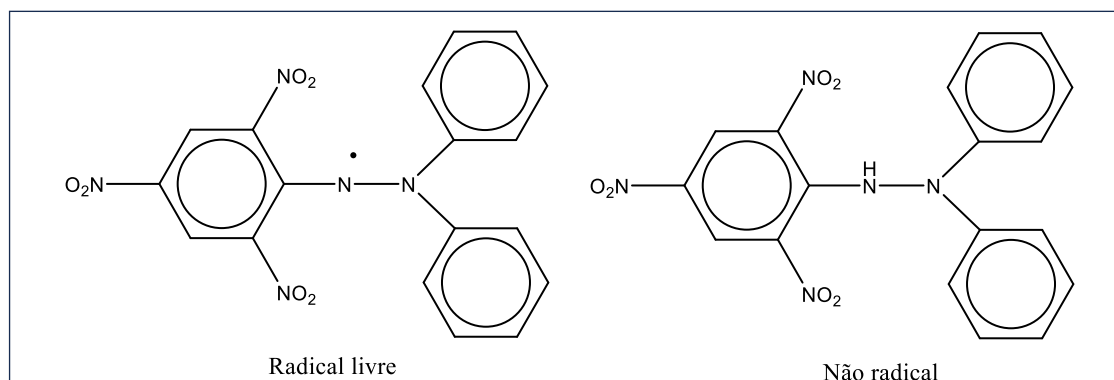
Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C de CBS-1, foram realizados em um espectrômetro da marca Bruker® modelo Avance DRX-500, no Centro Nordestino de Aplicação e uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará. As análises foram adquiridas na frequência de 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono-13.

Para obtenção dos espectros de RMN, foi utilizado água deuterada (D_2O). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais do solvente deuterado utilizado: água (δ_{H} 4,80) ppm.

4.5 Atividades Biológicas

4.5.1 Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH°

O ensaio da atividade antioxidante foi realizado através da captura do radical livre DPPH°, que se trata de uma das técnicas utilizadas para detectar a capacidade antioxidante de compostos. Ele é caracterizado como um radical livre estável em razão da deslocalização do elétron extra sobre a molécula como um todo. Na reação ocorre a captura do hidrogênio presente na substância antioxidante pela molécula de DPPH°, formando um composto estável e reduzido (Figura 3, pág 24) (KEDARE *et al.*, 2011).

Figura 3 - Reação de captura do radical DPPH^o frente a um agente antioxidante

Fonte: Adaptação de KEDARE *et al.*, 2011.

Para a avaliação da atividade antioxidante, foi realizado o método Hegazi e El Hady (2002), o qual foi utilizado uma solução metanólica de DPPH^o 60 µM, tendo como padrões positivos um antioxidante natural, o ácido ascórbico (vitamina C) nas concentrações de 0,00951; 0,000975; 0,00048; 0,00024; 0,00012 mg/ml e um antioxidante sintético, o ácido 6-hidroxi 2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) nas concentrações de 0,01563; 0,00781; 0,0039; 0,00195; 0,000975 mg/mL. Das amostras de EHRCb, das frações F1, F2 e F3 resultantes do tópico 4.3, e do EERCb, foram analisadas as seguintes concentrações em metanol: 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,01563 mg/mL. Os padrões foram analisados em concentrações menores que 0,25mg/mL pois possuem alta eficácia de inibição do radical livre em solução e ficariam muito concentrados. Já as amostras não inibiam o radical tanto quanto os padrões, desta forma foram analisadas em concentrações maiores.

Após a adição da solução de DPPH^o nas soluções contendo amostra, armazenou-se as mesmas na ausência de luz por 30 minutos. Após esse período cada solução foi transferida individualmente para uma cubeta de quartzo e as leituras foram analisadas em um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV mini-1240. O equipamento foi previamente calibrado com metanol PA da marca Synth® e o comprimento de onda (λ) foi ajustado em 520 nm. A medida do branco foi realizada com 2 mL de metanol e 2 mL da solução de DPPH^o, e o procedimento foi realizado em triplicata.

Os dados das leituras de absorbância das amostras foram analisados utilizando a Equação 1 descrita a seguir, onde AA% corresponde a porcentagem da atividade antioxidante.

$$AA\% = \left[1 - \left(\frac{Abs \text{ amostra}}{Abs \text{ Branco}} \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

A partir dos resultados analisados na equação, foi construída uma curva de porcentagem da capacidade inibitória da amostra em relação ao radical livre em solução (eixo y) vs concentração em mg/mL (eixo x), apresentado como gráficos (gráfico 1 – 6, pág. 28 - 30)

permitindo assim o cálculo da concentração capaz de reduzir o radical em solução em 50% ou 30% (Concentração inibitória de 50% -CI₅₀; Concentração inibitória de 30% - CI₃₀).

4.5.2 Avaliação da segurança não clínica – toxicidade aguda 96h

Uma amostra de 10,3 mg do extrato hexânico foi analisada quanto seus efeitos ansiolítico-símile e segurança não clínica - toxicidade aguda frente a peixe zebra (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, de ambos os sexos com idade de 60-90 dias, tamanhos de 3.5 ± 0.5 cm e peso 0.4 ± 0.1 g obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Grupos de 40–50 peixes foram aclimatados em aquário de vidro de 9 L a temperatura ambiente (26 ± 2 °C) por 24 horas, contendo água desclorada (*ProtecPlus*[®]) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo diário de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração à vontade 24 horas antes dos experimentos. Após os experimentos, os peixes foram sacrificados com água gelada (2-4°C) por até 2 minutos até que ocorresse a perda dos movimentos operculares. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 05299177/2021 (Anexo 1).

O estudo da toxicidade aguda foi realizado de acordo com a Organização de Cooperação Econômica e Método Padrão de Desenvolvimento (OECD, 1992) para determinar a CL₅₀-96h. Os animais (n=6/grupo) foram tratados, via intraperitoneal (*i.p.*), com 20 µL de EHRCb (0,05 ou 0,5 ou 5,0 mg/mL) ou veículo (DMSO 3% - dimetilsulfóxido; controle). Após os tratamentos avaliou-se a mortalidade dos ZFa a cada 24 horas. Após 96 h, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL₅₀) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUIAR *et al.*, 2015).

4.5.3 Efeito ansiolítico-símile

O efeito ansiolítico-símile foi explorado no Teste Claro & Escuro, realizado em um aquário de vidro (30 x 15 x 20 cm) com uma zona clara e outra escura. O aquário foi cheio com 3 cm de água da torneira, pré-tratada com anticloro e livre de drogas, pois sendo raso restringe do aquário habitacional, provocando um comportamento de ansiedade bem estabelecida num novo ambiente (GEBAUER *et al.*, 2011).

Os animais utilizados foram peixe zebra adultos em grupos de 6, os quais foram tratados com 20 μ L de EHRCb (0,05 ou 0,5 ou 5,0 mg/mL; *i.p.*) ou Diazepam (DZP; Controle ansiolítico; 5,0 mg/mL; *i.p.*) ou veículo (DMSO 3%; *i.p.*). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive). Após 30 minutos dos tratamentos via intraperitoneal, os animais foram individualmente adicionados na zona clara do aquário e o efeito ansiolítico-símile foi quantificado como o tempo (s) de permanência na zona clara durante 5 minutos de análise. Os dados foram expressos como valores da média \pm erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey. A análise foi realizada com o software GraphPad Prism v. 5.01. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração

Do processo de extração a partir das 114 gramas de raízes de *Capraria biflora* obteve-se o total de 547,7 mg para o extrato hexânico (EHRCb), que apresentou-se com coloração roxo-escuro e textura pastosa. Em contrapartida do extrato etanólico (EERCb) obteve-se um total de 1,84 g e uma coloração ainda mais escura. Além disso, durante a obtenção do EERCb houve a precipitação de um sólido de coloração branca codificado como CBS-1, o qual obteve-se uma massa de 515 mg.

5.2 Ensaio biológicos

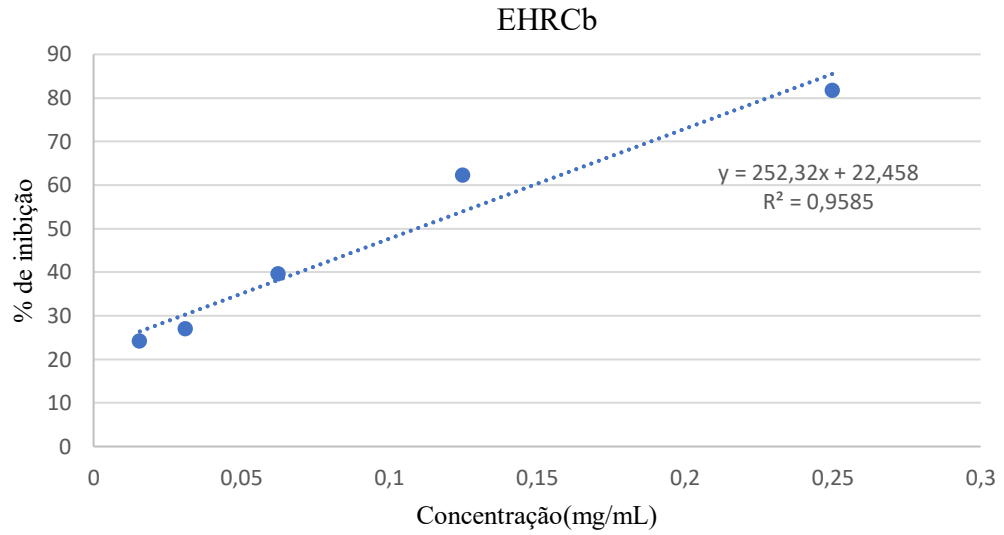
5.2.1 Análise da atividade antioxidante

A concentração inibitória é calculada a partir da quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH°, correspondente ao CI_{50} . Desta forma, um menor valor de CI_{50} em uma amostra, corresponde a um consumo maior de DPPH° (SOUSA *et al.*, 2007; VERRUCK *et al.* 2018).

A partir dos resultados das análises de atividades biológicas, citadas no item 4.5.1 foi construída uma curva de porcentagem da capacidade inibitória (eixo y) vs concentração em mg/mL (eixo x), permitindo assim o cálculo da concentração inibitória de 50% (CI_{50}).

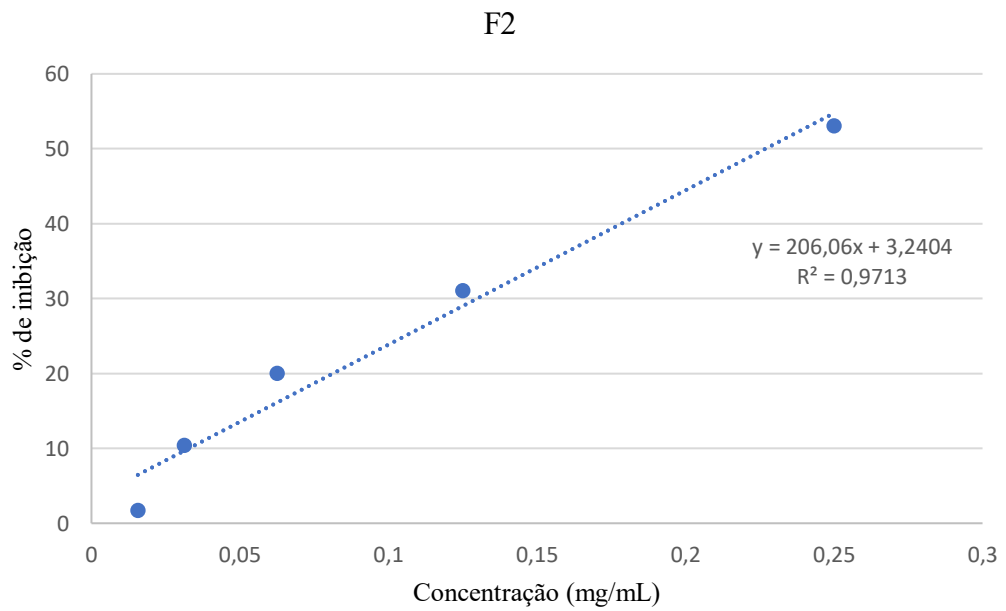
Na análise realizada com EHRCb o CI_{50} foi de 0,1091 mg/mL, enquanto sua fração F2 apresentou CI_{50} de 0,2269 mg/mL (Gráfico 1-2, pág. 28). Da fração F1 não foi observado atividade antioxidante, e da fração F3 foi calculado a concentração inibitória de 30% (CI_{30}) de 0,3337 mg/mL (Gráfico 3, pág. 29). No caso da análise com EERCb o CI_{50} foi igual a 0,1965 mg/mL (gráfico 4, pág. 29). Em relação aos padrões positivos a vitamina C apresentou CI_{50} de 0,001985 mg/mL, enquanto o trolox obteve um CI_{50} de 0,00704 mg/mL (gráfico 5-6, pág. 30). A atividade antioxidante se dá por meio de comparação, sendo assim, os dados de IC_{50} , IC_{30} e Desvio padrão obtidos foram reunidos na Tabela 1 (pág. 30).

Gráfico 1: Curva de calibração da atividade antioxidante do EHRCb



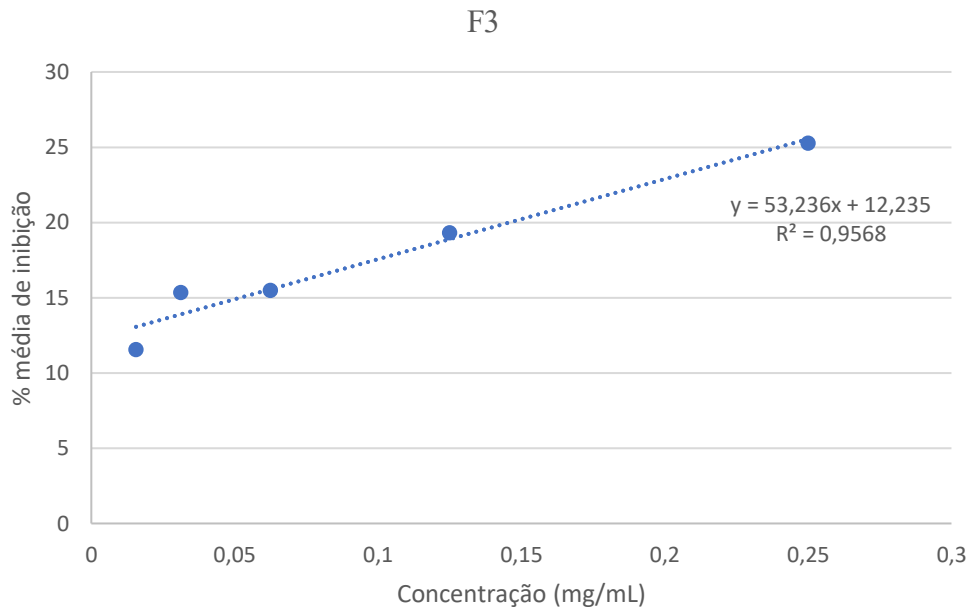
Fonte: Autoria própria

Gráfico 2: Curva de calibração da atividade antioxidante da fração F2



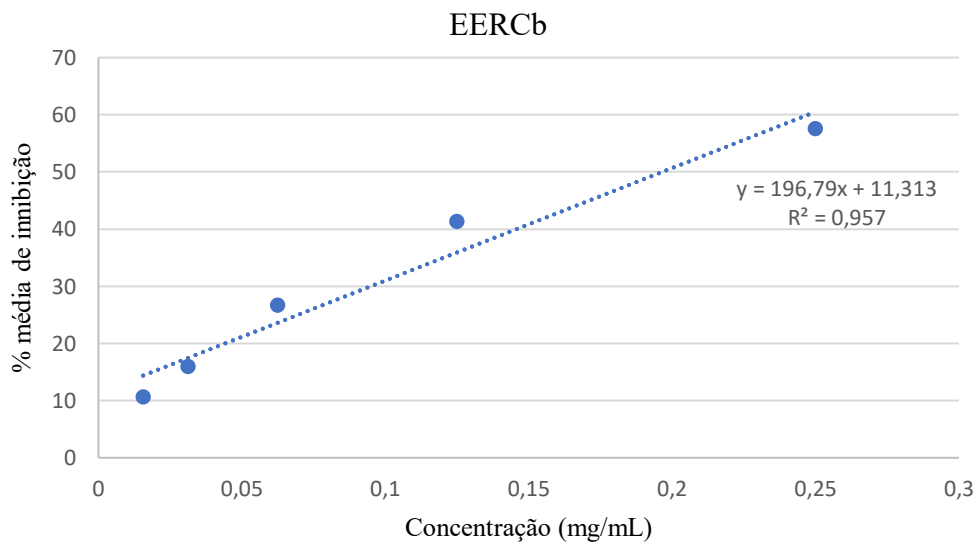
Fonte: Autoria própria

Gráfico 3: Curva de calibração da atividade antioxidante da fração F3



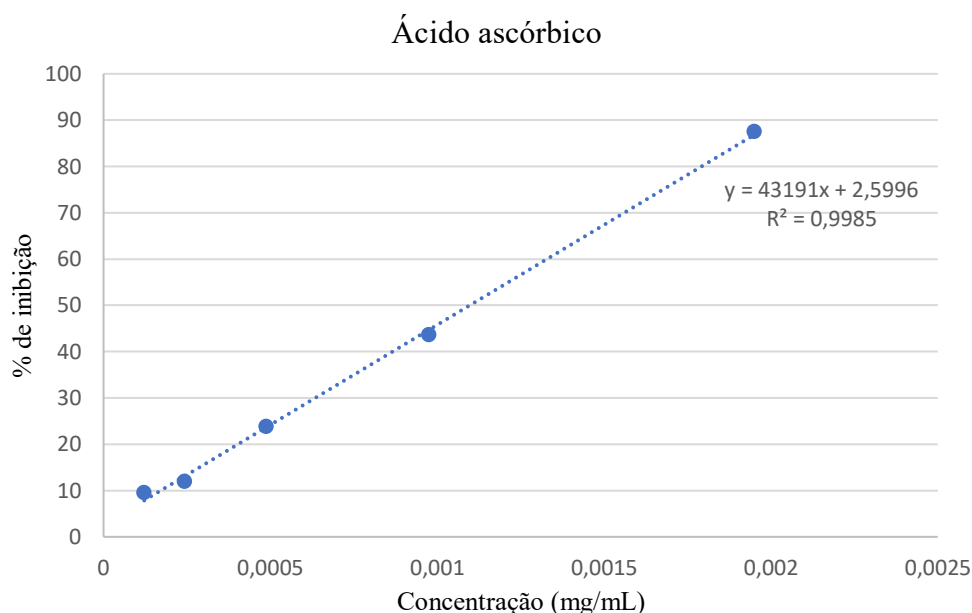
Fonte: Autoria própria

Gráfico 4: Curva de calibração da atividade antioxidante do EERCb



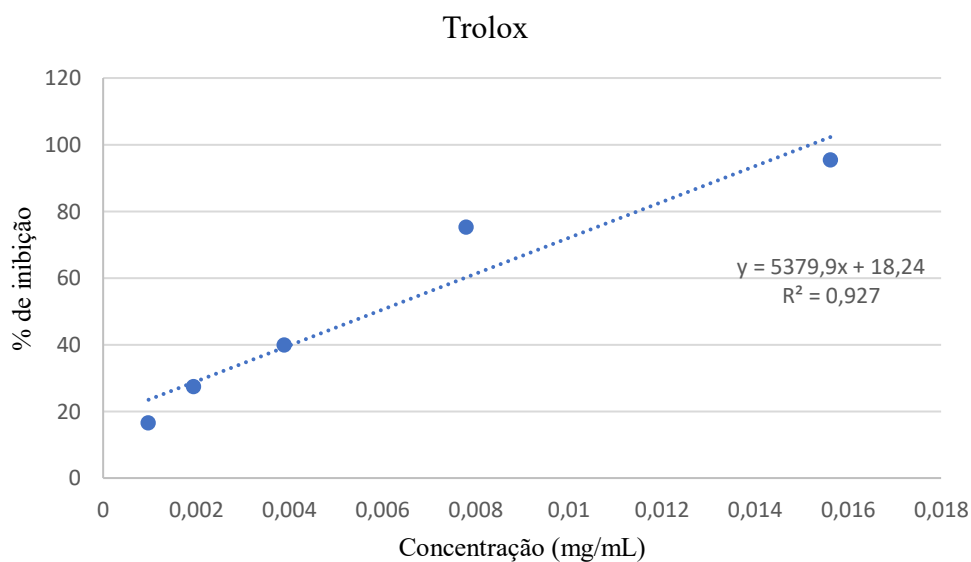
Fonte: Autoria própria

Gráfico 5: Curva de calibração da atividade antioxidante do padrão positivo ácido ascórbico



Fonte: Autoria própria

Gráfico 6: Curva de calibração da atividade antioxidante do padrão positivo trolox



Fonte: Autoria própria

Tabela 1 – Dados de concentração inibitória das amostras de EHRCb, F1-3, EERCb e dos padrões positivos (trolox e ácido ascórbico) para determinação da capacidade antioxidante.

Amostra	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₃₀ (µg/mL)	Desvio Padrão CI ₅₀	Desvio Padrão CI ₃₀
Extrato hexânico	0,1091	-	0,057136532	-
F1	-	-	-	-
F2	0,2269	-	0,059844047	-
F3	-	0,3337	-	0,108956
Extrato etanólico	0,1965	-	0,014414	-
Padrão trolox	0,00704	-	0,000865012	-
Padrão ácido ascórbico	0,0019854	-	$5,001 \times 10^{-5}$	-

Fonte: Autoria própria.

Tendo em vista a Tabela 1 (pág. 30), é possível observar que os padrões, trolox e ácido ascórbico, apresentaram um valor de CI_{50} menor que o extrato hexânico das raízes *Capraria biflora* e suas frações, bem como o do extrato etanólico. Todavia, considerando-se que a matriz que compõe um extrato é uma mistura de constituintes é possível que outros ensaios e estudos possam levar à compostos com maior potencial antioxidante, ou até mesmo a observação de uma interação entre os constituintes, onde os mesmos possuam melhor atividade quando estão em conjunto.

5.2.2 Análise da toxicidade aguda 96h

Para a avaliação da toxicidade, os animais foram tratados com o extrato hexânico (EHRCb) utilizando como veículo o DMSO 3% (dimetilsulfóxido), e monitorados avaliando-se quantitativamente a taxa de mortalidade a cada 24 horas. Como resultado, constatou-se que a amostra se mostrou segura, pois não foi tóxica frente a peixe zebra (ZFa) até 96 h de análise ($CL_{50} > 5,0$ mg/mL), como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados dos testes de toxicidade aguda do EHRCb frente ao peixe zebra adulto. CN - Grupo controle negativo: DMSO 3%. C1 - concentração 1 (0,005 mg/mL). C2 - concentração 2 (0,5 mg/mL). C3 - concentração 3 (5,0 mg/mL). CL_{50} -concentração letal para matar 50% dos ZFa; IV – intervalo de confiança;

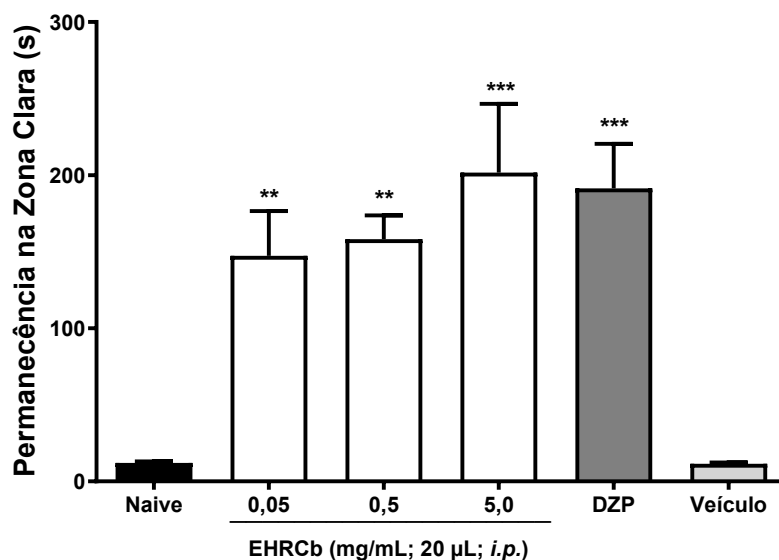
Amostra	Mortalidade				96h
	CN	C1	C2	C3	CL_{50} (mg/mL)/ IV
EHRCb	0	0	0	0	>5,0

Fonte: Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB) - UECE

5.2.3 Avaliação do efeito ansiolítico-símile

O efeito ansiolítico-símile analisado pelo teste do claro & escuro apresentou resultado positivo, não apresentando variação em relação ao efeito do Diazepam, administrado como controle (Figura 4, pág 32).

Figura 4: Efeito ansiolítico-símile do EHRCb em ZFa no Teste do Claro & Escuro (0-5min). Naive - animais não tratados; Veículo – DMSO 3% (20 μ L; *i.p.*). DZP – Diazepam (5,0 mg/mL; 20 μ L *i.p.*). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (** p <0,01 ou *** p <0,001 vs. Naive ou Veículo).



Fonte: Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB) - UECE

Sendo assim, o EHRCb pode ser considerado uma boa opção de fitoterápico com aplicação no tratamento da ansiedade, tendo em vista que o uso de medicamentos ansiolíticos, com destaque para os benzodiazepínicos (como o Diazepam, utilizado como controle), é crescente e que o uso prolongado dessa classe de medicamentos pode gerar dependência, além de apresentar inúmeros efeitos colaterais como disautonomias, redução da atenção, agitação (ALVES, DE FREITAS, MACHADO, 2022).

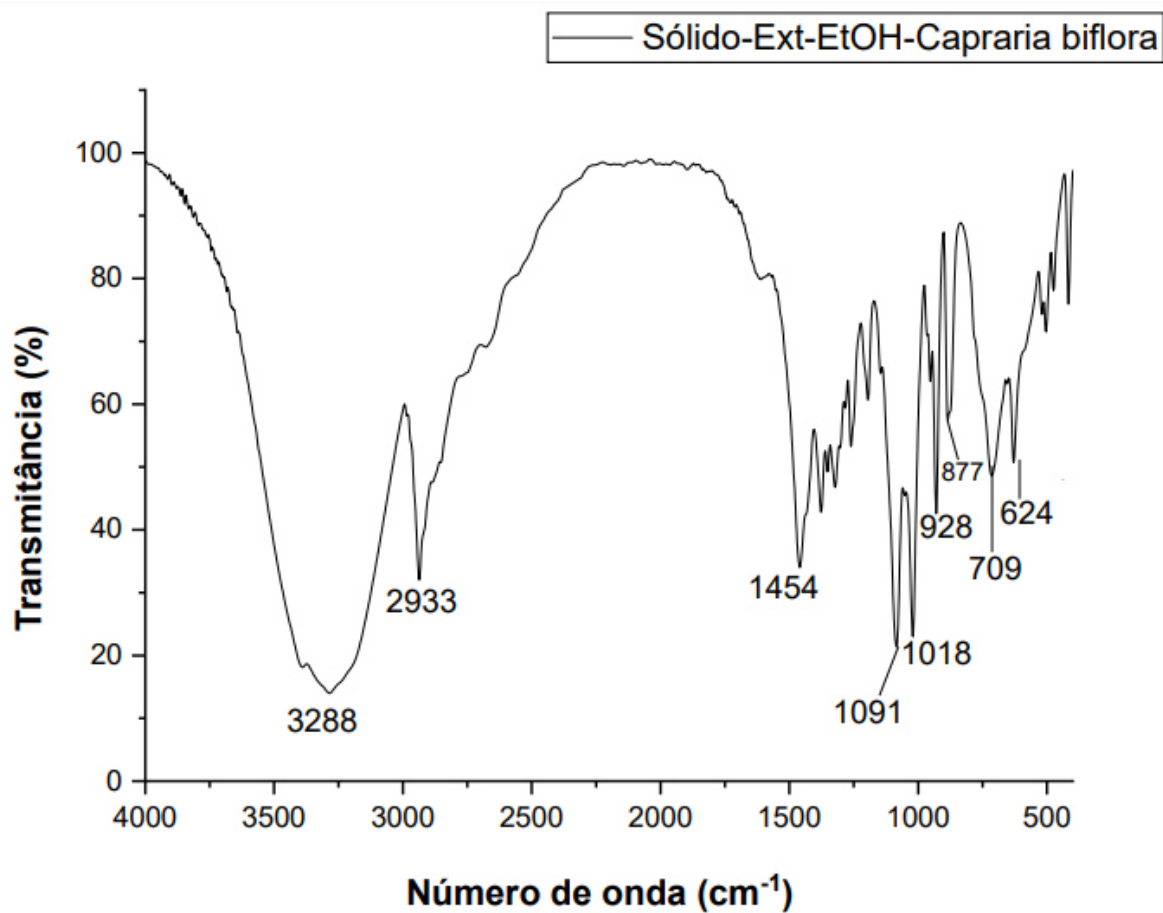
5.3 Caracterização do constituinte CBS-1

O CBS-1, obtido a partir do extrato etanólico (EERCb) foi submetido à sucessivas lavagens com acetona para sua purificação, e apresentou-se como um pó de coloração branca e ponto de fusão 160,2 – 162,2°C.

No espectro de IV, a banda correspondente ao número de onda 3288 cm^{-1} apresentou-se alargada e intensa, característico do estiramento O-H, indicando que o sólido apresenta grupos hidroxila. A banda em 2933 cm^{-1} de ligações C-H é correspondente ao Carbono sp^3 e as absorções em 1091 e 1018 cm^{-1} são correspondentes à ligações C-O álcoois primários e secundários) (Figura 5, pág 33). Essas características sugerem que o sólido se trata de um açúcar.

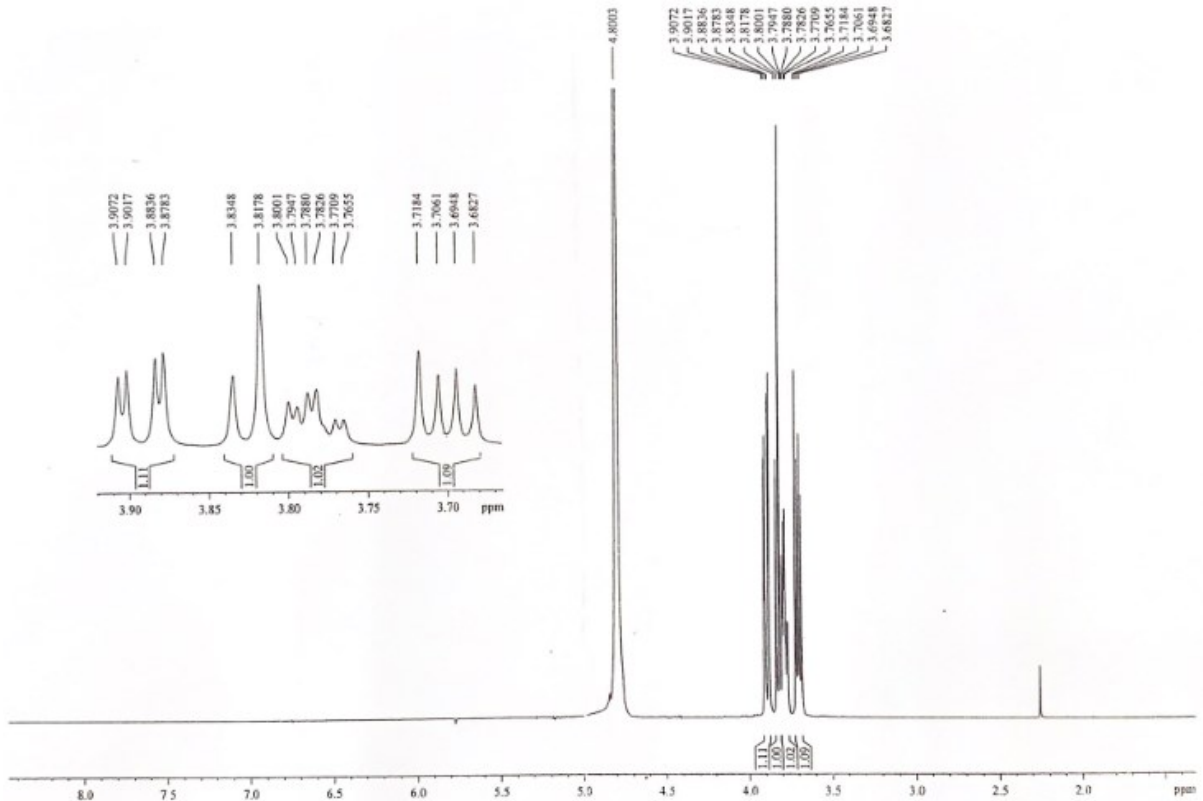
O espectro de RMN de ^1H (500, 05 MHz, D_2O), apresentou sinais de deslocamento δ_{H} 3,71; 3,83 e 3,90, todos em região de hidrogênios alifáticos (Figura 6, pág.34). Já o espectro de RMN de ^{13}C (125,75 MHz, D_2O) (Figura 7, pág. 34), apresentou os seguintes sinais: δ_{C} 63,33; 69,40; 70,96.

Figura 5 – Espectro na região de infravermelho do CBS-1



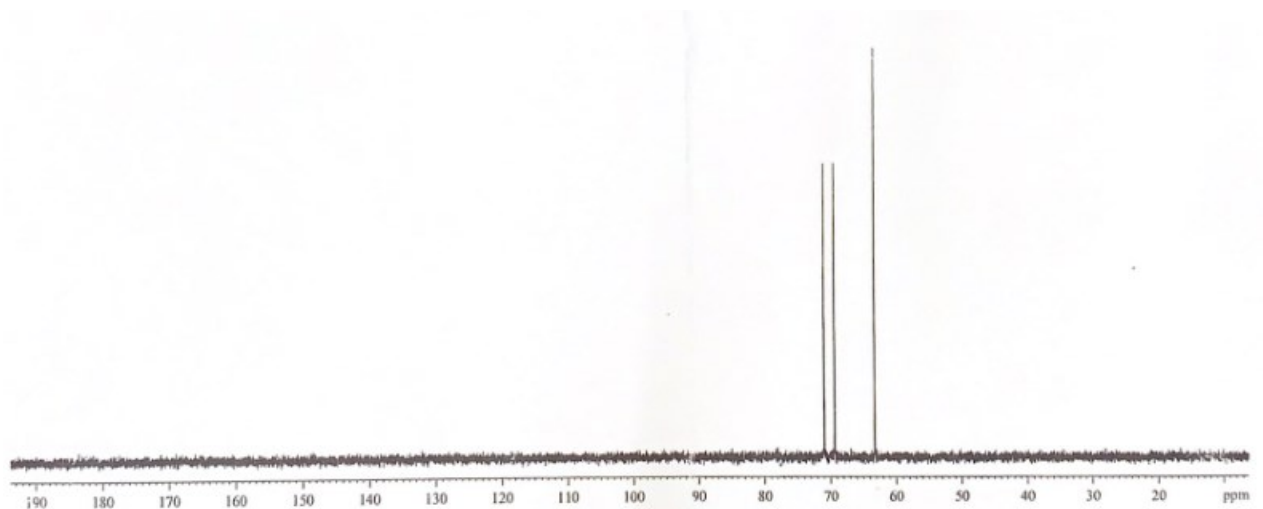
Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Espectro de RMN ^1H (500, 05 MHz, D_2O) de CBS-1



Fonte: Autoria própria.

Figura 7 - Espectro de RMN ^{13}C (125,75 MHz, D_2O) de CBS-1



Fonte: Autoria própria

A análise dos dados obtidos possibilita identificar o CBS-1 como um composto de cadeia simples, aberta e polihidroxilado. Para uma caracterização mais precisa, os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com a literatura de Souza (2011) apresentados na Tabela 3 (pág. 35), podendo identificá-lo como manitol (Figura 8, pág. 35).

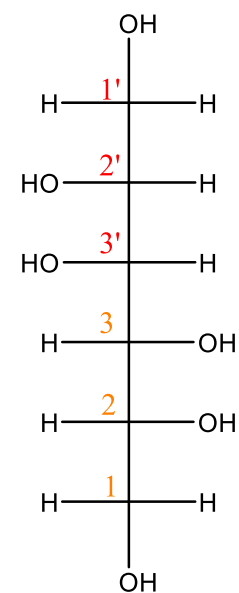
O manitol trata-se de um álcool de açúcar que apresenta propriedades antioxidantes e efeitos renoprotetores por meio da redução no estresse oxidativo, além de ser utilizado clinicamente para redução da pressão intraocular refratária, oligúria e algumas formas de insuficiência renal aguda (LLORENTE, 2015; SOUSA, 2021).

Tabela 3 – Análise comparativa de dados de RMN ^{13}C (125,75 MHz, D_2O) de CBS-1 com os dados reportados na literatura para o manitol.

D_2O		
CBS-1		Literatura (SOUZA, 2011)
C	δ_C	δ_C
1-1'	63,33	63,96
2-2'	69,40	70,01
3-3'	70,96	71,57

Fonte: Autoria própria.

Figura 8. Estrutura de CBS-1



Fonte: Autoria própria

6 CONCLUSÕES

A atividade antioxidante pôde ser observada tanto no extrato hexânico (EHRCb) como no extrato etanólico (EERCb). O EHRCb apresentou o melhor CI_{50} entre as amostras analisadas, igual a 0,1091 mg/mL. Já nas frações F2 e F3, essa atividade pode ter sido alterada devido a uma provável sinergia entre os compostos provocando a diminuição do potencial antioxidante quando eles foram separados, ou até mesmo a inibição dessa atividade, no caso de F1.

O efeito ansiolítico-símile relacionado à *Capraria biflora* está sendo reportado pela primeira vez na literatura, a partir do EHRCb. Além disso, o EHRCb não se mostrou tóxico durante as 96 h de análise em peixe zebra adulto (ZFa).

No extrato hexânico foi notada através da Cromatografia em Camada Delgada a presença de várias substâncias não purificadas, onde há possivelmente a presença da biflorina, uma naftoquinona que apresenta relatos na literatura com atividade anticancerígena.

No extrato etanólico foi possível caracterizar CBS-1 como manitol, um açúcar simples de cadeia aberta, que apresenta função renoprotetora podendo assim ser usado em formulações ou fabricação de fitoterápicos como uma alternativa para tratar disfunções renais.

O EERCb ainda precisa ser investigado quanto ao seu efeito ansiolítico.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, Sulay Loy et al. Anti-inflammatory effects of an aqueous extract of *Capraria biflora* L. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n. 1, p. 53-56, 2003.
- ALVES, Andressa Nunes; DE FREITAS, Tábata Cléia Alves; MACHADO, Yuri Castro. Efeitos adversos de longo prazo ao uso de benzodiazepínicos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e330111436322-e330111436322, 2022.
- ALVES, C. Q., BRANDÃO, H. N., DAVID, J. M., David, J. P., & LIMA, L. D. S. (2007). Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, v. 12, p. 1-8, 2007.
- ALVES, C. Q., DAVID, J. M., DAVID, J. P., BAHIA, M. V., & AGUIAR, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- Arellano-Aguilar, O.; Solis-Angeles, S., Serrano-García, L., Morales-Sierra, E., Méndez-Serrano, A., & Montero-Montoya, R. Use of the peixe zebra embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences. com**, v. 9, n. 4, p. 52, 2015.
- AQUINO, T. M. DE; LIMA, C. S. D. A. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 460-7, 2006.
- DA SILVA, E. L. P., Soares, J. C. F., Machado, M. J., Reis, I. M. A., & Cova, S. C. Avaliação do perfil de produção de fitoterápicos para o tratamento de ansiedade e depressão pelas indústrias farmacêuticas brasileiras. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 3119-3135, 2020.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M., SANTOS, R. J. D., GENOVESE, M. I., & LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 446-452, 2006.
- FONSECA, A.M. **Estudo Fitoquímico dos Constituintes fixos e voláteis de *Capraria biflora***. Dissertação de Mestrado, UFC, Fortaleza-Ceará (2002).
- FONSECA, A. M., PESSOA, O. D., SILVEIRA, E. R., MONTE, F. J., BRAZ-FILHO, R., & LEMOS, T. L. Total assignments of ¹H and ¹³C NMR spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1038-1040, 2003.
- GEBAUER, D. L., PAGNUSSAT, N., PIATO, Â. L., SCHAEFER, I. C., BONAN, C. D., & LARA, D. R. (2011). Effects of anxiolytics in peixe zebra: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 99(3), 480-486, 2011.
- GOÉS, Ana Cristina Costa; DA SILVA, Larissa Sonayra Leal; DE CASTRO, Nádile Juliane Costa. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos: saberes e atos na Atenção Primária à Saúde. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 17, n. 59, 2019.

GONÇALVES, R. N.; NOLL GONÇALVES, J. R. da S.; BUFFON, M. da C. M.; NEGRELLE, R. R. B.; RATTMANN, Y. D. Plantas medicinais na atenção primária à saúde: riscos, toxicidade e potencial para interação medicamentosa. **Revista de APS**, [S. l.], v. 25, n. 1, 2022.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3-4, p. 395-402, 2002.

HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

KEDARE, Sagar B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 412-422, 2011.

LÉMUS, C. GROUGNET, R., ELLONG, E.N., TIAN, W., LECSÖ-BORNET, M., ADENET, S., ROCHEFORT, K., MICHEL, S., and DUFAT, H. Phytochemical study of *Capraria biflora* L. aerial parts (Scrophulariaceae) from Martinique island (French West Indies). **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 194-199, 2015.

LLORENTE, Gisela; DE MEJIA, María Claudia Nino. Manitol versus solución salina hipertónica en neuroanestesia. **Revista Colombiana de Anestesiología**, v. 43, p. 29-39, 2015.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA Jr, V. F., GRYNBERG, N. F., & ECHEVARRIA, A. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

Mendonça de Aquino, Thiago; Lúcia Cavalcanti de Amorim, Elba. **Caracterização farmacognóstica de *Capraria biflora* L. e estudo biológico e físico-químico de seus metabólitos secundários**. 2003. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

OECD guideline for testing acute toxicity in fishes, Test No. 1992. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>. Acesso em 17 de julho de 2023.

OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. **OMS destaca necessidade urgente de transformar saúde mental e atenção**. 2022. <https://www.paho.org/pt/noticias/17-6-2022-oms-destaca-necessidade-urgente-transformar-saude-mental-e-atencao> . Acesso em 27 de novembro de 2023.

Patrício, K. P., Minato, A. C. dos S., Brolio, A. F., Lopes, M. A., Barros, G. R. de ., Moraes, V., & Barbosa, G. C.. O uso de plantas medicinais na atenção primária à saúde: revisão integrativa. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, p. 677-686, 2022.

ROCHA, Eloisa Cristiana; SARTORI, Carolini Aparecida; NAVARRO, Fernanda Flores. A aplicação de alimentos antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. **Revista Científica da FHO| Uniararas**, v. 4, n. 1, p. 19-26, 2016.

RODRIGUES, Antonio Rony da Silva Pereira. Fitoterapia no auxílio ao controle e tratamento da ansiedade—uma revisão integrativa de literatura. **Revista de Casos e Consultoria**, v. 13, n. 1, 2022.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, Cecilia Mónica et al. Antioxidant, antihypertensive, anti-hyperglycemic, and antimicrobial activity of aqueous extracts from twelve native plants of the Yucatan coast. **PLoS One**, v. 14, n. 3, p. e0213493, 2019.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUSA, Vanessa Marcilio de. **O uso do manitol na prevenção de nefrotoxicidade induzida por cisplatina: uma revisão sistemática**. 2021. 1 recurso online (82 p.) Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campinas, 2021.

SOUZA, L. G. da S., M.C.S. Almeida, F.J.Q. Monte, G.M.P. Santiago, R. Braz-Filho, T.L.G. Lemos, C.L. Gomes, R.F. do Nascimento. Chemical constituents of *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) and larvicidal activity of essential oil. **Química Nova**, v. 35, p. 2258-2262, 2012.

SOUZA, L. G. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico da espécie *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae)**. 2011. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SOUZA, Luciana G. da S. *et al.* Synthesis, antibacterial and cytotoxic activities of new biflorin-based hydrazones and oximes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 2, p. 435-439, 2016.



SOUZA, Vinicius Castro; GIULIETTI, Ana Maria. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae sensu lato nativas do Brasil. **Pesquisas, Botânica**, v. 60, p. 7-288, 2009.

Vasconcellos, M., Montenegro, R., Militão, G., Fonseca, A., Pessoa, O., Lemos, T., Pessoa, C., Moraes, M. & Costa-Lotufo, L. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 5-6, p. 394-398, 2005.


VASCONCELLOS, M. C., Bezerra, D. P., Fonseca, A. M., Araújo, A. J., Pessoa, C., Lemos, T. L. G., ... Montenegro, R. C. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. **Melanoma research**, v. 21, n. 2, p. 106-114, 2011.

VERRUCK, Silvani; PRUDENCIO, Elane Schwinden; DA SILVEIRA, Sheila Mello. Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. In: **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v. 4, n. 1, 2018.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ	Comissão de Ética para o Uso de Animais Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi CEP 60740-903 – fone 3101-9890 ceua.uece@uece.br – www.uece.br/ceua	 GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ <small>Secretaria da Ciência, Tecnologia e Educação Superior</small>		
CERTIFICADO				
<p>Certificamos que o Projeto intitulado “Bioprospecção de Atividades Antinociceptiva, Anti-inflamatória, Ansiolítica, Anticonvulsivante e Anti-hiperglicemiante de Produtos Naturais e Sintéticos de Plantas Medicinais e Comercializados no Nordeste brasileiro em Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto” registrado sob o número 05299177/2021, tendo como pesquisador principal Francisco Ernani Alves Magalhães, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 31 de June de 2026.</p>				
CERTIFICATE				
<p>We hereby certify that the Project entitled “Bioprospecting of Antinociceptive, Anti-inflammatory, Anxiolytic, Anticonvulsant and Antihyperglycemic Activities of Natural and Synthetic Products from Medicinal Plants and Marketed in Northeastern Brazil in Zebrafish (<i>Danio rerio</i> adult)” registered with the protocol 05299177/2021, under the supervision of Francisco Ernani Alves Magalhães, is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire on June 31st, 2026.</p>				
RESUMO				
Vigência do projeto	Início	Setembro de 2021	Fim	31 de Junho de 2026
Espécie/Linhagem	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto			
Número de animais	5.000	Peso	0,3-0,5g	Idade 60-90d
Sexo	2.500	Feminino	2.500	Masculino
Origem	Fornecedor comercial em Fortaleza-Ce)			
Metodologia	X	Adequada		Não adequada
Cronograma	X	Adequado		Não adequado
Ofício de encaminhamento	X	Presente		Ausente
Orçamento	X	Adequado		Não adequado
Financiamento	Órgão de fomento		Recursos de Pesquisa e Parcerias	
	N. processo		-	

Fortaleza, 24 de agosto de 2021.


 Vania Marilande Ceccatto
 Presidente CEUA-UECE