

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
LABORATÓRIO DE QUÍMICA E INOVAÇÃO TERAPÊUTICA



HANNA KATARINA LOPES FERREIRA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA DA LIGNINA ISOLADA
DAS FOLHAS DE *MORINDA CITRIFOLIA***

Recife

2020

HANNA KATARINA LOPES FERREIRA

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA DA LIGNINA ISOLADA DAS FOLHAS
DE *MORINDA CITRIFOLIA*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Desenho, modelagem molecular e preparação de produtos bioativos.

Orientador: Dr^a Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientador: Msc. Iranildo José da Cruz Filho

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Ferreira, Hanna Katarina Lopes

Obtenção, caracterização estrutural e avaliação das atividades antioxidante e imunomoduladora da lignina isolada das folhas de *Morinda citrifolia* / Hanna Katarina Lopes Ferreira - 2020.

58 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientador: Iranildo José da Cruz Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. *Morinda citrifolia* 2. Noni 3. Antioxidante

I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora) II. Cruz Filho, Iranildo José da (Coorientador) III. Título

583.93 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-171

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ter me concedido a graça de estar perto de concluir mais uma etapa da minha vida, me fortaleceu para superar todas as barreiras surgidas ao longo desse percurso, sempre derramando inúmeras bênçãos e colocando pessoas especiais em meu caminho.

A minha **Mãe Santíssima** pela intercessão, em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais **Mônica e Anchieta** que nunca mediram esforços para permitir a realização dos meus sonhos os quais sempre sonharam junto comigo, por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, me dando forças principalmente nos momentos mais difíceis da minha jornada.

A minha orientadora, a grande **Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima**, por absolutamente tudo, por te me acolhido em seu laboratório, por toda paciência, amizade, compreensão, força e apoio no decorrer desses anos, minha querida Nena, a senhora minha eterna gratidão!

Ao meu amigo de sempre e hoje co-orientador **Msc. Iranildo José da Cruz Filho**, por todas as contribuições e conhecimentos passados durante toda a minha vida acadêmica, por toda a dedicação com este trabalho, em que foi meu suporte e apoio.

A **banca examinadora**, por todas as contribuições para o enriquecimento do trabalho. Ao meu amor, sempre tão paciente e companheiro **Ewerton**, o qual agradeço por toda paciência, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida, sendo meu maior incentivador.

À **minha família**, por toda contribuição na minha formação e por todas as orações. Aos **meus amigos**, por toda compreensão nos momentos de ausência, por toda força e amizade.

A todos os meus amigos e colegas do **LQIT**, pelos momentos de descontração para ajudar a levar a rotina com mais alegria.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida.

A todos que porventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada!!!

RESUMO

Atualmente, o empenho pela descoberta de novos compostos farmacêuticos advindos de produtos naturais, vem crescendo constantemente, *Morinda citrifolia* comumente conhecida por noni, é uma planta pertencente à família Rubiaceae. Sendo originária da Índia, do sudeste da Ásia e do Havaí, está vastamente distribuída na região tropical do planeta, apresentando significativo crescimento em diversos tipos de solos e diferentes estações. Esta planta aparece como um candidato de alto potencial biológico, o qual apresenta diferentes benefícios a saúde, tais como propriedade antioxidante, possuem também atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatórias. Neste trabalho, foi investigado as atividades antioxidantes e imunomoduladoras de uma lignina isolada das folhas de *Morinda citrifolia*. A lignina foi caracterizada por Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C NMR), Ressonância magnética nuclear de prótons (^1H NMR), análise de cromatografia de permeação em gel, e por espectros de ultravioleta/visível. A lignina foi avaliada quanto à capacidade antioxidante total (TAA), DPPH, ABTS + NO, poder redutor e por fim captura de radicais hidroxil. Determinou-se a atividade citotóxica em macrófagos e imunofenotipagem da lignina (12,5 μg / mL) nas células de camundongos Balb/c. A lignina obtida apresentou em sua estrutura os monômeros guaiacila, siringila e *p*-hidroxifenila (GSH), estas são de baixo peso molecular e apresentaram potencial antioxidante. Além disso, não são citotóxicas em células de macrófagos nas concentrações de 12,5 e 6,25 μg /mL, fato este confirmado pela viabilidade celular e baixa produção de NO pelos macrófagos. A lignina de *Morinda citrifolia* promoveu a proliferação e ativação de linfócitos T CD4 + , porém não houve identificação de linfócitos CD8 + . Os linfócitos CD16+ em contrapartida, foram inibidos pela lignina, já que o controle apresentou níveis maiores que o tratado. Os níveis de monócitos CD16+ na cultura foram relevantes e a lignina mostrou elevada ativação dessa população celular. Os resultados mostram que a lignina oriunda de *Morinda Citrifolia* é um agente promissor de alto potencial biológico.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia*. Noni. Antioxidante. Imunomodulação.

ABSTRACT

Currently, the effort to discover new pharmaceutical compounds from natural products has been growing steadily. *Morinda citrifolia*, commonly known as noni, is a plant belonging to the Rubiaceae family. Originating in India, Southeast Asia and Hawaii, it is widely distributed in the tropical region of the planet, showing significant growth in different types of soil and different seasons. This plant appears as a candidate with high biological potential, which has different health benefits, such as antioxidant properties, and also has antibacterial, antiviral, antifungal, anti-tumor, anti-inflammatory activities. In this work, it was investigated as antioxidant and immunomodulatory activities of an isolated line of *Morinda citrifolia* leaves. One line was characterized by Total reflection attenuated spectroscopy in the infrared with Fourier transform (FTIR), Nuclear carbon magnetic resonance (^{13}C NMR), Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), gel permeation chromatography analysis and ultraviolet/visible spectra. One line was evaluated for total antioxidant capacity (TAA), DPPH, ABTS + NO, power reducer and hydroxyl radical capture. To determine a cytotoxic activity in macrophages and immunophenotyping of lignin (12.5 μg / mL) in cells of Balb /c mice, a line that shows in its structure the water, syringyl and *p*-hydroxyphenyl (GSH) monomers, these are of low molecular weight and have antioxidant potential. In addition, they are not cytotoxic in macrophage cells in cells of 12.5 and 6.25 μg / mL, a fact confirmed by cell viability and low NO production by macrophages. A strain of *Morinda citrifolia* promotes the proliferation and activation of CD4+ T lymphocytes, but there was no identification of CD8 + lymphocytes. The CD16+ lymphocytes, in contrast, were inhibited by the line, since the control showed higher levels than the treated one. The levels of CD16+ monocytes in the culture were relevant and were shown to be taken from this cell population. The results show that the lignin from *Morinda Citrifolia* is a promising agent with high biological potential.

Keywords: *Morinda citrifolia*. Noni. Antioxidant. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Folhas e frutos do noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	15
Figura 2 - Esquema da estrutura de uma biomassa lignocelulósica (lignina, celulose e hemicelulose).....	17
Figura 3 - Estruturas moleculares dos álcoois p-cumarílico (1), coniferílico (2) e sinapílico (3).....	18
Figura 4 - Representação de uma estrutura química de lignina obtida de madeira mostrando as principais ligações químicas presentes na macromolécula.....	20
Figura 5 - Fluxograma das etapas realizadas para a obtenção da lignina de <i>Morinda citrifolia</i>	32
Figura 6 - Espectro de FTIR para as ligninas das folhas de <i>Morinda citrifolia</i>	39
Figura 7 - Espectro UV/Vis para as ligninas das folhas de <i>Morinda citrifolia</i>	40
Figura 8 - Espectro de ¹ H RMN de lignina acetilada de <i>Morinda citrifolia</i> solubilizada em CDCl ₃	41
Figura 9 - Espectro de ¹³ C RMN de lignina acetilada de <i>Morinda citrifolia</i> folhas solubilizadas em CDCl ₃	43
Figura 10 - Estabilidade térmica da lignina das folhas de <i>Morinda citrifolia</i>	44
Figura 11 - Análise da viabilidade em macrófagos (A) e determinação de NO (B).....	48
Figura 12 - Imunofenotipagem de linfócitos T CD4 + (A), CD8+ (B), CD16+ (C) e monócitos CD16 + (D) em culturas tratadas com a <i>Morinda citrifolia</i> (12,5µg/mL).....	49

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Técnicas utilizadas para a caracterização das ligninas, suas vantagens e desvantagens.....	21
Tabela 2 - Comparação de vários métodos de isolamento de ligninas, obtidas de bagaço de cana de açúcar.....	24
Tabela 3 - Atividade antioxidante promovida por diferentes ligninas em diferentes ensaios.....	26
Tabela 4 - Diferentes atividades biológicas produzidas por diferentes ligninas.	26
Tabela 5 - Fatores de conversão dos componentes precursores de Celulose, Hemicelulose e carboidratos não fibrosos.....	30
Tabela 6 - Atribuições de bandas de espectros de absorção no infravermelho, características da lignina das folhas de <i>Morinda citrifolia</i>	40
Tabela 7 - Distribuição relativa (%) das áreas de sinal nas regiões de deslocamento químico (ppm) dos espectros de RMN de ^1H de <i>Morinda citrifolia</i> lignina.....	42
Tabela 8 - Atividade antioxidante das ligninas nas folhas de <i>Morinda citrifolia</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Atividade antioxidante total (Antioxidante por fosfomolibdênio)
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Act	Acetilado
ATR-FTIR	Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier
CBA	Kit de determinação de citocinas
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRX	Difratometria de raios-X
EC₅₀	Concentração do composto necessária para reduzir 50% antioxidante
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HMF	5-hidroxi-metil-furfural
M_n	Peso molecular médio numérico
M_w	Peso molecular médio ponderado
M_w/M_n	Dispersibilidade
NO	Óxido nítrico
RMN de ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹H	Ressonância magnética nuclear de prótons
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UV/Vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	OBJETIVO GERAL.....	13
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	NONI (<i>MORINDA CITRIFOLIA</i>).....	14
2.2	PROPRIEDADES MEDICINAIS DE DIFERENTES PARTES DA PLANTA <i>MORINDA CITRIFOLIA</i>	16
2.3	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL.....	17
2.3.1	Macromolécula vegetal: Lignina.....	17
2.3.2	Caracterização química das ligninas.....	20
2.3.3	Obtenção das ligninas.....	23
2.4	ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICAS PROMOVIDA PELAS LIGNINAS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	PLANTA.....	28
3.2	ANÁLISE COMPOSICIONAL DE FOLHAS DE <i>MORINDA CITRIFOLIA</i>	28
3.2.1	Determinação do teor de extrativos.....	28
3.2.2	Determinação do teor de umidade.....	28
3.2.3	Hidrólise ácida (H₂SO₄ 72% v/v) as folhas de <i>Morinda citrifolia</i>.....	29

3.2.4	Determinação do teor de lignina solúvel.....	29
3.2.5	Determinação de carboidratos, ácido orgânicos, HMF(5-hidroxi-metil-furfural) e Furfural na fração líquida.....	30
3.2.6	Determinação de lignina insolúvel em meio ácido, teor de cinzas de lignina e cinzas totais	30
3.3	OBTENÇÃO DAS LIGNINAS.....	32
3.4	ACETILAÇÃO DE LIGNINAS.....	33
3.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LIGNINAS EM FOLHAS DE <i>MORINDA CITRIFOLIA</i>	33
3.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR TOTAL DE FENOL DAS LIGNINAS NAS FOLHAS DE <i>MORINDA CITRIFOLIA</i>	34
3.7	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	37
3.8	ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LIGNINAS EM FOLHAS DE <i>MORINDA CITRIFOLIA</i>	39
4.2	CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE LIGNINA DE <i>MORINDA CITRIFOLIA</i>	45
4.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS LIGNINAS: CITOTOXICIDADE, DETERMINAÇÃO DE OXIDO NÍTRICO E ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA.....	47
5	CONCLUSÃO.....	50
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, a busca por novos compostos naturais com potencial biológico, manifesta crescentemente a importância da correlação entre o uso etnofarmacológico e a comprovação científica de sua eficácia terapêutica. A utilização de plantas na medicina popular, embora seja uma prática antiga, permanece em constante uso indiscriminado. Além disso, muitos autores têm publicado evidências sobre a eficácia de plantas medicinais e seus constituintes (NORIKURA et al., 2010; HASEGAWA et al., 2017; VINARDELL et al., 2017; CRUZ- FILHO et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020).

Morinda citrifolia, usualmente conhecida por noni, é uma planta pertencente à família Rubiaceae. Sendo originária da Índia, do sudeste da Ásia e do Havaí, está vastamente distribuída na região tropical do planeta, apresentando crescimento em diversos tipos de solos e diferentes estações. *M. citrifolia* consiste em uma árvore ou arbusto de 3 a 6 metros de altura, com folhas de 10 a 30 centímetros de comprimento (POTTERAT; HAMBURGER, 2007; WANG et al., 2016).

A planta foi introduzida no Brasil por apelo comercial devido aos efeitos benéficos seus frutos têm sido largamente consumidos. Diferentes estudos foram realizados utilizando o suco, das folhas foram isoladas diferentes moléculas bioativas as quais tem apresentado diferentes atividades biológicas. Dentre os benefícios podem ser citados: eliminação dos radicais livres, devido a sua propriedade antioxidante, possuindo também atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatórias, além de estimularem o sistema imunológico, atuam na regulação das funções celulares e do colesterol. (KAMIYA et al., 2010, ALENCAR et al., 2013). Nas últimas décadas diversos produtos do noni atingiram uma grande popularização nas formas de sucos, pílulas, cápsulas e em pós. Os benefícios relacionados ao noni o fizeram receber o status de novo produto natural pela *European Commission of Health Consumer Protection* (LOHANI et al, 2019).

As atividades biológicas do noni são atribuídas à ação de diversos metabólitos secundários, dentre os quais alcaloides, flavonoides, taninos, antraquinonas, iridoides, lignanas e ligninas (BAKER, 2019; BAZARRA-ELENES et al, 2019; DUSSOSSOY et al, 2011; SETYANI; SETYOWATI, 2018; WEST et al, 2009). As ligninas, presentes nas folhas do noni (JAYANEGARA et al, 2011), são macromoléculas polifenólicas formadas a partir do acoplamento radical de três hidroxipropanoides: os álcoois cumarílico, sinapílico e coniferílico, apresentando grande distribuição vegetal e consistindo em um recurso renovável (CHRISTIERNIN, 2006).

Diversas ações referentes às ligninas e seus derivados são descritas na literatura, tais como: eliminação de radicais livres (LU et al, 2012), atuação contra bactérias Gram-positivas e negativas (WANG et al, 2018), efeito neuroprotetor com promissora utilização na prevenção de doenças neurodegenerativas (AKAO et al, 2004) entre outras. Contudo, apesar de seu grande potencial, as ligninas são comumente tratadas como resíduos ou como subproduto de baixo valor à biorrefinaria (YUAN; XU; SUN, 2013). Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi investigar as características químicas, o efeito antioxidante e o potencial imunomodulador *in vitro* de uma lignina isolada das folhas de *Morinda citrifolia*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as características químicas, o efeito antioxidante e imunomodulador *in vitro* de uma lignina isolada das folhas de *Morinda citrifolia*.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a análise composicional das folhas de *Morinda citrifolia*.
- Isolar a lignina das folhas de *Morinda citrifolia* e caracterizar por meio de técnicas de FTIR, RMN ^1H e ^{13}C NMR, análise de cromatografia de permeação em gel, espectroscopia de UV/Vis e análise termogravimétrica.
- Avaliar o potencial antioxidante da lignina
- Realizar ensaios de citotoxicidade em células de macrófago do tipo RAW 264.7.
- Realizar ensaios de imunofenotipagem em células esplênicas de camundongo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NONI (*MORINDA CITRIFOLIA*)

Morinda citrifolia é uma espécie pertencente à família Rubiaceae, esta é comercialmente conhecida por Noni; O nome científico da planta foi primeiramente descrito por Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, o qual é derivado do gênero *Rubia* L., do latim rubium, devido à tinta vermelha, tal qual é produzida pelas raízes de plantas desse gênero. Rubiaceae é a quarta maior família botânica entre as angiospermas e possui uma distribuição cosmopolita, com 550 gêneros e 9000 espécies, dessas, 2000 podem ser encontradas no Brasil. A maior parte das rubiáceas é própria de regiões quentes, principalmente os trópicos. A família é conhecida devido a sua importância econômica e terapêutica, sendo largamente utilizada na medicina popular e na fabricação de fitofármacos (PEREIRA, 2007; MATOSO et al., 2013).

A classificação taxonômica de *Morinda citrifolia* é expressa da seguinte forma: Reino: Plantae; Filo: Magnoliophyta; Classe: Magnoliopsida; Ordem: Gentianales; Família: Rubiaceae; Gênero: *Morinda*; Espécie: *citrifolia*; Nome Botânico: *Morinda citrifolia*.

O vegetal é encontrado de pequeno a médio porte e possui folhas permanentes. A árvore cresce frequentemente em regiões costeiras ao nível do mar e em áreas florestais em torno de 400 metros acima do nível do mar. Desenvolve-se bem em solos vulcânicos ricos em minerais, apesar de também se desenvolverem em solos arenosos ou muito úmidos (WANG et al., 2016;).

Os galhos são angulares e apresentam ranhuras (estrias). As folhas são elípticas, opostas e com margens onduladas, apresentando coloração verde brilhante na face superior e opaca na inferior. A inflorescência é composta por pequenas flores brancas, seguida de amarelas com formato tubular. Os frutos são ovóides e tornam-se amarelos ou brancos opalescentes quando maduros. Eles possuem a superfície grumosa coberto de secções com formato poligonais, a figura 1 mostra as folhas e frutos do noni (McCLATHEY, 2002; MULLER, 2007, DUSSOSSOY et., al 2018).

Figura 1 – Folhas e frutos do noni (*Morinda citrifolia*)



Fonte: Nelson (2006).

As plantas são incomparáveis na sua capacidade de produzir um vasto número de metabólitos secundários. Muitos destes metabólitos têm características medicinais. A propriedade medicinal das plantas é estudada há séculos pelo homem, e esta tradição mantém-se em uso crescente de medicinas alternativas e desenvolvimento de suplementos dietéticos. Na atualidade, documentadamente, todas as partes do noni, como raízes, cascas, folhas, frutos e sementes são utilizadas como potenciais agentes terapêuticos, apresentando atividades com ações analgésica, anti-hipertensiva, antioxidante e anti-helmíntica (SILVA et al, 2012). Nas últimas décadas diversos produtos do noni atingiram uma grande popularização nas formas de sucos, pílulas, cápsulas e em pós, sendo intensamente comercializados como possuindo propriedades imunomodulatórias e no tratamento da síndrome da fadiga crônica e do câncer. Tendo em vista os benefícios atribuídos ao noni, a *European Commission of Health and Consumer Protection* (Comissão Europeia de Saúde e Proteção do Consumidor, tradução livre) o reconheceu como novo produto natural (LOHANI et al, 2019).

Essas atividades são proporcionadas por compostos fitoquímicos, os quais são encontrados como metabólitos secundários na planta, a fim de garantir seu crescimento, bem como sua proteção contra pragas e outros agentes nocivos. Nesse sentido, estima-se que mais de 160 compostos fitoquímicos já foram identificados a partir do noni, dentre os quais: ácidos, álcoois, ésteres, hidrocarbonetos, antraquinonas, terpenóides, carotenoides, flavonoides e outras substâncias como o α -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C) (POTTERAT; HAMBURGER, 2007).

2.2 PROPRIEDADES MEDICINAIS DE DIFERENTES PARTES DA PLANTA *MORINDA CITRIFOLIA*

Batista et al (2020) avaliaram a atividade anti-inflamatória de polissacarídeos obtidos a partir de frutos de *M. citrifolia* sobre colite ulcerativa induzida por ácido acético em camundongos. Os autores constataram redução significativa da inflamação através da administração intraperitoneal dos polissacarídeos, sendo a dose de 3 mg/kg a mais efetiva entre as doses testadas. Parâmetros como a redução de características inflamatórias macroscópicas, redução da infiltração de neutrófilos, manutenção parcial da integridade do tecido intestinal, redução do estresse oxidativo, da liberação de citocinas pró-inflamatórias, da expressão da enzima ciclo-oxigenase do tipo 2 (COX-2) e da produção óxido nítrico indutível (iNOS).

West et al (2009) constataram em seu trabalho que o extrato das folhas de *M. citrifolia* é capaz de atenuar o efeito inflamatório tóxico induzido por radiação ultravioleta (UVB). Os constituintes químicos foram: rutina, kaempferol 3-*o*-rutinosídeo, quercetina, kaempferol e pirofeoforbídeo α . O extrato etanólico teve a capacidade de antagonizar em 57% o receptor da H1 da histamina, sendo um possível mecanismo para a ação anti-inflamatória das folhas em seu uso na medicina popular.

Dussossoy e colaboradores (2011) efetuaram a microfiltração de suco do noni, sendo seu conteúdo particionado com os solventes orgânicos acetato de etila e *n*-butanol. Ensaio *in vitro* de Capacidade de Absorbância de Radical Oxigênio (ORAC) e a eliminação de radicais livres mensurada por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) comprovaram a ação antioxidante dos extratos. Além disso, a redução *in vitro* da atividade das enzimas COX-1 e COX-2, da produção de mediadores pró-inflamatórios (prostaglandinas E₂ e óxido nítrico), bem como a diminuição *in vivo* de edema de pata induzido por carragenina foram evidências da ação anti-inflamatória de iridoides e outros compostos caracterizados e presentes nos extratos de noni.

Pongoh e Gemaputri (2019) realizaram a extração etanólica (etanol 96%) de folhas de *M. citrifolia*, avaliando ação antibacteriana contra *Aeromonas hydrophilla*, através do método de difusão em disco de papel. Nas concentrações de 30 e 60%, os extratos apresentaram grande atividade inibitória do crescimento bacteriano (27 e 36,1 mm, respectivamente).

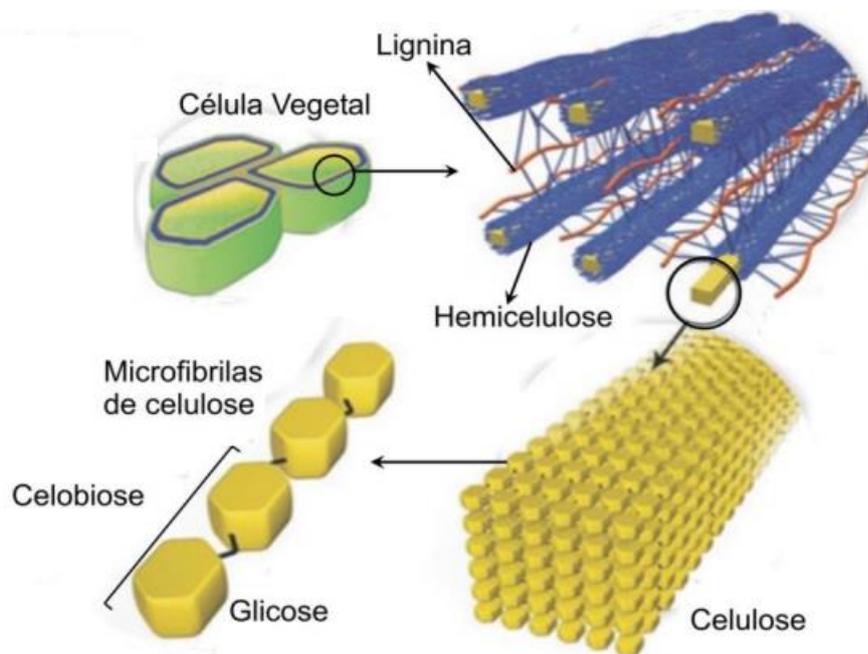
Farias e colaboradores (2020) investigaram se proteases provenientes do extrato puro do fruto do noni apresentavam a capacidade de coagulação do leite (coalhar o leite) para a produção de queijo. Os resultados não apenas demonstram a eficácia das proteínas utilizadas em promover o processo de coagulação, mas permitiram a obtenção de queijos de boas textura

e aceitação. Tendo em consideração o elevado rendimento na obtenção dessas proteínas a partir do Noni, seu cultivo pode ser uma excelente fonte de proteases coaguladoras do leite para a indústria de laticínios.

2.3 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL

A biomassa vegetal é constituída por celulose, polioses, lignina, extrativos e sais minerais, apresentando uma estrutura lamelar na qual se distribuem seus componentes. A celulose e a hemicelulose predominam na região da parede celular e a lignina distribui-se por toda estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média enquanto as substâncias pécicas são encontradas distribuídas tanto na parede celular como na lamela média das células vegetais (FENGEL e WEGENER, 1984). A Figura 2 mostra os principais componentes das biomassas vegetais.

Figura 2: Esquema da estrutura de uma biomassa lignocelulósica (lignina, celulose e hemicelulose).



Fonte: Adaptado de SANTOS et al. (2012)

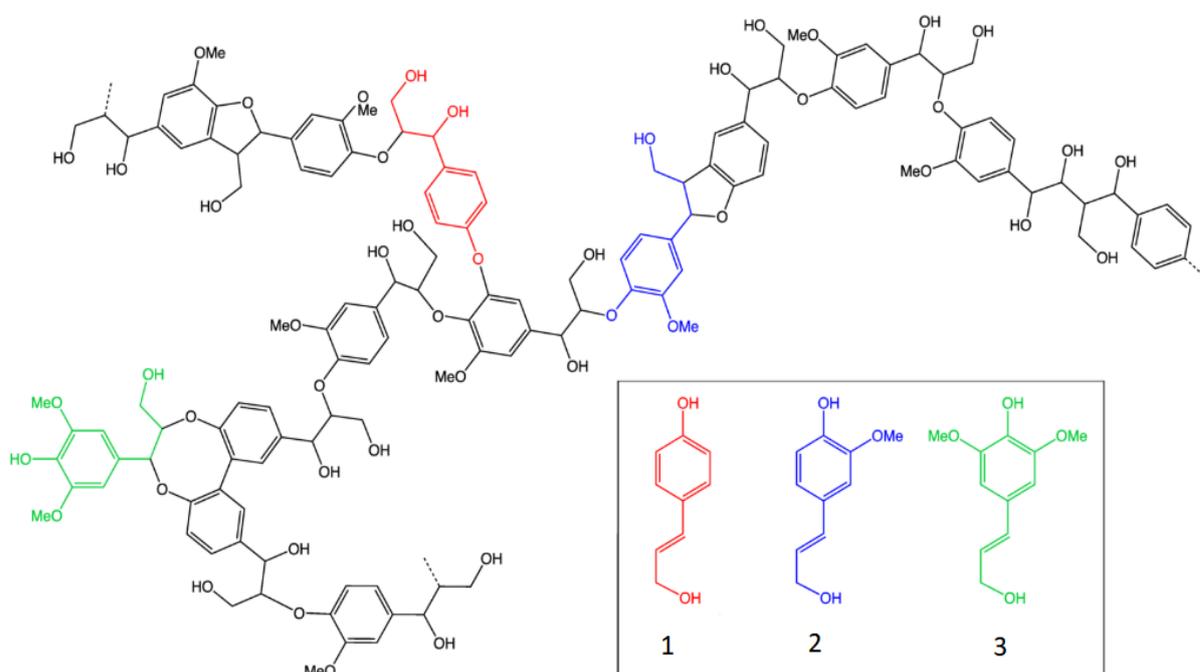
2.3.1 Macromolécula vegetal : Lignina

As ligninas são o segundo biopolímero mais abundante da Terra, atrás apenas da celulose, representando cerca de 30% da quantidade total de carbono da biosfera. As ligninas são responsáveis pela rigidez e força da parede das células vegetais, além de promoverem a

condução de água, através de um sistema vascular, e promover a proteção das plantas contra patógenos (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Embora produzida em milhões de toneladas todos os anos, as ligninas são tratadas como resíduo na indústria da produção de papel, a partir da celulose. Apenas uma pequena quantidade (1-2%) é empregada na produção de resinas fenólicas, freios automotivos, espumas de poliuretano, biodispersantes e surfactantes (MANSOURI; SALVADÓ, 2006).

Quimicamente, as ligninas consistem em complexos polímeros polifenólicos amorfos formados a partir da condensação radical de três álcoois aromáticos (monolignóis): *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A Figura 3 mostra a estrutura molecular dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico.

Figura 3 – Estruturas moleculares dos álcoois *p*-cumarílico (1), coniferílico (2) e sinapílico (3).



Fonte: <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/665>

A constituição da região aromática destes três álcoois são as porções *p*-hidróxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) (ESPINOZA-ACOSTA et al, 2016). De um modo geral, as ligninas de madeira dura de angiospermas eudicotiledôneas são constituídas predominantemente pelas unidades G e S, enquanto aquelas de madeira macia de gimnospermas são formadas por unidades G. Já as ligninas de monocotiledôneas têm incorporadas unidades G e S, além de uma quantidade maior de H em comparação com as dicotiledôneas (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

A biogênese das ligninas tem início nas regiões da lamela mediana e parede celular S1, se espalhando por toda a parede secundária S2 sempre em direção à luz. A lignificação é uma das últimas etapas da diferenciação de células do xilema, onde a lignina é depositada sobre carboidratos na matriz da parede celular (DONALDSON, 2001).

A lignina é formada via fenilpropanóides, tendo fenilalanina como substrato inicial. Atualmente são conhecidas dez enzimas necessárias para a síntese de monolignóis sendo elas: fenilalanina amonialiase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), hidroxicinamoil-CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil-CoA: shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase (HCT), p-cumarato 3-hidroxilase (C3H), cafeoil-CoA ometiltransferase (CCoAOMT), hidroxicinamoil-CoA redutase (CCR), ferulato 5-hidroxilase (F5H), ácido cafeico o-metiltransferase (COMT), cinamil álcool desidrogenase (CAD). Os monolignóis produzidos são transportados até a parede celular e oxidados pelas enzimas peroxidases (PER) e lacases (LAC) dando início a polimerização (LIGNIN SYSTEMS, 2015).

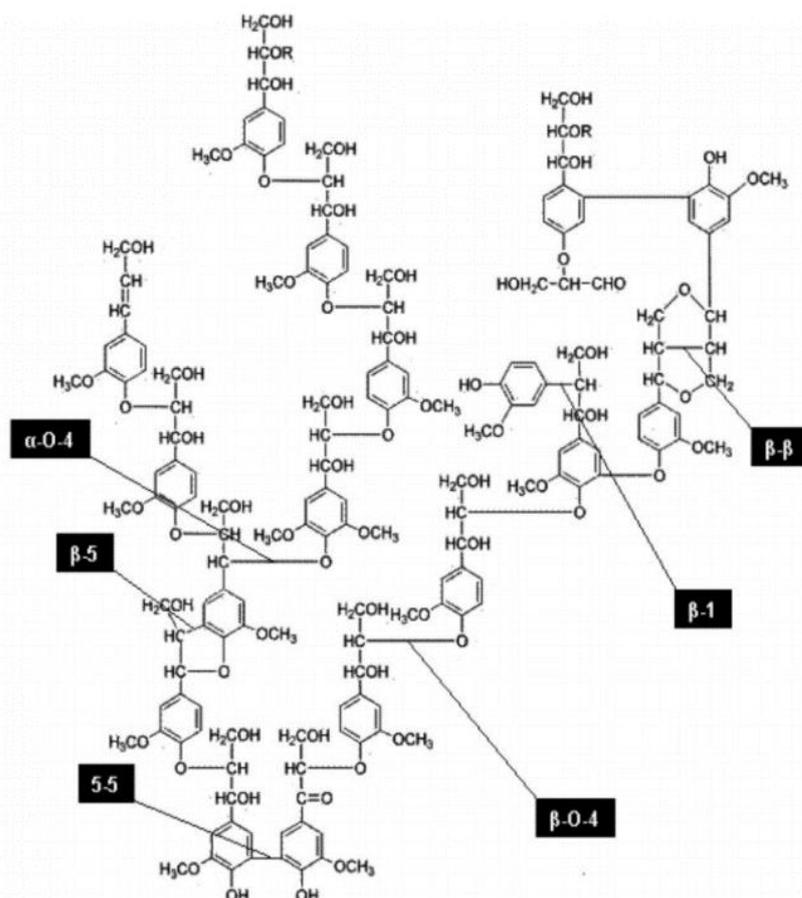
A polimerização é iniciada pela remoção enzimática de um próton e um elétron formando radicais fenóxi. O acoplamento posterior ocorre sem controle enzimático, formando o primeiro dímero que se acopla a outros monômeros, gerando trímeros e tetrâmeros e cadeias maiores (CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014). O acoplamento pode acontecer em diversas regiões na molécula, formando diferentes tipos de ligações, gerando estruturas aleatórias e bastante reticuladas.

As ligninas não possuem um padrão definido na ordem de seus monômeros, como ocorre na celulose. Sua composição e concentração variam em função da espécie, do tipo de célula e até mesmo entre as camadas da parede celular da célula vegetal (CHRISTIERNIN, 2006). Nesse contexto, enquanto em plantas de madeira a composição da lignina é predominantemente constituída pelas porções guaiacila e siringila, nas plantas herbáceas os constituintes majoritários são os grupos p-hdróxifenila, guaiacila e siringila. As ligninas apresentam diversos grupos hidróxil fenil, metóxil, carbonílicos, carboxílicos (ADLER, 1977). As ligninas estão unidas por meio de ligações covalentes com carboidratos (particularmente hemicelulose), através do carbono α e de C-4 do anel benzeno, formando estruturas complexas de lignina-carboidrato (LCC) (BURANOV; MAZZA, 2008).

Após a condensação radicalar dos monolignóis no processo de lignificação, os principais tipos de ligações formadas são do tipo éter (entre átomos de carbono-oxigênio) ou carbono-carbono. Nesse sentido, as ligações entre as unidades de lignina são do tipo β -O-4, as quais sofrem mais facilmente despolimerização. Por outro lado, as ligações β -1, β -4, β - β , 5-5

e 4-O-5 são mais resistentes à degradação (LAPIERRE; POLLET; ROLANDO, 1995). A Figura 4 mostra as principais ligações químicas presentes na macromolécula.

Figura 4- representação de uma estrutura química de lignina obtida de madeira mostrando as principais ligações químicas presentes na macromolécula



Fonte: Carvalho et al. (2009)

2.3.2 Caracterização química das ligninas

A caracterização da composição da lignina é costumeiramente realizada a partir de diversas técnicas como: conteúdo de massa seca, conteúdo de cinzas, análise elementar, espectroscopia de ultravioleta (UV), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (LU et al, 2012; MANSOURI; SALVADÓ, 2006). A Tabela 1 adaptada de Lu et al. (2012), Mansouri e Salvadó, (2006) sumariza as técnicas utilizadas para a caracterização das ligninas, suas vantagens e desvantagens.

Tabela 1- Técnicas utilizadas para a caracterização das ligninas, suas vantagens e desvantagens

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Espectroscopia de Fluorescência	Mais sensíveis do que UV/vis.	
	Determinar a localização de lignina da parede celular vegetal.	Requer uso de fluoróforo ou fluorocromo para análise das amostras
	Determinar o teor de lignina em relação baseada na luminosidade em técnicas de imagem.	
	Lignina em contrato com o fluoróforo apresenta forte fluorescência.	
CG (Cromatografia gasosa)	Instrumentação barata. Mais seletiva do que a quando comparada a UV/vis.	
	Não destrutivo.	
	Melhor resolução espectral de HPLC.	Destrutivo.
CLAE (A cromatografia líquida de alta eficiência)	Seletivamente analisar espécie só voláteis.	Requer moléculas voláteis, ou derivatização da amostra para promover em fase gasosa.
	A amostra precisa apresentar altos níveis de pureza	
	Não destrutiva.	Tempo de análise em quase todos os casos é longo.
Cromatografia por gel de filtração	Pode recolher frações.	
	Separação de moléculas não-voláteis ou termicamente instáveis.	
	Instrumento convencional.	Associação de lignina com moléculas interfere na medição.
MS (Espectrometria de massa)	Análise rápida.	Difícil em obter dados sobre polidispersidade.
		Efeitos de condensação.
	Pode ser usado para a determinação do peso molecular.	Destrutivo.
	Análise rápida.	
	Seletividade.	
Sensibilidade.		
	Variedade de diferentes estratégias de ionização.	

Espectroscopia de Infravermelho	<p>Não destrutivo.</p> <p>Pouco ou nenhuma preparação da amostra.</p> <p>Alto rendimento.</p> <p>Instrumentação mais barato.</p> <p>Pouco ou nenhuma preparação da amostra.</p>	<p>Pode exigir preparação específica da amostra (isto é, Pastilha de KBr).</p> <p>Sensibilidade espectral (pode necessitar de secagem extensa amostra).</p> <p>Medidas predominantemente CH, NH, OH, SH.</p>
<p>RMN</p> <p>(Ressonância Magnética Nuclear)</p>	<p>Informações estruturais.</p> <p>Não destrutivo.</p>	<p>A quantificação da lignina é difícil, por conta da sobreposição.</p> <p>Falta de resolução espectral, especialmente na região de lignina.</p> <p>Falta de sensibilidade.</p> <p>Instrumentação cara.</p>
Pirólise	<p>Elimina a necessidade de isolamento da lignina.</p> <p>De alto rendimento na caracterização.</p> <p>A preparação da amostra é fácil, fácil da amostra.</p> <p>Permite a caracterização estrutural detalhada de produtos de pirólise.</p> <p>Quantidades de amostras pequenas.</p>	<p>Destrutivo.</p> <p>Análise de dados complexa (isto é, em que os fragmentos devem ser incluídos na quantificação monômero).</p>
Espectroscopia Raman	<p>Alto rendimento.</p> <p>Múltiplas fontes de excitação disponíveis.</p> <p>Não destrutivo.</p> <p>Pouco ou nenhuma preparação da amostra.</p> <p>Sinais forte de lignina.</p>	<p>Auto absorção de analitos coloridos, tais como a lignina.</p> <p>Compostos fenólicos de parede celular podem interferir com a medição; necessidade de extrato de biomassa contendo alto-extraíveis.</p> <p>Fluorescência pode mascarar sinal.</p>
TGA (Análise termogravimétrica)	<p>Alto rendimento.</p> <p>Ideal para polímeros como lignina.</p>	<p>Destrutivo.</p> <p>Temperatura de rampa deve causar alterações em massa de analito.</p>
Espectroscopia UV/visível	<p>Instrumentos baratos e simples.</p> <p>Seletivo e sensível.</p> <p>A lignina tem UV transição eletrônica.</p>	<p>Dificuldade em determinar extinção de coeficiente para quantificação da lignina.</p> <p>requer remoção de outras moléculas antes da medição de lignina solúvel ácida.</p>

Química úmida	Técnicas bem estabelecidas (ácido, base, organosolv, dentre outras).	Tedioso, a preparação da amostra e análise dispendiosa.
	Seletivo para específicas porções.	Pode alterar / destruir a amostra. Só pode detectar específicas ligações C em lignina.

2.3.3 Obtenção das ligninas

As ligninas são classificadas em dois tipos, dependendo do método empregado durante sua extração: ligninas contendo enxofre e as ligninas livres de enxofre (LORA; GLASSER, 2002). As ligninas contendo enxofre são obtidas a partir de forte alcalinização da madeira e consistem em lignosulfonatos e lignina *kraft*. Por outro lado, a lignina livre de enxofre é obtida a partir da biomassa lignocelulósica, entre vários métodos, soda e *organosolv* (RUIZ et al, 2011).

A lignina *kraft* é obtida a partir do tratamento da madeira com bases fortes (ex: hidróxido de sódio e sulfeto de sódio). Esse processo, capaz de produzir expressivas quantidades de lignina, resulta na quebra das ligações aril-éter com a produção de fragmentos solúveis de diversos pesos moleculares, os quais podem ser recuperados com acidificação do meio. A cor da lignina *kraft* é escura e apresenta baixa hidrossolubilidade (LANGE; DECINA; CRESTINI, 2013).

Por sua vez, os lignosulfonatos são produto do cozimento da madeira com sulfeto metálico e dióxido de enxofre (SO₂). O processo envolve a reação inicial da lignina com ácido sulfuroso (H₂SO₃) para a formação de ácido lignosulfônico, seguida da formação de lignosulfonatos solúveis (tendo a presença de Na⁺, Mg²⁺ ou NH₄⁺ como contra-íons), culminando então com a fragmentação dos lignosulfonatos. O resultado é a geração de compostos com grande quantidade de grupos sulfonatos ligados à porção alifática da lignina. Os lignosulfonatos são muito solúveis em água e em solventes orgânicos polares (DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011).

Em relação às ligninas livre de enxofre, a lignina *organosolv* é conseguida a partir da madeira ou de plantas herbáceas com a utilização de solventes orgânicos como álcoois (metanol ou etanol) e acetona, sob temperaturas entre 160-220 °C (LI et al, 2020). O procedimento envolve a quebra das ligações aril-éter (catalisada por ácido) do polímero, resultando em sua solubilização, as quais são recuperadas do solvente orgânico a partir da regulação de alguns aspectos como concentração, pH e temperatura. A lignina *organosolv* possui constituição química próxima à da lignina em sua forma natural (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014).

A lignina soda é obtida a partir do conteúdo lignocelulósico proveniente da palha e bagasso através do emprego de hidróxido de sódio, à semelhança do que ocorre com a lignina *kraft* (excetuando-se o uso de sulfeto hidrogênio). O processo da formação de lignina soda é conduzido pela quebra das ligações da lignina polimérica e transcorre em várias etapas, como a de aquecimento e precipitação por ácidos (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014). O produto obtido apresenta características significativamente similares à lignina *kraft*, mas que apresenta maior dificuldade de ser recuperado em decorrência do alto conteúdo de ácidos carboxílicos formados a partir da oxidação de grupos hidróxi alifáticos da lignina (DOHERTY et al, 2001). A Tabela 2 adaptada de Al Arni, (2018) sumariza diferentes métodos de obtenção de ligninas alcalinas.

Tabela 2 - Comparação de vários métodos de isolamento de ligninas, obtidas de bagaço de cana de açúcar.

Métodos	Condições de tratamento	Lignina isolada (% de matéria seca) Rendimento
Tratamentos sequenciais com várias concentrações de peróxido alcalino e hidróxido de sódio	Etapas de tratamentos sequenciais com água destilada, NaOH 0,5 M, H ₂ O ₂ 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0% a pH 11,5 e NaOH 2 M a 55 ° C por 2 h	0,5, 9,5, 2,7, 0,6, 1,0, 0,9, 0,5 e 0,4
Extração por dioxano e ácido clorídrico e por solução alcalina	Pré-tratamento com ciclo-hexano-etanol (1: 1, v: v) por um dia e seco a 60 ° C,	10
	Tratamento com solução de dioxano e ácido clorídrico aquoso (0,1 N) (8,5: 1,5, v: v) com razão (100 g /L) e aquecido sob nitrogênio a 100 ° C por 2 h	8,0
	Tratamento com solução alcalina (KOH 0,5 M) com proporção de 50 g / 1,5 L sob nitrogênio a 35 ° C por 3,5 h	
Extração alcalina de dioxano	Etapas sequenciais:	5,1
	Tratamento com solução de dioxano (96: 4, v / v dioxano / água), proporção 1:20 (g de bagaço / mL de solução) por 2 h.	1,4
	Tratamento com 50% de dioxano (50:50, v / v dioxano / água), proporção 1:20 (g de bagaço / mL de solução) por 2 h.	
	Tratamento com 80% de dioxano (80:20, v/v dioxano / água) contendo 1% de NaOH à temperatura de ebulição, razão 1:20 (g de bagaço / solução de solução) por 2 h.	0,8

	Polpação com NaOH a 15% (m/v) e proporção 1: 10-1: 18 (p/ p) a 90-98 ° C por 1,5-4 h.	7,2
Polpação alcalina com solução de hidróxido de sódio	Pré-tratamento com água quente a 80 ° C. Polpação com NaOH (1:10 m / v) e proporção 1:10 (g / mL) a 120 ° C por 1 h, Adição de três volumes de etanol a 95% (v / v) e acidificado até pH de 1,5 → lignina obtida, denominada Lig-Alk	5,5
	Oxidação de 14% H ₂ O ₂ (m / v) a um pH de 13, durante 2 h a 98 ° C → lignina obtido referido como Lig-Ox	6,2
	Acetilação de Lig-Alk sob atmosfera inerte e agitação a 28 ° C por 2 dias → lignina obtida referida como Lig-Ac	
Polpação alcalina com solução de hidróxido de sódio	Pré-tratamento com água quente na proporção 1:10 S / L, a 70-80 ° C por 2 h.	13,0

A estrutura da lignina difere dependendo do processo de isolamento. Os grupos funcionais e o peso molecular também variam entre os diferentes tipos de ligninas. Os grupos funcionais, o tipo de unidades de fenilpropano, a ligação entre as unidades estruturais e as distribuições de peso molecular dificultam a aplicação da lignina como material industrial, devido a sua complexidade estrutural (MATSUSHITA et al. 2015).

2.4 ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICAS PROMOVIDA PELAS LIGNINAS

A lignina contém também o grupo hidroxila fenólico, que a torna capaz de desempenhar atividade antioxidante. Para a caracterização da ação antioxidante dos compostos fenólicos, podem ser utilizados diferentes métodos afins de caracterizar essas moléculas.

Dentre os métodos estão: Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), o método consiste na redução do radical de coloração púrpura que absorve a 515 nm. Capacidade de sequestro do radical ABTS 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), o método baseia-se em uma reação por transferência de elétrons, no qual avalia-se a capacidade antioxidante de capturar o cátion radical ABTS. Esta captura produz um decréscimo na absorbância a 734 nm. Outro método bastante conhecido é o do fosfomolibdênio e baseia-se na redução do Mo(VI) em Mo(V) e subsequente formação do complexo fosfato de Mo(V). Essa determinação espectrofotométrica apresenta absorção máxima a 695 nm. Esse ensaio é conhecido também como atividade antioxidante total. Outros métodos também são utilizados, tais como: Captura de óxido nítrico (NO), de radicais OH

(hidroxila), poder redutor de íons ferro dentre outros. A Tabela 3 mostra diferentes resultados para as ligninas obtidas por diferentes fontes.

Tabela 3: Atividade antioxidante promovida por diferentes ligninas em diferentes ensaios.

Lignina	Ensaio	Referencias
Madeira de <i>acácia</i>	DPPH (IC ₅₀) que variaram de 79,89± 0,07 a 149,96 ± 4,4 µg/mL. Para o ensaio de ABTS obtiveram 2,70 ± 0,1 a 3,95 ± 0,13 µg/mL e por fim para AAT obtiveram valores entre (54,44 ± 3,8 a 342 ± 12,9 mmol/100 mg de amostra).	Aadil et al. (2014)
Espiga de milho	IC ₅₀ de 260 µg/mL e 28 µg/mL nos ensaios DPPH e ABTS ⁺	Michelin et al. (2018)
<i>Opuntia ficus-indica</i> e <i>Opuntia cochenillifera</i>	DPPH (12.0 ± 0.3%; 21.1 ± 0.1%), ABTS (26.8 ± 0.1%; 61.5 ± 0.9%), NO (4.7 ± 0.7%; 5.8 ± 0.2%) AAT (4.0 ± 0.0% 8.5 ± 0.0%),	Cruz- filho et al. (2019)
<i>Conocarpus erectus</i>	DPPH (IC ₅₀ = 231.16 µg/mL), ABTS (IC ₅₀ =356.03 µg/mL) e AAT (17.92 ± 0.41%).	Nascimento et al. (2020)

Radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

Radical do ácido ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) - 6-sulfônico

TAA - Atividade antioxidante total: ensaio de redução de fosfomolibdênio

Óxido nítrico

IC₅₀ (50% de capacidade de sequestro)

Além das atividades antioxidantes, diferentes ensaios biológicos têm sido realizados com as ligninas a fim de investigar suas possíveis potencialidades. A Tabela 4, mostra diferentes atividades biológicas produzidas por ligninas.

Tabela 4: Diferentes atividades biológicas produzidas por diferentes ligninas.

Ligninas	Atividade biológica	Referência
Lignossulfônico	Tratamento de diabetes	Hasegawa et al. 2017
Lignofenóis	Controle da obesidade	Norikura et al. (2010)
Ligninas	Antiviral	Vinardell et al (2017)
Ligninas	anticoagulante, anti-enfisema	Vinardell et al (2017)
<i>Opuntia ficus-indica</i> e <i>Opuntia cochenillifera</i>	Imunomodulação	Cruz- filho et al. (2019)
<i>Conocarpus erectus</i>	Imunomodulação	Nascimento et al. (2020)
Ligninas	Ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras	Vinardell et al (2017)

As diferentes atividades promovidas por essas moléculas estão relacionadas ao teor de compostos fenólicos presentes na estrutura química e a outros grupos como por exemplo as

hidroxilas alifáticas e os grupos metoxilas que estabilizam o radicam fenoxila formados durante a eliminação de radicais livres. Além destes fatores como peso molecular, presença de carboidratos na estrutura (pureza) pode influenciar o potencial das ligninas como antioxidante. Sendo a estrutura química um ponto determinante na atividade biológica.

Os estudos dos constituintes dessa planta, bem como seus mecanismos de ação terapêutica, são de grande importância. Ness sentido, este estudo visa investigar as características químicas, o efeito antioxidante e o potencial imunomodulador *in vitro* de uma lignina isolada das folhas de *Morinda citrifolia*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PLANTA

As folhas de *Morinda citrifolia* foram coletadas no município de Cabo de Santo Agostinho - PE (8°29'86,07 "S e 35°06'45,29" W). A identificação foi realizada pela pesquisadora e curadora Dr^a Marlene Barbosa e a exsicata depositada no Herbário Geraldo Mariz (UFPE), sob protocolo número 74.792.

3.2 ANÁLISE COMPOSICIONAL DE FOLHAS DE *MORINDA CITRIFOLIA*

A composição química (teores extrativos, cinzas, lignina, carboidrato não fibroso, celulose e hemicelulose) das folhas de *Morinda citrifolia* foi determinada pela metodologia descrita por Gouveia et al. (2009).

3.2.1 Determinação do teor de extrativos

Para a determinação do teor de extrativos foi realizada uma extração em um aparelho de Soxhlet, utilizando como solvente extrator o sistema tolueno: etanol 38:62 por 8 h. Ao final do processo, o sólido obtido foi seco em estufa (Tecnal, TE-393/1) a $105 \pm 2^\circ\text{C}$, até peso constante. O teor de extrativos em percentual foi calculado por diferença de massa através da Equação 1 (SLUITER et al. 2005).

$$\%Ext = \left(\frac{M_{ce} - M_{le}}{M_a} \right) * 100 \quad (1)$$

Sendo: M_{ce} = massa da amostra com extrativos (g); M_{le} = massa da amostra livre de extrativos (g); M_a = massa da amostra inicial seca (g).

3.2.2 Determinação do teor de umidade

Para a determinação da umidade, se utilizou a metodologia do peso constante. Onde 2.0 g de biomassa foram levados à estufa (Tecnal, TE-393/1), a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ e pesada em intervalos regulares de tempo, até peso constante. A umidade foi determinada pela Equação 2 (SLUITER et al. 2005).

$$\%U = \left(1 - \frac{M_{seca}}{M_{úmida}}\right) * 100 \quad (2)$$

Onde: %U= Percentual de umidade; M_{seca} =Massa seca; $M_{úmida}$ = Massa úmida.

3.2.3 Hidrólise ácida (H_2SO_4 72% v/v) as folhas de *Morinda citrifolia*

Amostras de 2 g das folhas secas (livre de extrativos), foram transferidas para um béquer de 100 mL e tratadas com 12 mL de H_2SO_4 72% (v/v), sob agitação durante 8 minutos, a uma temperatura de $45 \pm 3^\circ C$ em banho termostático (Tecnal, TE-2005). Em seguida foi adicionado 50 mL de água destilada. Transferiram-se as amostras para frascos de Erlenmeyer de 500 mL e adicionou-se 225 mL de água destilada. O sistema foi levado à autoclave durante 30 min a $121^\circ C$ (1,05 atm) e resfriados a $25^\circ C$. O material hidrolisado foi filtrado por filtração simples em papel de filtro previamente seco e pesado. O hidrolisado foi recolhido em balão volumétrico de 500 mL e o sólido (lignina insolúvel mais cinzas da lignina), o contido no papel de filtro, foi lavado com porções de 50 mL de água destilada até completar o volume do balão.

Após a separação do hidrolisado, o sólido retido no papel de filtro, foi lavado com 1500 mL de água destilada para a remoção de ânions sulfato o qual foi utilizado para a quantificação de lignina insolúvel e cinzas (GOUVEIA et al. 2009; ROCHA et al. 2011).

3.2.4 Determinação do teor de lignina solúvel

Para a determinação da lignina solúvel, uma alíquota de 5 mL do hidrolisado foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e corrigida com 1,5 mL de uma solução de NaOH 6 M para obter solução com pH 12. Completou-se o volume do balão com água destilada obtendo assim uma diluição de 1:20. Em seguida foi realizada a leitura de absorbância do hidrolisado em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 280 nm, tendo água como branco. A concentração da lignina solúvel foi obtida pelas equações 3 e 4 (ROCHA et al. 2011).

$$Con. LigS = [4,187.10^{-2}(A_{t280} - A_{pd280}) - 3,279.10^{-4}] \quad (3)$$

$$A_{pd280} = [(C_{Furf} \cdot \epsilon_{Furf}) + (C_{HMF} \cdot \epsilon_{HMF})] \quad (4)$$

Onde: A_{t280} : Absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação em 280 nm; A_{pd280} : Absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (Furfural e 5-hidroxi-metil-furfural), cujas concentrações C_{Furf} e C_{HMF} foram determinadas previamente

por CLAE; $\varepsilon_{\text{Furf}}$ e ε_{HMF} são absorptividades e valem, respectivamente, 146, 85 e 114,0 L/g.cm.

3.2.5 Determinação de carboidratos, ácido orgânicos, HMF (5-hidroxi-metil-furfural) e Furfural na fração líquida.

A identificação e quantificação dos compostos presentes no hidrolisado, obtido a partir da hidrólise com H₂SO₄ 72% (v/v), foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Agilent, série 1100), coluna Aminex HPX87H (Bio-Rad), temperatura de 60°C, fase móvel: H₂SO₄ 5 mM, fluxo de 0,6 mL/min e detector (IR) índice de refração para a identificação e quantificação dos componentes (celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético e ácido galacturônico).

A concentração de furfural e HMF foi determinada utilizando-se uma coluna de fase reversa (C-18) (Agilent Technologies), com uma fase móvel composta por uma solução de acetonitrila-água 1:8% contendo 1% de ácido acético, utilizando-se um detector de UV/Vis (274 nm) a 25°C. Foi utilizado o método padrão externo com concentrações de 0,050 a 6 g/L (SLUITER et al. 2006). As amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm antes do procedimento analítico. Para a determinação da quantidade final dos polissacarídeos (celulose (C), hemicelulose (H) e pectinas (P)), utilizou uma correção através dos fatores de conversão (ROCHA, 2000; SLUITER et al. (2008) encontrados na Tabela 5.

Tabela 5-Fatores de conversão dos componentes precursores de Celulose, Hemicelulose e carboidratos não fibrosos.

Componentes	Fator de Conversão
Celobiose (C)	0,95
Glicose (C)	0,90
Xilose (H)	0,88
Arabinose (H)	0,88
Ácido galacturônico (P)	0,91
Ácido Acético (H)	0,72
Ácido Fórmico (C)	3,52
Furfural (H)	1,37
Hidroximetilfurfural (C)	1,29

3.2.6 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido, teor de cinzas de lignina e cinzas totais

O material insolúvel retido no papel de filtro, proveniente da etapa de hidrólise ácida, após lavagem com 1500 mL de água destilada, foi seco em estufa (Tecnal, TE-393/1) a 105 ± 2°C até massa constante. Para determinação do teor de cinzas totais (em triplicata), foram

pesados aproximadamente 2 g de cladódio seco em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados. Posteriormente, as amostras foram calcinadas a 300°C por aproximadamente 1 h e em seguida, a 800°C por 2 h. Ao final do processo, os cadinhos, contendo as cinzas, foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas, presente na lignina insolúvel (Equação 5), foi quantificada em balança analítica (Ohaus, PA214CP) (GOUVEIA et al., 2009; ROCHA et al. 2011).

$$\text{Cinzas I (g)} = M_{cc} - M_{cd} \quad (5)$$

Sendo: M_{cc} : Massa de cinzas + o cadinho; M_{cd} : Massa do cadinho tarado.

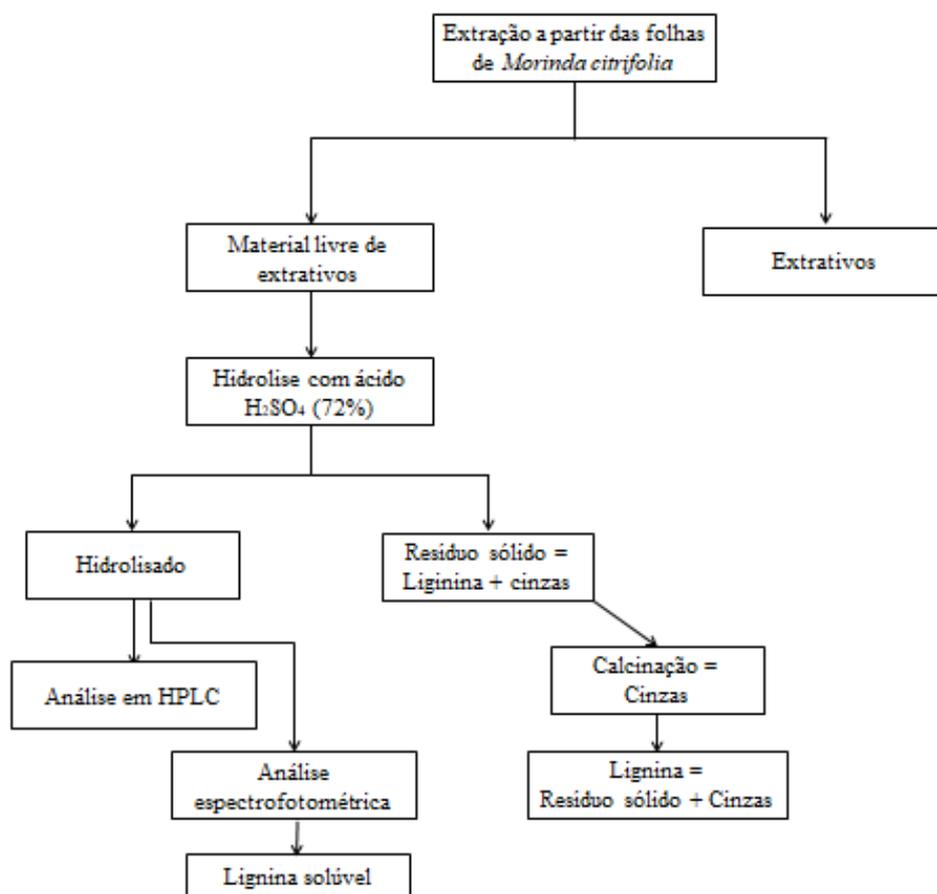
A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada pela equação em relação à biomassa seca, subtraindo-se a massa de cinzas presente na lignina (GOUVEIA et al. 2009; ROCHA et al. 2011). O teor de lignina insolúvel em meio ácido é dado pela equação 6:

$$\text{LigI (\%)} = \left[\frac{M_{pr} - (M_c + M_{fp})}{M_a} \right] \cdot 100\% \quad (6)$$

Sendo: LigI (%) = Porcentagem de lignina insolúvel; M_{pr} = Massa do papel de filtro com os resíduos sólidos + cinzas; M_c = Massa de cinzas insolúveis em meio ácido; M_{fp} = Massa do papel de filtro; M_a = Massa da amostra inicial seca.

A figura 5 mostra um fluxograma discriminando detalhadamente as etapas desde a extração das folhas com solvente orgânico até a obtenção da lignina de *Morinda citrifolia*.

Figura 5- Fluxograma das etapas realizadas para a obtenção da lignina de *Morinda citrifolia*.



Fonte: O autor (2020)

3.3 OBTENÇÃO DAS LIGNINAS

As folhas de *Morinda citrifolia* (100 g) foram submetidas à metodologia de extração de acordo com Cruz-Filho et al. (2019). Inicialmente, foi realizada extração aquosa, nas proporções (g/L) 1:1, em um tanque agitado de 2 L, a 60°C e 1200 rpm, por 1 h. O sólido obtido na etapa de extração foi submetido a hidrólise ácida com 1% de H₃PO₄ em autoclave a 121 ° C por 1 h, proporção 1:1 sólido: líquido (g / L). O hidrolisado ácido é separado por filtração e o sólido resultante do material foi então sujeito a deslignificação alcalina com NaOH a 1%, nas mesmas condições da hidrólise ácida. Após o final da reação, o licor preto contendo as ligninas foi separado do sólido resultante por filtração e logo após foi acidificado com H₂SO₄ até pH 2 por 12 h para a precipitação das ligninas. Finalmente, as ligninas obtidas foram secas a 70°C por 48 h.

3.4 ACETILAÇÃO DE LIGNINAS

A acetilação foi realizada de acordo com o procedimento descrito Nascimento Santos et al. (2020). Cerca de 50 mg de lignina foram dissolvidos em 5 mL de piridina e 5 mL de anidrido acético. A mistura foi borbulhada durante 15 min com azoto e o balão selado. O sistema foi deixado à temperatura ambiente no escuro por 50 h. No final da reação, o excesso de anidrido acético foi removido pela adição de 4 mL de metanol. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, com a ajuda da formação de um azeótropo com tolueno e etanol. Finalmente, as amostras foram completamente secas por três dias sob vácuo.

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LIGNINAS EM FOLHAS DE *MORINDA CITRIFOLIA*

As análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) de ligninas (20 mg) foram realizadas em um espectrômetro Bruker modelo Tensor 27, utilizando o acessório de refletância total atenuado (Platinum ATR). Os espectros foram registrados na faixa espectral de 4000 a 500 cm^{-1} , com uma resolução de 2 cm^{-1} e 20 varreduras.

Para análise da espectroscopia UV-Vis, a metodologia de Rocha et al. (2014) com modificações. Foi preparada uma solução de 0,1 g / L em NaOH 0,01 mol / L. A partir desta solução, foram realizadas diluições de 0,01 a 0,5 g / L, as quais foram utilizadas para obter uma curva analítica a 280 nm. A solução contendo 0,15 g / L de lignina foi utilizada para obter os espectros, espalhando-se entre 250 e 400 nm em um espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453). Os espaços em branco das análises foram realizados com solução de NaOH 0,01 mol / L.

As ligninas acetiladas (20 mg) foram dissolvidas em CDCl_3 e submetidas a ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C em um espectrômetro Bruker Avance 300 operando na frequência de 400 MHz, com uma sonda de 5 mm.

A análise térmica (TGA) foi realizada em um analisador termogravimétrico (SHIMADZU TGA-50) com vazão de 10,0°C/min acima da faixa de temperatura de 40 a 650°C para verificar a estabilidade térmica da lignina.

A distribuição da massa molecular foi determinada de acordo com Rocha et al. (2014) e Nascimento-Santos et al. (2020) utilizando um sistema de cromatografia com uma coluna de 57 X 1,8 cm preenchida com uma suspensão de Sephadex G-50 em NaOH 0,5 M. A fase móvel utilizada foi NaOH 0,5 M em um fluxo de 0,4 mL/min. Recolheram-se fracções de 4

mL e a absorvância de cada fracção foi lida a 280 nm. O volume da amostra injetada foi de 0,4 mL e sua concentração foi de 2,0 mg/mL. A coluna cromatográfica foi previamente calibrada com proteínas de peso molecular conhecido (albumina de 66000 Da; anidrase carbônica de 29000 Da; citocromo C de 12400 Da e aprotinina de 6500 Da). O volume médio de eluição das proteínas foi transformado em um valor, independentemente do tamanho da coluna (Kd), além dos valores de peso molecular médio numérico (Mn), peso molecular médio ponderado (Mw) e Mw/Mn (dispersibilidade). A equação da linha para a determinação dos valores de peso molar é dada por $\text{LogM} = -2,0198\text{kd} + 4,75$ tendo $R^2 = 0,9887$. Onde, LogM é o logaritmo da massa proteica em Dalton.

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR TOTAL DE FENOL DAS LIGNINAS NAS FOLHAS DE *MORINDA CITRIFOLIA*.

A capacidade antioxidante das ligninas em diferentes concentrações (0-500 µg/L) foi determinada pela metodologia Cruz-Filho et al. (2019) e Nascimento- Santos et al. (2020). O ácido ascórbico foi utilizado como padrão. Os seguintes métodos foram empregados na determinação da atividade antioxidante in vitro:

- a) Ensaio de redução de radicais DPPH· (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), é um método que consiste na redução do radical DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) de coloração púrpura de absorvância a 515 nm, estando estável em solução alcoólica no que diz respeito a presença de antioxidantes doadores de hidrogênio. O DPPH, ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, modifica sua coloração de violeta para violeta claro com indícios amarelados, ficando estável e com o desaparecimento da absorção que pode ser avaliada pelo decréscimo da absorvância. A ação antioxidante é expressa em % e pela quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%, chamada de IC50. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC50 e maior a sua atividade antioxidante. A diminuição da medição foi analisada em um espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) a 515 nm. Foram adicionados 0,32 mL de amostras em estudo a 2,0 mL do reagente DPPH·. O espaço em branco das leituras foi etanol.
- b) Capacidade de sequestro do radical ABTS•+ 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico): O método ABTS•+ 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) fundamenta-se em uma reação por transferência de elétrons, no qual avalia-se a capacidade antioxidante de capturar o cátion radical ABTS•+ . Esta captura produz um decréscimo na absorvância a 734 nm. O decréscimo produzido pelo Trolox (análogo hidrossolúvel da

vitamina E) é comparado ao produzido pelos antioxidantes a serem analisados. A curva gerada pela inibição da absorvância é calculada, sendo que os resultados são intercalados na curva de calibração e expressos em atividade antioxidante equivalente a 1 mM de trolox. O radical ABTS é produzido quimicamente com o persulfato de potássio (RE et al., 1999; RUFINO et al, 2007). Neste teste, a solução ABTS+ foi diluída com álcool etílico até uma absorvância de 0,7 e lida em um espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453). a 734 nm. A atividade foi avaliada utilizando 30 µL de amostra para 3 mL da solução ABTS+, a atividade foi avaliada após 6 minutos de reação e o branco da reação foi composto de etanol.

c) Atividade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio, é um outro método, que se baseia na redução do molibdênio (VI) ao molibdênio (V) ocorrida na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido. Neste 1 mL da solução de fosfomolibdênio foram misturados com 0,1 mL das diferentes concentrações de lignina. Estas misturas foram incubadas em água a 95°C durante 90 minutos e em seguida foram resfriadas até temperatura ambiente. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL de água). Uma curva padrão com ácido ascórbico (0 - 1000 µg/mL) foi realizada para obter a equação $Y = 0,006x + 0,143$, $R^2 = 0,9977$. Os ensaios foram realizados em triplicata.

d) Para o teste de eliminação de radicais de óxido nítrico, método que é baseado na formação de coloração róseo-avermelhada pelo tratamento de uma amostra contendo nitrito com o reagente de Griess. Neste ensaio, o ácido sulfanílico é convertido pelo nitrito a um sal diazônio sob condições ácidas, o qual se complexa instantaneamente com a N-(1-naftil)-etilenediamina formando um produto azo altamente colorido (coloração róseo-avermelhada). As ligninas foram diluídas em concentrações e submetidas à análise de nitrito pelo método colorimétrico de Griess. A concentração de NO foi estimada usando uma curva padrão (3,12 - 400,0 µM) a 595 nm, leitura em um espectrofotômetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GoW / Curvette, Waltham).

e) O poder redutor também foi avaliado de acordo com o procedimento descrito por Aadil et al. (2014), com adaptações. A técnica de redução do ferro (redução do Fe³⁺) é frequentemente usada como um indicador de atividade de doação de elétron, o qual é um importante mecanismo de ação de antioxidantes fenólicos e pode ser fortemente associada com outras propriedades antioxidantes (DORMAN et al., 2003). Neste método, a coloração amarela da solução teste muda para várias tonalidades de verde e azul, a depender do poder de redução de cada composto. A presença de redutores (antioxidantes) ocasiona a redução do

complexo Fe^{3+} /ferrocianeto para a forma ferrosa (Fe^{2+}). Alíquotas de 0,01 mL de ligninas, em diferentes concentrações, foram diluídas em 1 mL de etanol absoluto e transferidas para um tubo de ensaio contendo 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,6 e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1% (m/v). A mistura foi incubada em banho-maria a 45°C por 20 min. Alíquotas de 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) foram adicionadas ao tubo de ensaio, com agitação subsequente. Alíquotas de 2,5 mL da mistura foram transferidas para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl_3 a 0,1% (p/v), com agitação subsequente. A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm em um espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453).

f) A porcentagem de eliminação de radicais hidroxila foi determinada diminuindo a absorbância a 230 nm de uma solução de peróxido de hidrogênio na presença de uma amostra, em comparação com um branco. Assim, os testes mostraram 400 μL de ligninas e 4,6 mL de uma solução 10 mM de H_2O_2 preparada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). A mistura foi incubada no escuro por 30 minutos, a 25°C. O branco foi formado usando 400 μL de água destilada. O controle foi realizado usando 400 μL de água ultrapura e 4,6 mL da solução de H_2O_2 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). As amostras foram analisadas em quadruplicado com a porcentagem de sequestro de H_2O_2 .

g) O conteúdo de fenóis totais foi determinado pelo método descrito por Cruz-Filho et al. (2019) com poucas modificações. O reagente ativo consiste de uma solução ácida amarela contendo um complexo polimérico de íons formados pelos heteropoliácidos fosfomolibídico e fosfotúngstico. Este reagente oxida os fenolatos e assim os heteropoliácidos tornam-se parcialmente reduzidos do estado de valência +6 a uma mistura de +6 e +5, resultando na produção do complexo azul molibdênio-tungstênio (SINGLETON; ROSSI, 1965). Esta reação tem uma alta absorvidade próxima a 750nm. Normalmente os fenólicos determinados por este método são expressos em equivalente de ácido gálico (mg GAE/g lignina) (ROGINSKY; LISSI, 2005). Um total de 2,0 mL de solução de Folin (1:10 v/v) foi adicionado a 4,0 mL de lignina (1 mg/mL). Após a incubação, os ensaios foram protegidos da luz por 3 min e 1,6 mL de Na_2CO_3 (7,5%) foram adicionados. Em seguida, os sistemas foram novamente incubados e protegidos da luz a 25°C por 120 min. Após o tempo de incubação, eles foram analisados em um espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) a 765 nm. Água destilada foi usada como solução em branco. Uma curva de analítica foi construída em função da concentração de ácido gálico (0 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e apresentou a seguinte equação $Y = 0,0051x + 0,0028$, $R^2 = 0,9973$.

3.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 (105 células/mL) foram semeados em placas de 96 pontos, com meio RPMI completo em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24h. Posteriormente, foram utilizados os compostos em diferentes filtros (0,19; 1,56; 6,25; 25; 100 µg/mL), sendo novamente incubados durante 48h. Cada composto foi testado em duplicata. Após esse período, foi adicionado MTT (5 mg/mL em PBS), seguido de nova incubação por 2h. Foi adicionado DMSO para a dissolução de cristais de formazan e a absorbância foi obtida a 570 nm. O controle negativo da reação foi obtido em poços contendo apenas meio de cultura e células (sem tratamento). Também foi avaliada a atividade da droga de referência benzonidazol. A partir dos valores de inibição da cultura, foi usada a CC50.

Nos sobrenadantes de culturas de macrófagos, foram determinados o teor de óxido nítrico em todas as concentrações em estudo. A análise de nitrito pelo método colorimétrico de Griess (DING et al., 1988). A concentração de óxido nítrico foi estimada usando uma curva padrão (3,12-100 µmol/ mL). A leitura foi realizada num espectrofotômetro (Bio-Rad 3550, Hercules, CA) a 595 nm.

3.8 ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA

A obtenção dos esplenócitos foi realizado de acordo com Melo et al. (2011). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (nº 1.870.360/2016; CAAE 62119716.5.0000.5208). Os camundongos foram anestesiados com 10mg/Kg de xilazina e 115mg/Kg de quetamina, depois foi feito o deslocamento cervical e remoção asséptica dos baços. O baço do camundongo foi colocado num tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Em uma câmara de fluxo laminar, cada baço foi macerado em um douncer. As suspensões celulares obtidas a partir de cada baço foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 ml de meio completo. Os homogenatos de baço foram sobrepostos numa camada de Ficoll-Paque TM PLUS, com a densidade ajustada para 1,077 g/mL e centrifugadas a 2500x g à temperatura ambiente durante 25 min. A camada celular de interface contendo células imunes foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e centrifugada duas vezes a 500 x g durante 10 min para obtenção do pellet. As células foram contadas numa câmara de Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do azul de tripan. As células foram usadas apenas quando a viabilidade foi > 98%.

Os ensaios de imunofenotipagem de linfócitos e monócitos foram realizados de acordo com Nascimento et al. (2020). Após 24 h de tratamento com lignina (10 µg/mL), as células foram removidas das placas utilizando PBS gelado e transferidas para tubos de polipropileno (BD Biosciences) com 6 mL de PBS para centrifugação (400 × g, 10 min). Após descartar o sobrenadante, as células foram lavadas com 2 mL de PBS e centrifugadas (400 x g, 10 min). O sobrenadante foi descartado e os anticorpos monoclonais de superfície foram adicionados aos tubos e incubados por 30 min. Em seguida, duas etapas de lavagem foram realizadas com 1 mL de PBS seguido de centrifugação (400 × g, 5 min). Os sobrenadantes foram descartados e as células foram fixadas por 15 min com 150 mL de solução Cytotfix (BD Biosciences) e depois lavadas com 2 mL de PBS seguido de centrifugação (400 x g, 5 min). Após o descarte do sobrenadante, 300 µL de PBS foram adicionados a cada tubo e 10.000 eventos foram adquiridos na plataforma FACS Calibur e os resultados foram analisados usando o Flowing Software versão 2.5.1. O controle positivo correspondeu às células tratadas com Con A (5 µg/mL) e o controle negativo às células tratadas com 1% de DMSO. Os anticorpos monoclonais utilizados foram anti-CD4-PerCP, anti-CD8-FITC, anti-CD-28-PE, anti-CTLA-4-APC, anti-CD14-FITC, anti-CD80-PE, anti-CD-86 -APC e anti-HLA-DR-PerCP (BD Biosciences). O experimento foi realizado seis vezes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LIGNINAS EM FOLHAS DE *MORINDA CITRIFOLIA*

As folhas de *Morinda citrifolia* apresentaram lignina ($14,5 \pm 1,0\%$), carboidratos ($58,2 \pm 1,3\%$), extratos ($15,0 \pm 0,1\%$) e cinzas ($10,0 \pm 1,1\%$).

A espectroscopia na região do infravermelho ($4000-400 \text{ cm}^{-1}$) é uma técnica utilizada para a caracterização de ligninas e seus derivados (BAI et al. 2019). Esta é amplamente usada como ferramenta para se entender a estrutura das ligninas isoladas, além de fornecer informações sobre grupos funcionais presentes na estrutura. As bandas características de estruturas aromáticas podem ser observadas em um espectro típico de lignina, embora suas frequências possam ser alteradas e suas intensidades relativas significativamente diferentes quando se tem uma variação da espécie ou do método de extração (BAI et al. 2019; NASCIMENTO et al. 2020).

A Figura 6 mostra o espectro de FTIR e a Tabela 6 mostra as atribuições de bandas para lignina obtidas a partir de folhas de *Morinda citrifolia*. O espectro de FTIR da lignina foi analisado de acordo com os dados obtidos por Shi et al. (2019), Bai et al. (2019) e Nascimento et al. (2020). Observou-se que esta lignina possuía as seguintes bandas 1629 cm^{-1} , 1241 cm^{-1} e 822 cm^{-1} , portanto, pode ser classificada como guaiacila-siringila-p-hidroxifenila (G-S-H).

Figura 6- Espectro de FTIR para as ligninas das folhas de *Morinda citrifolia*.

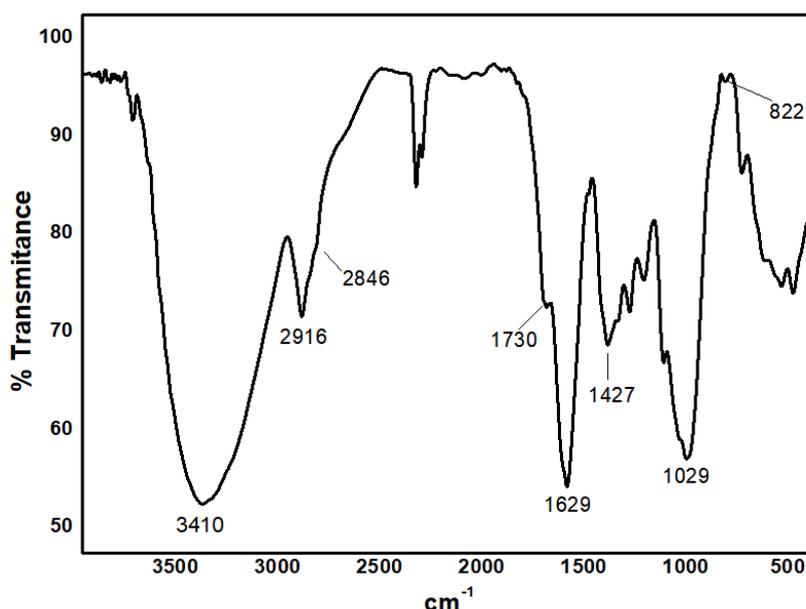


Tabela 6- Atribuições de bandas de espectros de absorção no infravermelho, características da lignina das folhas de *Morinda citrifolia*.

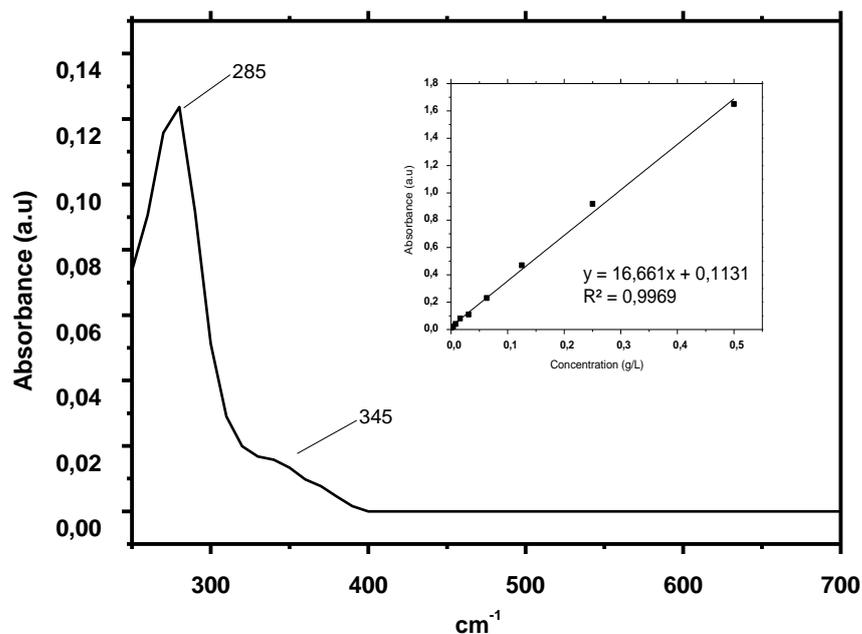
Band (cm ⁻¹)	Vibration	Attribution
3410	st O-H	OH fenólico + OH alifático
2916	st C-H	CH ₃ -CH ₂
2846	st C-H	CH ₃ -CH ₂
1730	st C=O	C = O cetonas não conjugadas
1629	st C=O	C = O cetonas conjugadas (S)
1427	δ _{assimétrico} C-H	CH ₃ -CH ₂
1311	δ _{assimétrico} C-H	CH ₃
1241	st C=O	(G)
1141	st C=O	C = O em ésteres conjugados com GSH
1165	δ _{op} Ar C-H	(S)
1029	δ _{ip} Ar C-H	G > S
822	δ _{op} Ar C-H	(H)

st: estiramento; δ_{ip}: vibração de deformação no plano; δ_{op}: fora do plano de deformação da vibração

H = p-hidroxifenila, G = guaiacila S = Siringila.

A espectroscopia UV/Vis é muito conveniente para análise de lignina devido à sua natureza aromática. A Figura 7 mostra o espectrograma da amostra de lignina diluída em hidróxido de sódio.

Figura 7- Espectro UV / Vis para as ligninas das folhas de *Morinda citrifolia*.



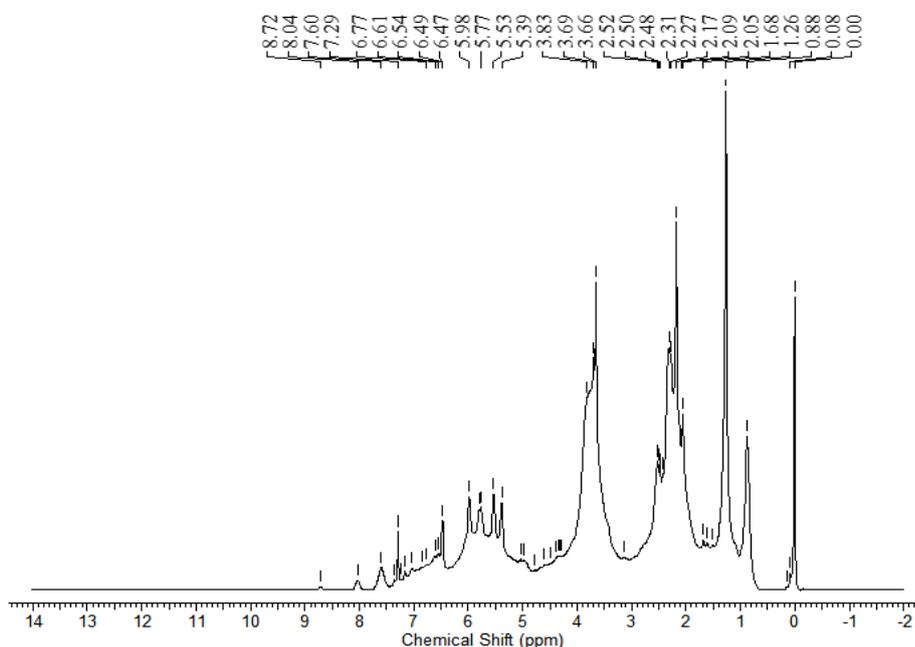
O espectro Uv/Vis obtido é típico das ligninas (LAWTHER et al. 1996; OLIVEIRA et al. 2009; e NASCIMENTO SANTOS et al. (2020)). A presença de um comprimento de onda é observada no máximo na região de 250 - 350 nm. A absorção atribuída nessa região está

relacionada à presença de grupos cromóforos de compostos fenólicos conjugados e não conjugados. Além disso, a absorvância máxima ocorrendo a 285 nm, confirma, como no FTIR, que maior número de unidades do tipo guaiacila (banda a 1029 cm^{-1}), uma vez que os grupos de seringas teriam a banda mais próxima de 270 nm. Finalmente, o espectro apresenta uma segunda banda de menor intensidade a 345 nm, associada a grupos cromóforos de ácidos ferúlicos e p-cumarílicos, confirmando novamente que essas ligninas são do tipo guaiacila-siringila-p-hidroxifenila (GSH).

Além disso, essas ligninas apresentaram capacidade de absorção em torno de 6,66 L/g.cm, outros autores também estudaram a capacidade de absorção encontrada valores próximos para diferentes ligninas. Para as ligninas obtidas por hidrólise alcalina da palha de trigo, obtiveram 21 L/g.cm (LAWTHER et al. 1996) e as ligninas ácidas obtidas do caule da banana apresentaram 18 L/g.cm (OLIVEIRA et al. 2009). Essas diferenças podem estar associadas ao grau de condensação e substituição dessas ligninas.

A espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C fornece informações sobre os principais componentes presentes em diferentes regiões específicas, bem como sua dinâmica molecular. O espectro de RMN de ^1H da lignina acetilada de *Morinda citrifolia* foi mostrado na Figura 8 e na Tabela 7 a porcentagem dos grupos presentes na lignina. Os resultados foram comparados com os encontrados na literatura, de acordo com Jahan et al., (2012), Namane et al. (2015) e Nascimento et al. (2020).

Figura 8- Espectro de ^1H RMN de lignina acetilada de *Morinda citrifolia* deixa solubilizada em CDCl_3 .



A faixa de 8,0-11,5 ppm representa as ligações de ácidos carboxílicos e aldeídos. A região 6,28 - 8,0 ppm é atribuída a aromáticos e vinílicos. A 5,74 - 6,28 ppm, há a presença de β -vinis e benzilos: a 5,18 - 5,74 ppm a região benzil das ligninas. A região de 2,50 a 5,18 ppm é atribuída à presença de grupos metoxi e a muitos outros hidrogênios ligados à cadeia C_3 que podem ser α , β e γ . Nas regiões de 2,10 - 2,50 ppm e de 1,58 - 2,10, grupos acetoxi aromáticos são atribuídos. Finalmente, o intervalo de 0,38 - 1,53 é atribuído aos grupos alifáticos.

Tabela 7- Distribuição relativa (%) das áreas de sinal nas regiões de deslocamento químico

Atribuição	Faixa	Área absoluta	Fração em área	%relativa
Região alifática não oxigenada	1.7 - 0.6	265182	0,11	11,5
Região hidroxila alifática	2.2 -1.7	80573	0,03	3,5
Região hidroxila fenólica	2.5 -2.2	95663	0,04	4,1
Região alifática	3.3 -2.5	257837	0,11	11,1
Metoxilo	4.0 - 3.3	572136	0,25	24,7
Região alifática	5.2 - 4.1	241414	0,10	10,4
Região benzílica cíclica	5.7 - 5.2	75288	0,03	3,3
Região benzílica não cíclica	6.2 - 5.7	85603	0,04	3,7
Região aromática	8.1 - 6.2	442742	0,19	19,1
Ácidos carboxílicos e aldeídos	10.0 - 8.1	222292	0,10	9,6
CDL3	7.3 -7.2	24001		
Total		2314729		

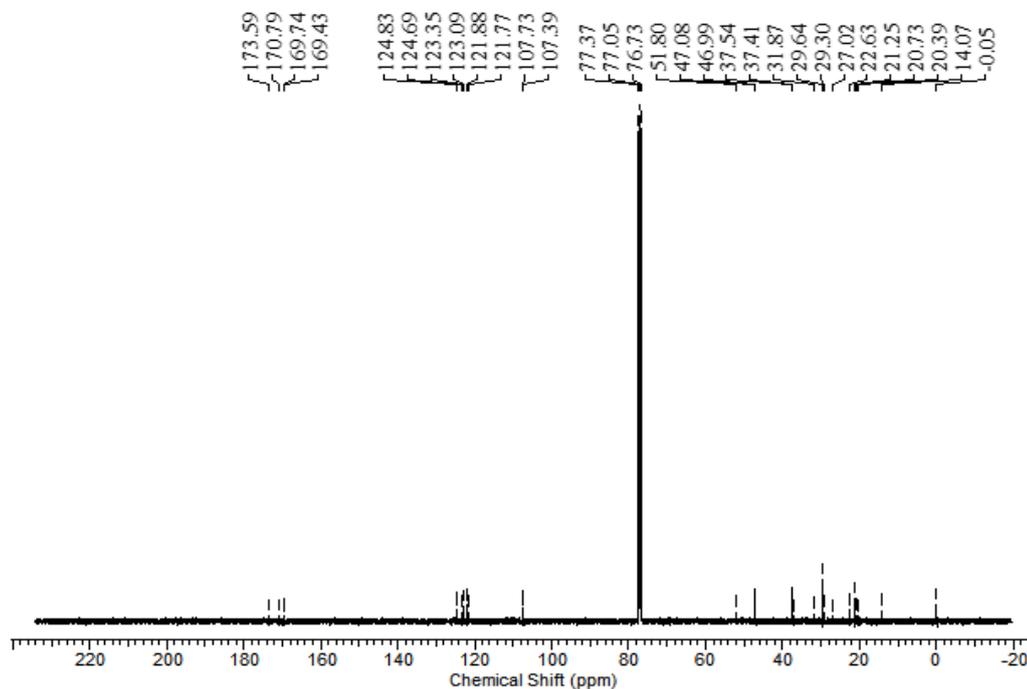
(ppm) dos espectros de RMN de 1H de *Morinda citrifolia* lignina.

O espectro ^{13}C RMN da lignina acetilada de *Morinda citrifolia* foi mostrado na Figura 9. Os resultados foram comparados com os encontrados na literatura, de acordo com Rutkowska et al (2008) e Namane et al. (2015) Cruz-Filho et al. (2019) e Nascimento et al. (2020).

Os sinais para os grupos γ -metil, α e β -metileno das cadeias laterais n-propil da lignina aparecem no espectro entre 13-40 ppm. A 20,3-31,8 ppm ($-CH_3$ e CH_2) podem ser atribuídos a grupos metil terminais, grupos metileno de anéis alifáticos e grupos metileno em longas cadeias alquílicas. A região de 46-53 ppm é atribuída a $C-\beta$ em unidades $\beta-\beta$ e $C-\beta$ em unidades $\beta-5$. Os grupos metoxilas ($-OCH_3$) em unidades do tipo siringil (S) e guaiacil (G) são atribuídos em torno de 56,1 ppm. Os sinais entre 76 e 78 ppm referem-se ao solvente $CDCl_3$. A região de 106-107 ppm é atribuída a $C-2 / C-6$ em siringil com $\alpha-CO$. Na região de 120-125 ppm, os sinais são atribuídos aos grupos éter β -aril eterificado (forma eritro); $C_6 G-CH$ (OAc) - éter β -aril e C_5 unidades guaiacil acet. ($Ca-OAc$ e $-OR$); $C\beta$ em unidades

acetguaiacilo. Finalmente, a região entre 169-173 ppm é atribuída ao CO em acetil aromático; CO no acetil alifático secundário e CO no acetil alifático primário.

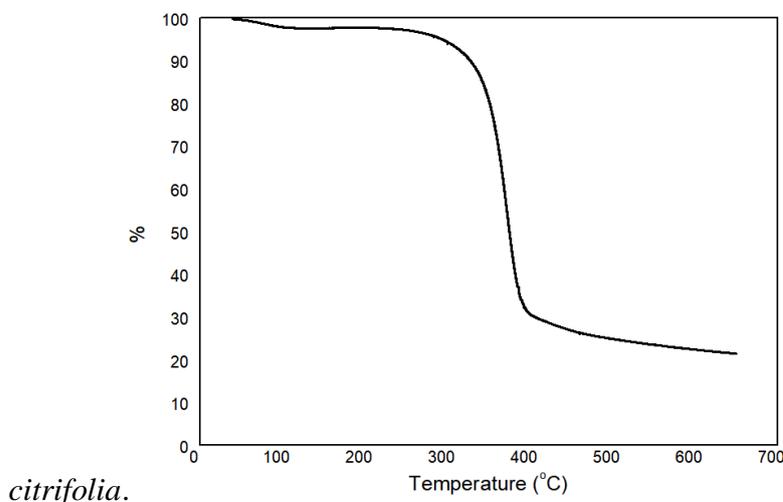
Figura 9- Espectro de ^{13}C RMN de lignina acetilada de *Morinda citrifolia* folhas solubilizadas em CDCl_3 .



A lignina se decompõe termicamente ao longo de um amplo intervalo de temperatura, porque vários grupos funcionais possuem diferentes estabilidades térmicas e levam a quebra de ligações a temperaturas diferentes. A clivagem de grupos funcionais gera produtos de baixa massa molecular, enquanto a estrutura fenilpropânica degrada em temperaturas mais elevadas, gerando uma redução maior na massa molar e a liberação de produtos voláteis. [BREBU, M.; VASILE, C., 2010].

A Figura 10 mostra o perfil de degradação térmica (termograma) das amostras de ligninas das folhas de *Morinda citrifolia* obtidas a partir da análise termogravimétrica (TG).

Figura 10- Estabilidade térmica da lignina das folhas de *Morinda*



A degradação das amostras de lignina pode ser dividida em três estágios. Na primeira etapa, ocorreu perda de peso entre 40 e 120° C devido à evaporação da água (perda de 3,5%). O segundo estágio ocorreu em torno de 120-400°C (perda de 69,34%), promovendo a quebra das ligações alfa e beta aril-alquil-éter, além de separar as cadeias alifáticas ligadas aos anéis aromáticos. Finalmente, em temperaturas acima de 400-650°C (perda de 78,53%), os principais componentes das ligninas são degradados, incluindo fenólicos, álcoois, ácidos aldeídos.

Watkins et al. (2015) estudando ligninas isoladas de diferentes biomassas (palha de trigo, palha de pinheiro, fibra de alfa e fibra de linho) e por Wang et al. (2019) apresentando ligninas derivadas de resíduos de espiga de milho. Poletto, (2017) avaliando o comportamento térmico de ligninas de espécies de madeira macia e madeira dura também constatou que as ligninas se degradaram em três estágios. No entanto, a lignina deste estudo apresentou maior estabilidade térmica (400°C), quando comparada às ligninas obtidas por Watkins et al. (2015), onde apresentaram temperatura de degradação em torno de 350°C e por Wang et al. (2019) que obtiveram degradação na faixa de 413-422°C. Ao final do processo o rendimento de carbono inorgânico isto é cinzas de lignina foi entorno de 20%.

A lignina deste estudo pode ser classificada como baixo peso molecular, ou seja, está na região de peso entre 490 a 2.600 Da (ALVAREZ-VASCO et al. 2016). Isso apresentou um peso molecular médio (Mw) de 2995 Da, um peso molecular médio numérico (Mn) de 1762 Da e valores de polidispersividade de 1,7. Esses resultados são semelhantes aos da lignina extraída por deslignificação alcalina de *Conocarpus erectus*, que possuía um peso molecular

médio de 2709 Da, um peso molecular médio numérico de 1279 Da e valores de polidispersividade de 2,1. O baixo valor de polidispersividade indica que a maioria dos fragmentos de lignina tem um peso molecular semelhante (ROCHA, et al. 2014; NASCIMENTO et al. 2020).

4.2 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE LIGNINA DE *MORINDA CITRIFOLIA*

O teor de compostos fenólicos ($183,3 \pm 2,7$) foi determinado para a lignina em estudo em termos de equivalentes de ácido gálico por grama (mgEAG/g). Aadil et al. (2014) caracterizando nove frações diferentes de lignina extraídas pelos métodos alcalino, água quente e *organossolv* do pó de madeira de *acácia* obtiveram variação de fenóis totais entre $73,01 \pm 3,2$ a $393,30 \pm 9,2$ mg GAE/g. Michelin et al. (2018) obtiveram para as ligninas da espiga de milho teor de compostos fenólicos de até 25,6 mg de GAE/g. Cruz- Filho et al. (2019) relataram valores bem abaixo para ligninas dos cladódios de pera espinhosa das espécies de *Opuntia ficus-indica* (36.4 ± 0.4 mgEAG/g) e *Opuntia cochenillifera* (87.8 ± 6.5 mgEAG/g) obtidas por deslignificação alcalina. Nascimento et al. (2020), obtiveram valores de 465.90 ± 1.07 mg GAE/g para as ligninas de *Conocarpus erectus* também obtidas por deslignificação alcalina. Essa diferença no conteúdo fenólico pode estar associada ao método de extração da lignina, obtendo uma lignina com maior ou menor teor de grupos hidroxila fenólicos (AADIL et al. 2014). Sendo assim, esses grupos são descritos como os principais responsáveis por sua atividade antioxidante (MICHELIN et al. 2018).

Na Tabela 8 são apresentados os resultados da atividade antioxidante. Os realizados com estudo em linha foram: capacidade de eliminar os radicais ABTS, DPPH, H_2O_2 e NO, além da capacidade de reduzir os íons férricos (Fe^{3+}) e o fosfomolibdênio (Mo (VI) em Mo (V)).

Tabela 8- Atividade antioxidante das ligninas nas folhas de *Morinda citrifolia*

Sample	NO		ABTS	TAA	DPPH
	IC ₅₀ (µg/mL)	% (0.5 mg/mL)	% (0.5 mg/mL)	% (0.5 mg/mL)	% (0.5 mg/mL)
Lignin	75.06	67,76 ± 0.5	32,4 ± 0.1	27,1 ± 0,3	21,5 ± 0,1,03
Ascorbic acid	240.30	95.42 ± 0.8	91.97	100	79,11 ± 0.33

Radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

Radical do ácido ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) - 6-sulfônico

TAA - Atividade antioxidante total: ensaio de redução de fosfomolibdênio

Óxido nítrico

IC₅₀ (50% de capacidade de sequestro)

Os resultados mostraram que as ligninas apresentaram baixa atividade antioxidante, quando comparadas ao padrão de ácido ascórbico, para os testes de atividade do ABTS, DPPH e fosfomolibdênio (atividade antioxidante total). Também foi observado que essas moléculas apresentaram resultados promissores para a captura de radicais NO, apresentando IC₅₀ (capacidade de sequestro de 50%) superior a 75,06 µg /mL de ácido ascórbico. Para os testes de captura de H₂O₂ e redução de íons férricos, as ligninas não mostraram atividade.

Diferentes estudos têm sido realizados a fim de avaliar a atividade antioxidante de diferentes ligninas. Aadil et al. (2014) obtiveram valores de atividade antioxidante para os ensaios de DPPH (IC₅₀) que variaram de 79,89 ± 0.07 a 149,96 ± 4,4 µg/mL. Para o ensaio de ABTS obtiveram 2,70 ± 0,1 a 3.95 ± 0,13 µg/mL e por fim para AAT obtiveram valores entre (54,44 ± 3,8 a 342 ± 12,9 mmol/100 mg de amostra). Michelin et al. (2018) obtiveram IC₅₀ de 260 µg/mL e 28 µg/mL nos ensaios DPPH e ABTS⁺ respectivamente.

Cruz- filho et al. (2019), obtiveram valores de atividade antioxidante para os ensaios de DPPH (12.0 ± 0.3%; 21.1 ± 0.1%), ABTS (26.8 ± 0.1%; 61.5 ± 0.9%), NO (4.7 ± 0.7%; 5.8 ± 0.2%) e AAT (4.0 ± 0.0% 8.5 ± 0.0%), respectivamente. Nascimento et al. (2020) obtiveram valores de atividade antioxidante mais alto, quando comparado ao nosso estudo as ligninas deste trabalho DPPH (IC₅₀= 231.16 µg/mL), ABTS (IC₅₀=356.03 µg/mL) e AAT (17.92 ± 0.41%).

A diferença entre os resultados está relacionada não apenas ao teor de compostos fenólicos na estrutura química, entretanto existem outros grupos que contribuem para essa atividade como por exemplo as hidroxilas alifáticas e os grupos metoxilas que estabilizam o radical fenoxila formados durante a eliminação de radicais livres. Em contrapartida os grupos carbonil conjugado na cadeia lateral tem um efeito negativo na atividade antioxidante. Além

destes fatores como peso molecular, presença de carboidratos na estrutura (pureza) pode influenciar o potencial das ligninas como antioxidante.

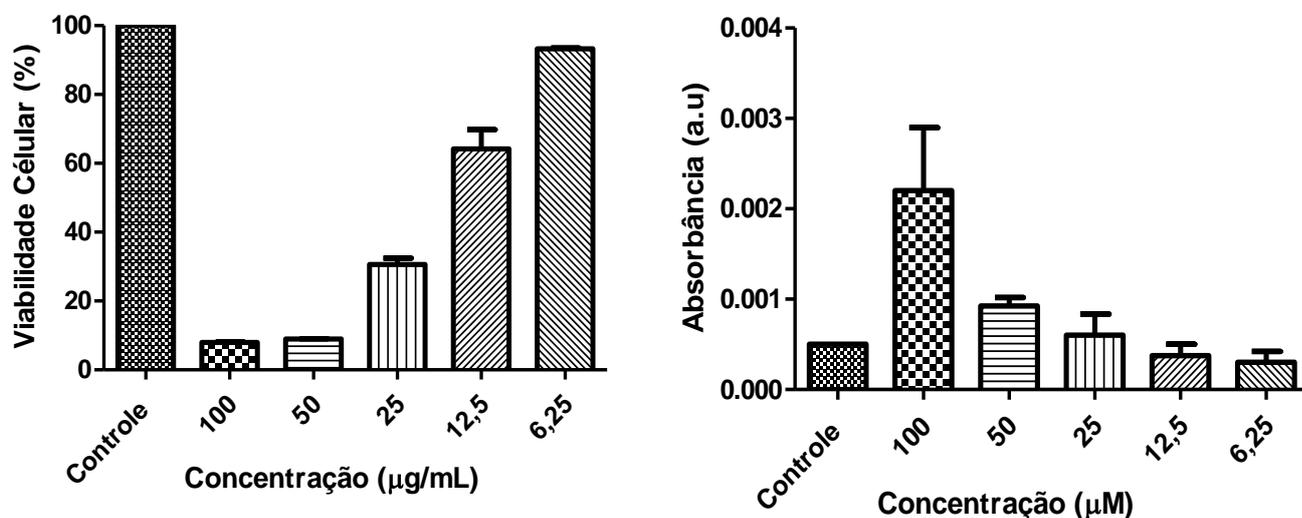
4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS LIGNINAS: CITOTOXICIDADE, DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA

As aplicações potenciais de ligninas nas indústrias cosmética e farmacêutica exigem que elas sejam atóxicas. A irritação potencial da pele por um ingrediente ou produto é um dos principais critérios para a sua utilização. Os ensaios de citotoxicidade celular estão entre os métodos mais comuns de ensaios *in vitro* para prever a toxicidade de uma ampla gama de substâncias (UGARTONDO et al. 2008).

As células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratadas com lignina em diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL), expressa os resultados apresentados na figura 11A. As células sofreram morte celular significativa ($p=0,0022$), nas concentrações (100, 50 e 25 µg/mL). Esses valores eram esperados devido à alta produção de óxido nítrico quando comparado ao controle (Figura 11B), isto é a produção de NO promove danos as células.

O NO trata-se de um radical livre gasoso, visto como um dos mediadores na inflamação tecidual, decorrendo não somente atividades de caráter pró inflamatório, mas também de sinais para a regulação do crescimento e diferenciação celular. Este radical livre desempenha duas funções sobre as células, a função regulatória e atua na citotoxicidade. Nas funções regulatórias, é produzido em quantidades reduzidas, sob condições fisiológicas mediando o relaxamento de vasos, o controle da adesão e a agregação de plaquetas e neutrófilos, de forma também envolvida na neurotransmissão. Entretanto, as funções citotóxicas podem ser observadas quando o NO é produzido em quantidades maiores por macrófagos, hepatócitos e outras células após exposições a citocinas ou a outros produtos bacterianos. (SILVA, 2007; CAMAROTTI 2013).

Figura 11 - Viabilidade celular avaliada pelo método MTT em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com diferentes concentrações de ligninas (A) e produção de óxido nítrico produzido (B). As barras horizontais representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

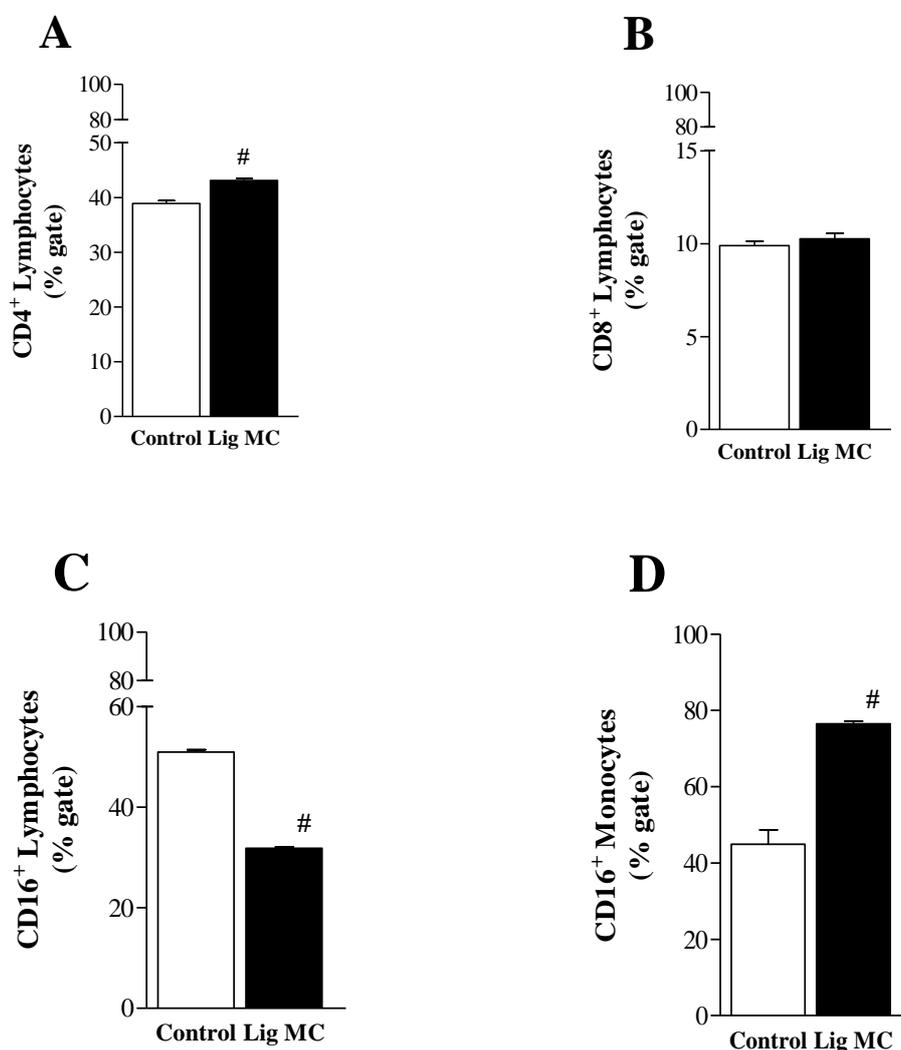


Entretanto, as concentrações de 12,5 e 6,25 µg/mL promoveram maior viabilidade celular, com uma taxa de sobrevivência superior a 70%. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho destacamos então que a alta viabilidade celular apresenta, portanto, uma baixa produção de óxido nítrico, diminuindo assim a concentração e a citotoxicidade. Ugartondo et al. (2008) avaliaram os efeitos citotóxicos das ligninas em células de queratinócitos humanos HaCaT e fibroblastos murinos 3T3, a fim de prever seu potencial de irritação cutânea. As diferenças não foram significativas em todos os casos. E a lignina em estudo apresentou baixa toxicidade. Estudando células do sistema imunológico Cruz- Filho et al. (2019) e Nascimento et al. (2020) avaliando ligninas obtidas por extração alcalina observaram que em nenhuma das concentrações em estudo as moléculas não apresentaram citotoxicidade e que o NO produzido promoveu a ativação celular.

A imunofenotipagem (Figura 12) das células esplênicas de camundongo mostrou que a lignina de *Morinda citrifolia* promoveu a proliferação e ativação de linfócitos T CD4+ (Figura A), porém não houve identificação de linfócitos CD8+ (Figura B). Os linfócitos CD16+ (Figura C) em contrapartida, foram inibidos pela lignina, já que o controle apresentou níveis maiores que o tratado. Os níveis de monócitos CD16+ (Figura D) na cultura foram relevantes e a lignina mostrou elevada ativação dessa população celular.

Hofmann et al. (2012) em estudo com linfócitos T CD4+, que são os mensageiros mais importantes do sistema imune, demonstraram que esses linfócitos são essenciais na ativação de um perfil pró-cicatrizante. Esses linfócitos T por meio da produção de citocinas e mediadores de angiogênese, estimulam a cicatrização tecidual. Contudo, a depleção de linfócitos T CD8+, segundo estudo de Davis et al. (2001) apresentou um aumento na resposta pró- cicatrizante em camundongos. Os níveis elevados de monócitos CD16+ que são grandes aliados do sistema imunológico, justifica também o viés pró-cicatrizante da lignina, onde o aumento dessas células é crucial para o processo cicatricial (FRANTZ et al., 2013)

Figura 12: Imunofenotipagem de linfócitos T CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), CD16⁺ (C) e monócitos CD16⁺ (D) em culturas tratadas com a *Morinda citrifolia* (10µg/mL). Para o controle, as células foram incubadas em dimetilsulfóxido a 1% (DMSO). As barras representam a média de seis experimentos independentes.



5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a lignina das folhas de *Morinda citrifolia* é do tipo GSH, apresentou baixo peso molecular, além disso, foi responsável por apresentar propriedades antioxidantes. Apresentou baixa toxicidade em concentrações abaixo de 12,5 µg/mL em células de macrófagos RAW 264.7, o que foi confirmado pela diminuição do teor de óxido nítrico. Ademais, essas ligninas estimularam a produção de linfócitos T CD4+ e monócitos CD16+ e não houve identificação de linfócitos CD8+. Os linfócitos CD16+ em contrapartida, foram inibidos pela lignina, já que o controle apresentou níveis maiores que o tratado. Conferiu então a lignina estudada, um caráter pró-cicatrizante, com um perfil tendência para anti-inflamatório. Esses resultados são promissores e reforçam a busca por novos compostos naturais contra diferentes doenças.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Determinação de citocinas em células imunológicas;
- Realizar ensaios de atividade leishmanicidas;
- Realizar ensaios de estresse oxidativo;

REFERÊNCIAS

- AADIL, K. R.; BARAPATRE, A.; SAHU, S.; JHA, H.; TIWARY, B. N. Free radical Scavenging Activity and Reducing Power of Acacia Nilotica Wood Lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 220-227, 2014.
- ADLER, E. Lignin Chemistry – Past, Present and Future. **Wood Sci. Technol.**, v. 11, p. 169-218, 1977.
- AKAO, Y.; SEKI, N.; NAKAGAWA, Y.; YI, H.; MATSUMOTO, K.; ITO, Y.; ITO, K.; FUNAOKA, M.; MARUYAMA, W.; NAOI, M.; NOZAWA, Y. A highly bioactive lignophenol derivative from bamboo lignin exhibits a potent activity to suppress apoptosis induced by oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 4791-4801, 2004.
- AL ARNI, S. Extraction and isolation methods for lignin separation from sugarcane bagasse: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 330-339, 2018.
- ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, M. B. S.; PAZ, M. F. C. J.; MORAES, G. P.; NUNES, A. T.; CAVALVANTE, A. A. C. M. Genotoxicidade e Nefrotoxicidade da Morinda citrifolia em Estudos Pré-Clínicas: Riscos à Saúde Pública. **Centro Universitário Uninovafapi – Revista Interdisciplinar**. V. 6, n.01, p. 1-8, 2013.
- ALVAREZ-VASCO, C.; MA, R.; QUINTERO, M.; GUO, M.; GELEYNSE, S.;
- BAI, J.; CHEN, X.; SHAO, J.; JIA, C.; & WANG, Q. Study of breakage of main covalent bonds during co-pyrolysis of oil shale and alkaline lignin by TG-FTIR integrated analysis. **Journal of the Energy Institute**, v. 92, n. 3, p. 512-522, 2019.
- BAKER, D. Lignans. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1424, 2019.
- BATISTA, J.A.; MAGALHÃES, D.D.A.; SOUSA, STEFANY.GUIMARÃES.; FERREIRA, J.D.S.; PEREIRA, C.M.C.; VICTOR DO NASCIMENTO LIMA, JOSÉ.; ALBUQUERQUE, I.F.D.; DUTRA BEZERRA, N.L.S.; MONTEIRO, C.E.D.S.; FRANCO, A.X.; LENARDO, D.D.; OLIVEIRA, L.A.; FEITOSA, J.P.D.A.; DE PAULA, REGINA.CÉ.MONTEIRO.; OLIVEIRA, J.S.D.; VASCONCELOS, D.F.P.; SOARES, P.M.G.; BARBOSA, ANDRÉ.LUIZ.DOS.REIS. Polysaccharides derived from *Morinda citrifolia* Linn reduce inflammatory markers during experimental colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 248, 112303, 2020.
- BAZARRA-ELENES, C. Analysis by UPLC-DAD-ESI-MS of Phenolic compounds and HPLC-DAD-Based Determination of Carotenoids in Noni (*Morinda citrifolia* L.) Bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 7365-7377, 2019.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**., v. 54, p. 519-546, 2003.

BURANOV, A.U.; MAZZA, G. Lignin in straw herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 237-259, 2008.

CARVALHO, W., CANILHA, L., FERRAZ, A., & MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CHRISTIERNIN, M. Lignin composition in cambial tissues of poplar. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 700-706, 2006.

CHRISTIERNIN, M. Lignin composition in cambial tissues of poplar. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 700-706, 2006.

CHRISTOPHER LP; YAO B; JI Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, p. 12, 2014.

CRUZ FILHO, I. J.; DA SILVA BARROS, B. R.; DE SOUZA AGUIAR, L. M.; NAVARRO, C. D. C.; RUAS, J. S.; DE LORENA, V. M. B. & MAIOR, A. M. S. Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 1331-1339, 2019.

DE MELO, C. M. L.; DE CASTRO, M. C. A. B.; DE OLIVEIRA, A. P.; GOMES, F. O. S.; PEREIRA, V. R. A.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G. Immunomodulatory Response Of Cramoll 1, 4 Lectin On Experimental Lymphocytes. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 11, p. 1631-1636, 2010.

DOHERTY, W.O.S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin Polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 259- 276, 2011.

DONALDSON, L. A. Review: Lignification and lignin topochemistry - A ultrastructural view. **Phytochemistry**, n 57, p. 859-873, 2001.

DUSSOSSOY E.; BRAT P.; BONY E.; BOUDARD F.; POUCHERET P.; MERTZ C.; GIAIMIS J.; MICHEL A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 108-115, 2011.

DUSSOSSOY, E.; BONY, A.; MICHEL, P.; BRAT, F.; VAILLANT, F.; BOUDARD, P.; POUCHERET, C.; MERTZ, J.; GIAIMIS, A. MICHEL, Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of the morinda citrifolia fruit (noni). **Acta Horticulturae**. No. 1040, p. 69-73 2014.

ESPINOZA-ACOSTA, J.L. et al. Antioxidant, Antimicrobial, and Antimutagenic Properties of Technical Lignin and Their Applications. **BioResources Technology**, v. 11, n. 2, p. 5452-5481, 2016.

FARIAS, V.A.; DA ROCHA LIMA, A.D.; SANTOS COSTA, A.; DE FREITAS, C.D.T.; DA SILVA ARAÚJO, I.M.; DOS SANTOS GARRUTI, D.; DE FIGUEIREDO, E.A.T.; DE OLIVEIRA, H.D. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as new source of milk-clotting cysteine proteases. **Food Research International**, v. 127, p. 108689, 2020.

FENGEL, D.; WEGENER. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. New York: **Waster de Gruyter**, p. 613, 1984.

GOTOH, K.; FUJIWARA, K.; ANAI, M.; OKAMOTO, M.; MASAKI, T.; KAKUMA, T.; SHIBATA, H. Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity [Review]. **Endocrine Journal**, v. 64, p. 375-378, 2017.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de Metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de- açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

HASEGAWA, Y.; NAKAGAWA, E.; KADOTA, Y. & KAWIMINAMI, S. Lignosulfonic acid promotes hypertrophy in 3T3-L1 cells without increasing lipid content and increases their 2-deoxyglucose uptake. **Asian Australas. J. Anim. Sci.**, v. 30, p. 111, 118, 2017.

JAHAN, M. S.; LIU, Z.; WANG, H.; SAEED, A.; & NI, Y. Isolation and characterization of lignin from prehydrolysis liquor of kraft-based dissolving pulp production. **Cellul. Chem. Technol**, v. 46, n. 3-4, p. 261-267, 2012.

JAYANEGARA et al. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal components analysis. **Animal Feed Sciences and Technology**, v. 163, p. 231-243, 2011.

KAMIYA, K.; HAMABE, W.; TOKUYAMA, S.; HIRANO, K.; SATAKE, T. KUMAMOTO-Y, Y. YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. **Food Chemistry**. V.118, p. 725–730, 2010.

LANGE, H.; DECINA, S.; CRESTINI, C. Oxidative upgrade of lignina – Recent routs reviewed. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 1151-1173, 2013.

LAPIERRE, C.; POLLET, B.; ROLANDO, C. New insights into to molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. **Res. Chem. Intermed.**, v. 21, n. 3-5, p. 397-412, 1995.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignin: Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 1266-1290, 2014.

LAWTHER, J. M.; SUN, R. C.; & BANKS, W. B. Rapid isolation and structural characterization of alkali-soluble lignins during alkaline treatment and atmospheric refining of wheat straw. **Industrial Crops and products**, v. 5, n. 2, p. 97-105, 1996.

LEE J.B.; YAMAGISHI C.; HAYASHI K.; HAYASHI T. Antiviral and Immunostimulating Effects of Lignin-Carbohydrate- Protein Complexes from *Pimpinella anisum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 75, n. 3, p. 459-465, 2011.

LIGNIN SYSTEMS: **Lignin Biosynthesis**. Disponível em: <https://brcwebportal.cos.ncsu.edu/lignin/Lignin_Biosynthesis>. Acesso em: 13 marc. 2020

LOHANI, M.; MAJRASHI, M.; GOVINDARAJULU, M.; PATEL, M.; RAMESH, S.; BHATTACHARYA, D.; DHANASEKARAN, M. Immunomodulatory actions of a Polynesian herb Noni (*Morinda citrifolia*) and its clinical applications. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 47, p. 102206, 2019.

LORA, J.H.; GLASSER, W.G. Recent Industrial Applications of Lignin: A Sustainable Alternative to Nonrenewable Materials. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 10, n.1/2, p. 39-48, 2002.

LU, Q. Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin. **Food Chemistry**, v. 135, p. 63-67, 2012.

LUPOI, J. S., SINGH, S., PARTHASARATHI, R., SIMMONS, B. A., & HENRY, R. J. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 871- 906, 2015.

MANSOURI, N.E.E.; SALVADÓ, J. Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda- anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. **Industrial Crops and Products**, v. 24, p. 8-16, 2006.

MATOSO, L. M. L. ; Cristina, C R ; MENEZES, L. M. C. S. ; OLIVEIRA. L.E.C ; OLIVEIRA, K. K. D. . As Características E A Utilização Do Noni (*Morinda Citrifolia*). **Revista Ciência & Desenvolvimento** , V. 6, P. 42-50, 2013.

MATSUSHITA, Y. Conversion of technical lignins to functional materials with retained polymeric properties.**Journal of wood science**, v. 61, n. 3, p. 230-250, 2015.

MCCLATCHEY, W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v.1, n. 2, p. 110-120, 2002.

MCCLATCHEY, W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v.1, n. 2, p. 110-120, 2002.

NAMANE, M., SITHOLE, B. B., & RAMJUGERNATH, D. Centrifugal washing and recovery as an improved method for obtaining lignin precipitated from South African kraft mill black liquor. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 74, p. 571-576, 2015.

NASCIMENTO SANTOS, D. K. D., DA SILVA BARROS, B. R., DE SOUZA AGUIAR, L. M., DA CRUZ FILHO, I. J., DE LORENA, V. M. B., DE MELO, C. M. L., & NAPOLEÃO, T. H. Immunostimulatory and antioxidant activities of a lignin isolated from *Conocarpus erectus* leaves. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, n. 1 p. 169-177 2020.

NELSON, S.C. *Morinda citrifolia* (noni): Rubiaceae (coffee family). **Tradicional Tree**, v. 4, 2006.

NORIKURA, T., MUKAI, Y., FUJITA, S., FUJITA, K., FUNAOKA, M., SATO, S. Lignophenols decrease oleate-induced apolipoprotein-B secretion in HepG2 cells. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 107, p. 813-817, 2010.

OLIVEIRA, L., EVTUGUIN, D., CORDEIRO, N., & SILVESTRE, A. J. D. Structural characterization of stalk lignin from banana plant. **Industrial crops and products**, v. 29, n. 1, p. 86-95, 2009.

PEREIRA, G. F. A Família Rubiaceae Juss. na vegetação ripária de um trecho do Alto Rio Paraná, Brasil, com ênfase na Tribo Spermaceae. **Dissertação**. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2007.

PONGO, I.A.A.; GEMAPUTRI, A.A. Studies on inhibition of *Morinda citrifolia* leaf extract (*Morinda citrifolia* L) against the growth of *Aeromonas hydrophilla* in vitro. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.**, v. 207, 2019.

POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. *Morinda citrifolia* (noni) Fruit – Phytochemistry, Pharmacology, Safety. **Planta Med**, v. 73, n. 3, p. 191-199, 2007.

POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. *Morinda citrifolia* (noni) Fruit – Phytochemistry, Pharmacology, Safety. **Planta Med**, v. 73, n. 3, p. 191-199, 2007.

RAMASAMY, K. K. & AMP; ZHANG, X. Unique low-molecular-weight lignin with high purity extracted from wood by deep eutectic solvents (DES): a source of lignin for valorization. **Green Chemistry**, v. 18, n. 19, p. 5133-5141, 2016.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; SILVA, V. F. N. Enzymatic bioremediation of effluent from sugarcane bagasse soda delignification process. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 6, p. 919-929, 2014.

ROCHA, G. J. M. **Deslignificação de Bagaço de Cana de Açúcar Assistida por Oxigênio**, Tese de Doutorado. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2000.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

ROCHA, G. J.M, NASCIMENTO, V. M., GONÇALVES, A. R., SILVA, V. F. N., & MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.

RUIZ, H.A. et al. Development and Characterization of an Environmentally Friendly Process Sequence (Autohydrolysis and Organosolv) for Wheat Straw Delignification. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 164, p. 629-641, 2011.

RUTKOWSKA, E. W., WOLLBOLDT, P., ZUCKERSTAETTER, G., WEBER, H. K., & SIXTA, H. Characterization of structural changes in lignin during continuous batch kraft cooking of *Eucalyptus globulus*. **BioResources**, v. 4, n. 1, p. 172-193, 2008.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J; H de; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.; Potencial de palha de cana-de-açúcar para produção de etanol, **Química Nova**. Vol. 35, No. 5. 2012.

SETYANI,W.; SETYOWATI, H. Phytochemical investigation of noni (*Morinda citrifolia* L) leaves extract applicated for sunscreen product. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**, p. 164-167, 2018.

SHI, Z., XU, G., DENG, J., DONG, M., MURUGADOSS, V., LIU, C. & GUO, Z. Structural characterization of lignin from *D. sinicus* by FTIR and NMR techniques. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 12, n. 3, p. 235-243, 2019.

SILVA, L.R. et al. Caracterização do fruto de *Morinda citrifolia* L. (noni). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 1, p. 93-100, 2012.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Issue Date: 4/25/2008. Technical Report NREL/TP – 510-42618.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples**. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Issue Date: 12/08/2006. Technical Report NREL/TP – 510-42623.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Extractives in Biomass**. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Issue Date: 7/17/2005. Technical Report NREL/TP – 510-42619.

SOUSA S.G, OLIVEIRA L. A.; DE AGUIAR MAGALHÃES D, et al. Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from *Morinda citrifolia* Linn (Noni). **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 515-523, 2018.

UGARTONDO, V., MITJANS, M., & VINARDELL, M. P. (Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. **Bioresource technology**, v. 99, n. 14, p. 6683-6687, 2008.

VINARDELL, M.P., MITJANS, M. Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health. **Int. J. Mol. Sci.**, v.18, p. 1219, 2017.

WANG, G. et al. Sucessive ethanol-water fraction of enzymatic hydrolysis lignin to concentrate its antimicrobial activity. **Journal of Chemical Technology**, v. 93, p. 2977-2987, 2018.

WANG, G. et al. Sucessive ethanol-water fraction of enzymatic hydrolysis lignin to concentrate its antimicrobial activity. **Journal of Chemical Technology**, v. 93, p. 2977-2987.

WANG, J., QIN, X., CHEN, Z., JU, Z., HE, W., TAN, Y., LIU, Y. TWO new anthraquinones with antiviral activities from the barks of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 13-15, 2016.

WANG, Q. et al. Characterization of two water-soluble lignin metabolites with antiproliferative activities from *Inonotus obliquus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 507-514, 2015.

WEST, B.J. et al. *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae) leaf extracts mitigate UVB- induced erythema. **J Nat Med**, 2019.

WEST, B.J. et al. *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae) leaf extracts mitigate UVB- induced erythema. **J Nat Med**, 2009.

YUAN, T.Q.; XU, F.; SUN, R.C. Role of lignin in a biorefinery: separation characterization and valorization. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 88, p. 346-352,