



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAIO CÉZAR OLIVEIRA DE LUCENA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DE *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)**

Recife

2024

CAIO CÉZAR OLIVEIRA DE LUCENA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DE *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Recife

2024

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Lucena,	Caio	Cezar	Oliveira	de.
Composição química e atividades biológicas dos extratos orgânicos de Copaifera langsdorffii Desf. (Fabaceae) / Caio Cezar Oliveira de Lucena. - Recife, 2024.				
86f.:				il.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.				
Orientação:	Rafael	Matos	Ximenes.	
Inclui	referências.			

CAIO CÉZAR OLIVEIRA DE LUCENA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DE *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 29/02/2024

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Ivone Antônia de Souza (Membro interno – UFPE)

Dr^a. Iasmine Andreza Basilio dos Santos Alves (Membro externo – UFPE)

Dr^a. Cynthia Layse Ferreira de Almeida (Membro externo – UNIVASF)

Dr^a. Ivana Maria Fechine (Membro externo – UEPB)

Dr. Rafael Carlos Ferreira (Membro externo – CUMN)

*“O que é impossível para o ser humano
é possível para Deus.”
(S. Lucas 18:27)*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que já conhecia todos os planos que tinha para mim ao longo desses anos e, mesmo em meio às dificuldades, me sustentou desde os primeiros dias. Que os propósitos dEle sejam cumpridos por meio da minha vida e desse trabalho.

À minha parceira, aliada, que me completa, fortalece e encoraja, minha amada esposa Carol Soares, que sempre esteve junto ao longo de todo o processo. Desde os primeiros dias de graduação compartilhamos a bancada e agora compartilhamos uma vida inteira juntos, concretizando mais um sonho juntos. A amarei eternamente.

À minha primeira filha Olívia, não nascida, que me ensinou a não desistir diante das dificuldades, frustrações e decepções. Sempre estará viva no meu coração e na minha memória os momentos vividos, junto com sua mãe, durante parte desse processo. Isso fez mudar nossa perspectiva radicalmente e nos encorajou a chegar até aqui.

À minha segunda filha, Maria Alice, que tive o privilégio de escrever várias linhas desse texto com ela em meu colo, e por compartilhar as madrugadas entre um acalento e a leitura de artigos de referência. Todos os dias me senti impulsionado a vencer o impossível para poder entregá-la o melhor. Ela mudou minha essência e me fez sentir um amor indescritível e incondicional, além de mudar minha perspectiva sobre o valor das coisas dessa vida passageira e fulgaz.

À minha família biológica, que sempre acreditou em mim e me fizeram também acreditar que eu sou capaz de conquistar o que eu desejar, sempre com honestidade e humildade. Só estou onde estou e sou o que sou hoje porque tive uma base sólida. Mesmo com as tempestades durante nossa história, nunca nos deixamos abalar e sustentar uns aos outros. Obrigado por tudo.

À minha família da fé, os irmãos e pastores da Catedral Anglicana Comunhão, que nunca deixaram de interceder pela conclusão desse trabalho e orar para que minha vida fosse um canal da presença de Deus onde eu estivesse. Agradeço a Deus por cada palavra liberada em minha vida e por me serem, de fato, Uma Família para Pertencer.

Ao professor Dr. Rafael Ximenes, pela oportunidade a mim concedida de realizar este trabalho. Por toda a insistência, cobranças e orientações, os quais me fizeram amadurecer como estudante e como pesquisador. Pelas ricas vezes que compartilhamos a bancada e pelos ensinamentos criteriosos e detalhistas que fizeram a diferença. Agradeço também pelo esforço em sempre buscar nos fornecer a melhor estrutura, dentro das limitações, para que realizássemos o melhor trabalho.

Aos prezados membros da banca avaliadora, que aceitaram contribuir tão valiosamente com seus comentários sobre o trabalho e que são diretamente responsáveis pelo sucesso do mesmo. Me sinto muitíssimo honrado por compartilhar esse trabalho junto com eles e saber que suas contribuições fazem crucial diferença no campo de pesquisa em que atuam.

Aos estimados companheiros do Laboratório de Etnofarmacologia e Fitoquímica, os quais me acolheram de forma indescritível e me fizeram acreditar que uma equipe parceira e de confiança faz uma diferença crucial no desempenho de qualquer tarefa. Em especial aos amigos Camila, Fatinha, Henrique e Raudiney, que foram importantíssimos e diretamente responsáveis pela realização de parte dos experimentos.

À professora Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva, a quem primeiro me abriu as portas da UFPE e permitiu o início do meu doutoramento em seu laboratório, acreditando no meu potencial e nas recíprocas contribuições ocorridas, além de ter fornecido estrutura e insumos fundamentais durante a realização do projeto até seus últimos dias.

Ao Sr. Vilmar Lermen, um dos coordenadores da Associação de Agricultores Familiares e Extrativistas da Chapada do Araripe (Agrodóia - Exú-PE), pela parceria com o

laboratório e ter gentilmente me recebido em seu sítio, para coleta de exemplares da espécie em estudo.

A todos os professores do Departamento de Antibióticos e de Bioquímica da UFPE, por terem gentilmente cedido a estrutura, equipamentos, espaço e insumos dos laboratórios que coordenam. Graças ao esforço e a parceria de cada um, a ciência da instituição pode se consolidar ainda mais, pois nos fazem entender que ninguém faz pesquisa sozinho.

Aos eternos amigos Anderlechi, Elton e Yuri, do grupo GOAT, formado durante os primeiros períodos da graduação e persiste até hoje. Firmamos um compromisso de sempre apoiar e encorajar uns aos outros, de uma forma bem peculiar e descontraída, sendo assim uma válvula de escape para essa jornada tão desgastante, mas que vale a pena persistir até o fim.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do seu corpo de secretariado coordenação e docente, que contribuem direta e indiretamente para a formação de seus discentes. Pela estrutura acadêmica de discussão e produção, dentro e fora de sala de aula, se dispondo a ajudar no que fosse preciso e possível.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Departamento de Antibióticos, pelo amparo estrutural e administrativo, oferecendo as condições necessárias para uma construção acadêmica sólida e de qualidade.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte e contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

A natureza sempre foi uma fonte de recursos para diversas finalidades e, até os dias atuais, as plantas recebem destaque por serem utilizadas por comunidades tradicionais para o tratamento de diferentes doenças. *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae), popularmente conhecida como Copaíba ou Pau D'óia, é uma leguminosa da qual se obtém uma oleorresina, amplamente utilizada na medicina tradicional contra diversas infecções e inflamação. Neste trabalho foi investigado o potencial terapêutico e farmacológico de outras partes da Copaíba, a partir da obtenção de extratos orgânicos das folhas, casca do caule e lenho, utilizando n-hexano, acetato de etila e metanol. Alguns dos extratos obtidos, como o extrato das folhas e da casca do caule, demonstraram atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória *in vitro*, avaliados, respectivamente, a partir da determinação da concentração inibitória mínima (MIC) contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*, da redução do radical DPPH• e da quantificação de mediadores inflamatórios, como NO, TNF- α , IL-6 e IL-10, produzidos por macrófagos peritoneais murinos estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano. A avaliação fitoquímica das amostras por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) demonstrou a presença de diversos metabólitos secundários nos extratos, nos quais os de maiores níveis foram flavonoides, terpenos e cumarinas, sugerindo uma correlação entre as atividades apresentadas e a presença desses compostos. Assim, os dados obtidos no presente trabalho reforçam a importância da conservação da espécie e subsidiar o seu uso na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, além de abrir caminho para a exploração de partes alternativas de plantas sem comprometer sua integridade com a extração de oleoresina. Os compostos bioativos identificados na copaíba sugerem uma promissora correlação com os efeitos terapêuticos observados, destacando seu potencial como um valioso recurso natural no tratamento de diversas doenças.

Palavras-chave: Copaíba, Inflamação, Antimicrobiano, Antioxidante, Flavonoides

ABSTRACT

Nature has always been a source for various purposes throughout history, including the treatment of diseases. To this day, plants are used by traditional communities for the treatment of various illnesses. *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae), commonly known as Copaiba, is a legume from which an oleoresin is obtained from its stem that is widely used in traditional medicine for various purposes, such as pain relief, infections, and inflammation. In this study, the therapeutic potential of organic extracts from leaves, stem bark, and wood of Copaiba, using n-hexane, ethyl acetate and methanol. Some of the obtained extracts, such as the leaf and stem bark extract, showed *in vitro* antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities, evaluated respectively through minimum inhibitory concentration (MIC) determination against *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *C. albicans*, DPPH• radical scavenge, and quantification of inflammatory mediators such as NO, TNF- α , IL-6, and IL-10 produced by bacterial lipopolysaccharide-stimulated murine peritoneal macrophages (MPM). The phytochemical evaluation through thin-layer chromatography (TLC) demonstrated the presence of various secondary metabolites in the extracts, in which the most active showed high levels of flavonoids, terpenes, and coumarins, suggesting a correlation between the biological activities and the presence of these compounds. Therefore, the data obtained reinforces the importance of conserving the species and its use in traditional medicine for the treatment of various diseases, opening new possibilities for the use of other parts of the plant without harming it through oleoresin extraction.

Keywords: Copaiba, Inflammation, Antimicrobial, Antioxidant, Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A: Fitofisionomia de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae) em ambiente de coleta. B: Ramos floridos da planta coletados para identificação da espécie. C: Disposição das árvores no campo. D: detalhe de parte da casca do caule retirada no extrativismo.	23
Figura 2 - Classificação estrutural de algumas classes de compostos fenólicos.....	24
Figura 3 – Mecanismo geral de ação antioxidante de compostos fenólicos.....	25
Figura 4 - Processo inflamatório agudo.....	28
Figura 5 - Processo de extração utilizando o aparelho de Soxhlet.	45
Figura 6 - Dosagem de compostos fenólicos totais a partir do equivalente de ácido gálico nos extratos orgânicos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae).....	49
Figura 7 - Dosagem de flavonoides, a partir do equivalente de quercetina, nos extratos orgânicos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae).....	51
Figura 8 - Dosagem de proantocianidinas, a partir do equivalente de catequina, nos extratos orgânicos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae).	51
Figura 9 - Atividade citotóxica dos extratos orgânicos das (A) folhas, (B) casca do caule e (C) lenho de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae) frente a macrófagos peritoneais murinos, avaliados pelo método da Sulforodamina B, após 24 h de incubação. A significância foi determinada pela análise de variância em duas vias (two-way ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (0 $\mu\text{g/mL}$). 1, 4, 7: n-hexano; 2, 5, 8: acetato de etila; 3, 6, 9: metanol.	62
Figura 10 - Efeito dos extratos orgânicos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae), a 25 $\mu\text{g/mL}$, na produção de nitrito por macrófagos peritoneais murinos após 24 h de tratamento, avaliado pela reação de Griess. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (E PM) e a significância foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett, e considerados significativos (*) quando $p < 0,05$, comparados ao grupo controle (LPS+). DEXA: dexametasona.	64
Figura 11 - Dosagem de TNF- α do sobrenadante de macrófagos peritoneais tratados com extratos orgânicos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e a significância foi determinada pela análise de variância	

(AN OVA), seguido do pós-teste de Dunnett, e considerados significativos (*) quando $p < 0,05$, comparados ao grupo controle (LPS+). DEXA: dexametasona..... 67

Figura 12 - Dosagem de IL-6 do sobrenadante de macrófagos peritoneais tratados com extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e a significância foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett, e considerados significativos (*) quando $p < 0,05$, comparados ao grupo controle (LPS+). DEXA: dexametasona..... 67

Figura 13 - Dosagem de IL-10 do sobrenadante de macrófagos peritoneais tratados com extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii*. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e considerados significativos (*) quando $p < 0,05$, comparados ao grupo controle (LPS+). DEXA: dexametasona. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes de metabólitos secundários, padrões e sistemas de eluição utilizados na análise fitoquímica dos extratos orgânicos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae), por meio da cromatografia em camada delgada (CCD).	35
Tabela 2 - Rendimento de cada extração calculado a partir da massa de amostra utilizada e a quantidade obtida após as extrações.	46
Tabela 3 – Prospecção fitoquímica dos extratos orgânicos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae).....	48
Tabela 4 – Atividade antioxidante dos extratos de <i>C. langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae) avaliada pelo método de DPPH. Os valores de EC ₅₀ estão expressos em µg/mL ± EPM.	55
Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM), concentração mínima bactericida (CMB) e fungicida (CMF) dos extratos orgânicos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae) contra micro-organismos. Os dados estão expressos como valores de concentração em µg/mL.	58

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1.	ETNOBOTANICA NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS	18
2.2.	BIOMA CERRADO	19
2.3.	FAMÍLIA FABACEAE (LEGUMINOSAE)	21
2.3.1.	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	22
2.4.	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	23
2.5.	INFLAMAÇÃO AGUDA.....	27
2.5.1.	FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO AGUDA.....	27
2.5.2.	MEDIADORES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO.....	29
3.	OBJETIVOS	32
3.1.	OBJETIVO GERAL	32
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4.	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1.	MATERIAL BOTÂNICO	33
4.2.	EXTRAÇÃO.....	33
4.3.	ANIMAIS	34
4.4.	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	34
4.4.1.	ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA.....	34
4.4.2.	ANÁLISE QUANTITATIVA DE FENÓIS TOTAIS.....	36
4.4.3.	DOSAGEM DE FLAVONOIDES.....	36
4.4.4.	DOSAGEM DE PROANTOCIANIDINAS	37
4.5.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	37

4.5.1. SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES	37
4.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	38
4.6.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	38
4.8. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	40
4.9. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA IN VITRO	41
4.9.1. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	41
4.9.2. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	42
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. MATERIAL BOTÂNICO	44
5.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	44
5.3. ESTUDO FITOQUÍMICO.....	47
5.3.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA.....	47
5.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
5.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	57
5.6. CITOTOXICIDADE.....	60
5.7. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	63
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos séculos, a natureza serviu como fonte de matéria prima para atender as diversas necessidades dos seres humanos, como a alimentação, construção, vestimenta, lenha, utensílios domésticos, ritualísticos ou de caça e principalmente para o tratamento de vários tipos de doenças. Assim, os recursos naturais, com destaque para as plantas, se tornaram a base da medicina tradicional (POLAT *et al.*, 2015). O uso das plantas para o tratamento de doenças surgiu em comunidades primitivas, com os primeiros relatos datando de cerca de 2600 a. C., na região da antiga Mesopotâmia (BORCHARDT, 2002). Esse conhecimento tradicional foi transferido entre as gerações ao longo do tempo, permanecendo preservado em comunidades nativas e tradicionais, como povos indígenas e de zona rural (SARGIN; SELVI; BÜYÜKCENGİZ, 2015).

A perpetuação do conhecimento tradicional sobre o uso das plantas com diversas finalidades abre espaço para estudos da etnobotânica, uma área da ciência que se debruça em investigar a correlação entre as comunidades e o meio vegetal, observando tanto o uso e o manejo dos recursos vegetais, quanto a percepção e a classificação pelas populações locais (DE MORAES REGO *et al.*, 2016).

Países tropicais apresentam uma alta diversidade de espécies. O Brasil, devido às suas proporções continentais, está localizado em diversas zonas climáticas, permitindo a formação de diferentes biomas, os quais são o berço da maior biodiversidade do planeta. Os biomas brasileiros disponibilizam uma rica variedade de espécies vegetais, e estas constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias bioativas. No nordeste do Brasil, onde predomina o bioma caatinga – e parte do cerrado, observa-se uma rica tradição no uso de plantas medicinais aplicadas ao tratamento de diversas doenças, uma vez que são potencialmente ricas em propriedades curativas (CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010). No entanto, a diversidade química e farmacológica desse bioma ainda é pouco explorada, em contraste do alto potencial terapêutico de suas fontes vegetais. Com isso, cresce cada vez mais o interesse de pesquisadores e indústrias em aprofundar o conhecimento sobre as espécies dessa região, seus princípios ativos e potenciais usos como biofármacos (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; DUTRA *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, a quantidade de estudos sobre as plantas e suas aplicações medicinais aumentou de forma considerável. Entretanto, apesar da intensa investigação da flora terrestre, estima-se aproximadamente que apenas 6% das 300.000 espécies de plantas superiores tenham sido investigadas farmacologicamente, e apenas 15% tiveram algum estudo fitoquímico (ATANASOV *et al.*, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016). Estudos sobre o potencial químico e farmacológico das espécies medicinais presentes no Nordeste brasileiro podem contribuir não só para a valorização ecológica dessa região fitogeográfica, mas também para a seleção de espécies para bioprospecção, com retorno para a conservação da biodiversidade vegetal (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

Estudos sobre a composição química dos vegetais são o ponto de partida para se determinar as atividades biológicas e o seu potencial terapêutico. A investigação de compostos químicos com atividade biológica derivados de plantas constitui uma estratégia alternativa bastante eficaz na procura de novos agentes terapêuticos, a partir do direcionamento inicial com base na utilização tradicional, que fornecem informações sobre a segurança e eficácia desses fitocompostos. Isto proporciona, além da economia de tempo e recursos, a possibilidade de se otimizar a obtenção de um maior número de moléculas com capacidade e interesse terapêutico (YUAN *et al.*, 2016).

Os metabólitos secundários são moléculas encontradas nos vegetais produzidas a partir do seu metabolismo primário, classificadas de acordo com suas estruturas químicas em diversas classes como composto fenólicos, alcaloides, cumarinas e terpenos. Esses metabólitos desempenham diversos efeitos biológicos, os quais levam ao uso dessas plantas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. Entretanto essa utilização deve ser baseada em estudos fitoquímicos que determinem a composição química desses vegetais validando o seu uso (HUSSEIN; EL-ANSSARY, 2018).

O gênero *Copaifera* (Fabaceae) possui 27 espécies aceitas que ocorrem no Brasil, sendo 16 delas endêmicas (COSTA, 2023). Diferentes partes dessa espécie são amplamente utilizadas na medicina popular, principalmente o óleo extraído do seu caule, para dores em geral, febre, infecções bacterianas e fúngicas, inflamação, problemas estomacais e tegumentares, como cicatrizante, anti-helmíntico, entre outros (DE CARVALHO NILO BITU *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2021).

Os representantes deste gênero apresentam composição química bem característica, de acordo com a parte da planta utilizada. A oleorresina, por exemplo, é caracterizada principalmente pela presença de diterpenos e sesquiterpenos. Já suas folhas apresentam uma variedade de flavonoides (ARRUDA *et al.*, 2019).

A *Copaifera langsdorffii* Desf., popularmente conhecida como pau d'óia, pau d'óleo ou Copaíba, é uma árvore que pode variar de 3 até 15 m de altura, sendo encontrada em regiões de carrasco e cerrado dentro do domínio fitogeográfico da Caatinga, distribuída entre os estados de Pernambuco e do Ceará, principalmente na região da Chapada do Araripe. Nestas localidades, essa espécie é reputada devido a seus vários usos medicinais, como o combate a dores, inflamações, problemas de pele e infecções de maneira geral (RIBEIRO *et al.*, 2019).

Muito embora exista uma ampla disponibilidade de estudos descrevendo o uso do óleo extraído da Copaíba, são escassos os relatos na literatura sobre a utilização de outras partes dessa planta com diferentes formas de extração dos seus compostos bioativos, assim como carece a descrição das atividades biológicas de extrações das diferentes partes desse vegetal.

Diante deste cenário, e embasado no grande arsenal de substâncias bioativas com aplicação farmacológica encontradas nas leguminosas e, principalmente, no gênero *Copaifera*, observa-se a necessidade de um maior conhecimento químico e farmacológico a respeito desta espécie. Assim, os dados obtidos podem contribuir para o conhecimento da distribuição de moléculas de interesse farmacológico em diferentes partes da planta, guiando a obtenção dessas substâncias e a síntese de novos compostos a partir dos encontrados, resultando em diversos benefícios tanto para a saúde humana quanto para conservação da espécie.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. ETNOBOTANICA NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

O uso de plantas pela humanidade para o tratamento de doenças não é recente, existindo desde os primórdios da humanidade. Os primeiros registros documentados da utilização de plantas para fins medicinais datam de cerca de 2000 anos a. C., como o livro das plantas medicinais *Materia Medica*, escrito em tabletes de argila pelos sumérios, além de outro *Materia Medica* escrito pelos chineses desde o primeiro século d. C. e utilizado até os dias atuais (CSEKE *et al.*, 2006).

A etnobotânica, uma importante subárea da botânica, tem recebido destaque por estabelecer a conexão entre conhecimento popular e científico propriamente dito. Ela descreve a relação do homem com o ambiente vegetal que o cerca e as diferentes formas de utilização desses recursos vegetais disponíveis (FRANCO; LAMANCO-FERREIRA; FERREIRA, 2013). Dentre os vários tipos de utilização, como a alimentação e condimentos, construção civil, utensílios domésticos e vestuários, destaca-se o uso para fins medicinais. Nessa esfera, a etnobotânica busca investigar e registrar os diferentes tipos de plantas, e como estas são utilizadas na terapêutica, fornecendo assim um direcionamento para pesquisas nas áreas da fitoquímica e farmacologia (ALBUQUERQUE, 2005). As plantas medicinais são fontes promissoras de substâncias bioativas que podem proporcionar a descoberta de novos fármacos por meio de estudos que correlacionem o uso tradicional com pesquisas laboratoriais. Assim, os estudos que validam os efeitos e o uso terapêutico dessas plantas abrem as portas da etnofarmacologia, uma área que traz uma abordagem científica para as atividades biológicas das plantas com os seus efeitos farmacológicos. Deste modo, a etnobotânica se mostra crucial para a compreensão da importância e do uso de determinadas plantas em uma comunidade (HEINRICH, 2014).

A etnobotânica pode promover a conservação de espécies de plantas com alto potencial terapêutico, uma vez que existe uma redução significativa no tamanho populacional dessas espécies de interesse medicinal devido ao extrativismo descontrolado, trazendo riscos de extinções locais. Além disso, proporciona a

documentação do conhecimento tradicional e formas de manejos, por fim, proporciona a descoberta de novas espécies e novas substâncias de origem vegetal com potencial bioativo desconhecidas do meio científico (MILLER, 2011).

Grande parte dos fármacos lançados pela indústria farmacêutica derivam, direta ou indiretamente, de produtos naturais como as plantas medicinais. Em detrimento do elevado custo e tempo para o desenvolvimento de fármacos sintéticos ou semissintéticos, o interesse pelas plantas medicinais, especialmente aquelas selecionadas por estudos etnodirigidos, com comprovações científicas de sua eficácia e segurança terapêuticas, tem merecido destaque no âmbito das pesquisas por recursos terapêuticos alternativos (FIRMO *et al.*, 2011).

Estudos etnobotânicos no semiárido nordestino têm identificado diversas famílias de plantas, amplamente utilizadas no âmbito medicinal. Dentre elas, se destacam as espécies da família Fabaceae, em decorrência da diversidade de usos, particularmente os gêneros *Copaifera* (ALVES *et al.*, 2020; SANTOS-SILVA; ARAÚJO, 2020; VALADAS *et al.*, 2021).

2.2. BIOMA CERRADO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, que apresenta vegetações características de savana além de possuir outras fitofisionomias características de suas formações vegetais e em áreas de transição com outros biomas. É considerado uma grande área de biodiversidade (*hotspot*), caracterizando a mais rica região de savana do planeta pelo seu grau de endemismo, tornando-se uma área prioritária de conservação ambiental (ARAÚJO *et al.*, 2011). Neste bioma encontram-se diversas áreas criticamente ameaçadas pela ação antrópica. Mais de 70% da área original já foi reduzida devido às condições de solo e relevo propiciarem as atividades extrativistas humanas, como monoculturas de valor comerciais e o desmatamento para áreas de pastagens (LOPES *et al.*, 2011).

Segundo a definição (COUTINHO, 1978), de forma geral o Cerrado apresenta duas fitofisionomias distintas e extremas, o “Cerradão” e o “Campo Limpo”,

caracterizados respectivamente por formações de estratos lenhoso não muito denso, sem a formação de um dossel contínuo e áreas abertas de formações campestres com estratos rasteiros. Entretanto, o Cerrado apresenta uma grande diversidade estrutural e fisionômica entre as suas formas de vegetação, partindo do campo limpo, passando por formações savânicas de transição como o campo sujo, campo cerrado e o cerrado *sensu stricto*, chegando até as formações florestais como o cerradão (WALTER, 2006).

O cerrado se localiza predominantemente na região central do Brasil, porém abrange uma área geral de aproximadamente 2 milhões de km². Sua distribuição perpassa por quatro estados da região central do Brasil (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal), além de Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Também alcança latitudes mais ao norte do Equador, como os estados do Amapá e Roraima (KLEIN, 2000).

Sobre a sua distribuição no nordeste brasileiro, a literatura registra a ocorrência de Cerrado em todos os nove estados, em maior proporção na Bahia, no Maranhão e no Piauí. Nos demais estados, encontra-se fragmentos em áreas no Ceará, principalmente na Chapada do Araripe e Serra da Ibiapaba, no Rio Grande do Norte, na Paraíba, em Pernambuco, Alagoas e Sergipe, além de outros locais na Bahia, como as encostas das serras da Chapada Diamantina (CASTRO, 1999).

A Chapada do Araripe é uma Área de Proteção Ambiental, com aproximadamente 38 mil hectares, localizada nas regiões de fronteiras entre os estados do Ceará, Pernambuco e Piauí. Compreende uma superfície tabular que varia entre 700 e 1000 m de altitude, e se comporta como uma ilha para os diversos tipos de vegetação ocorrentes. Embora sejam encontradas áreas de confluência com o bioma Caatinga, o tipo de vegetação mais predominante consiste em fisionomias do Cerrado, com cerca de 48% de cobertura vegetal. Nela é possível encontrar o Cerrado *sensu stricto* e o Cerradão, além do Carrasco, um tipo de vegetação xerofítica que é encontrada em domínios de transição com regiões semiáridas (CREPALDI *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2019).

Embora não apresente uma alta riqueza de espécies, a Chapada do Araripe é considerada uma área de alto valor biológico por abrigar cerca de 51% das plantas medicinais nativas tradicionalmente utilizadas por comunidades tradicionais desta região. Entretanto, esses recursos ainda carecem de estudos que comprovem suas indicações terapêuticas, além da necessidade de conservação da área visto a alta atividade extrativista

que pode acarretar na redução e até a perda de espécies endêmicas (RIBEIRO *et al.*, 2014).

2.3. FAMÍLIA FABACEAE (LEGUMINOSAE)

A família Fabaceae é composta por um amplo grupo de plantas também conhecidas como leguminosas. Essa família é considerada a terceira maior dentre as plantas angiospermas, possuindo cerca de 800 gêneros e 20.000 espécies, apresentando também uma ampla distribuição geográfica (SMÝKAL; VON WETTBERG; MCPHEE, 2020).

Esta família apresenta uma grande importância ecológica e econômica, devido sua conhecida relação simbiótica de suas espécies com bactérias fixadoras de nitrogênio. A família apresenta grande diversidade de formas de vida e na morfologia de suas estruturas e, por isso, está entre as mais diversas em praticamente todos os grandes biomas globais, como florestas tropicais úmidas, florestas tropicais sazonalmente secas, savanas, campos tropicais e temperados, desertos e semidesertos (ANDREWS; ANDREWS, 2017; LEWIS *et al.*, 2005).

Leguminosae é a família com maior diversidade e número de espécies na flora brasileira, estando entre as três famílias mais diversas em todos os domínios fitogeográficos do Brasil, e cerca de 50% das espécies são endêmicas do país, com a maior distribuição ocorrendo nos estados do Amazonas, Bahia e Minas Gerais. As características fitofisionômicas dessa família podem variar bastante, podendo ser encontradas leguminosas desde ervas até árvores de grande porte (FLORA DO BRASIL, 2020).

Além de serem uma excelente fonte nutricional, como o feijão, soja, lentilhas e grão de bico, as leguminosas também são ricas em fitocompostos com alto potencial terapêutico. Dentre os diversos tipos de moléculas encontradas em ensaios de caracterização química das espécies dessa família, os compostos fenólicos são de longe os mais abundantes metabólitos secundários encontrados nessas plantas (TOR-ROCA *et al.*, 2020). Além desses, flavonoides, alcaloides, carotenoides, saponinas, lectinas e ácido gálico são encontrados em vários representantes dessa família, e estes fitoquímicos estão

fortemente associados a uma gama de atividades biológicas, como a redução de diversos tipos de câncer, infecções causadas por vírus, bactérias e fungos, inflamação, diabetes, estresse oxidativo, dentre outras (ALY *et al.*, 2019; DE S. VARGAS *et al.*, 2015; KOKOSKA *et al.*, 2019; MACÊDO *et al.*, 2020; SALEHI *et al.*, 2021; USMAN *et al.*, 2022).

2.3.1. *Copaifera langsdorffii* Desf.

A espécie *Copaifera langsdorffii* foi descrita inicialmente em 1821, pelo botânico francês M. Desfontaines. É descrita como uma árvore de 3 a 15 metros de altura, com folhas glabras, elípticas e ovais, apresentando de 3 até 5 pares de folíolos, sendo as proximais menores que as distais. Possui uma inflorescência paniculada e o seu fruto é em formato de legume, característicos dos membros da família Fabaceae (COSTA, 2020).

Esta espécie é conhecida popularmente como pau d'óleo ou pau d'óia, devido a uma oleoresina liberada pelo seu caule, um produto que é amplamente utilizado na medicina tradicional para diversas finalidades, principalmente como cicatrizante, anti-inflamatório, antisséptico e antitumoral, despertando a atenção da indústria farmacêutica (DIEFENBACH *et al.*, 2018; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009a).

Apesar das recentes revisões acerca da nomenclatura desse gênero, ainda existem complexas problemáticas na identificação, devido à grande semelhança entre as diferentes espécies. A coleta e a correta identificação dos tipos são de extrema importância para a correta aplicação do nome específico (DE PAULA-SOUZA *et al.*, 2022).

A espécie é frequentemente citada em estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos, devido a suas diversas aplicações de uso. *C. langsdorffii* aparece entre as plantas mais utilizadas na região da Chapada do Araripe, uma APA com fitofisionomia de enclave de Cerrado dentro da Caatinga no semiárido nordestino (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Nesta área, devido a existência de vários espécimes de Copaíba, existe uma região conhecida como Serra dos Pau D'óia, e lá encontra-se a Agrodóia (Associação dos Agricultores Familiares da Serra dos Paus Dóia), uma vila agroecológica que possui uma

área de proteção e manejo sustentável de várias árvores, contribuindo para o extrativismo não predatório na região.

Figura 1 - A: Fitofisionomia de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) em ambiente de coleta. B: Ramos floridos da planta coletados para identificação da espécie. C: Disposição das árvores no campo. D: detalhe de parte da casca do caule retirada no extrativismo.



(Fonte: autor – 2019)

2.4. COMPOSTOS FENÓLICOS

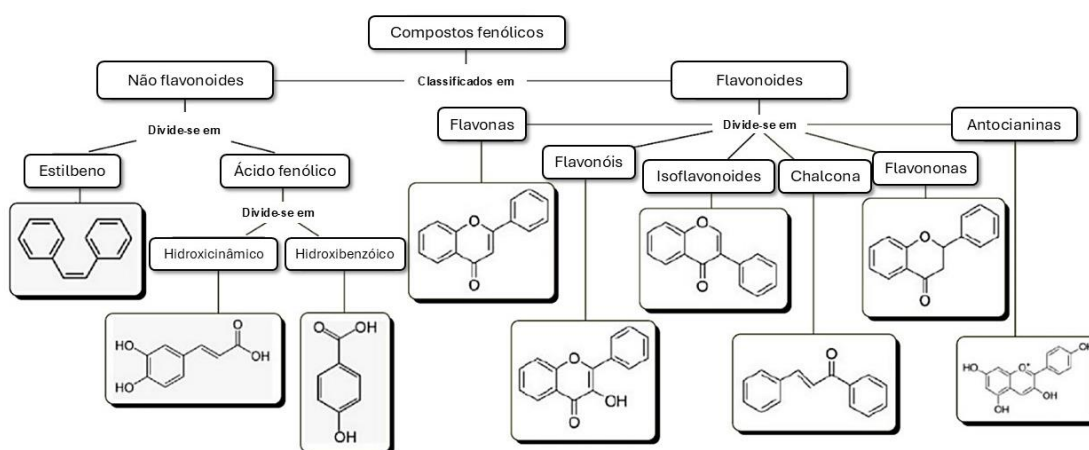
Os compostos fenólicos formam uma diversa classe de metabólitos secundários amplamente encontrados em representantes superiores do reino vegetal. Esses metabólitos secundários desempenham funções cruciais na fisiologia dos vegetais, como a pigmentação, proteção contra radiação ultravioleta, herbívoros e patógenos. Além disso,

trazem diversos benefícios à saúde humana a partir do consumo de alimentos ricos nesses biocompostos (SAGAR *et al*, 2018; MOTTA *et al.*, 2019).

Estruturalmente, os compostos fenólicos apresentam um anel aromático principal, no qual estão ligados um ou mais grupos (figura 2). Esses compostos apresentam uma grande diversidade estrutural, variando desde fenóis simples, contendo apenas um radical hidroxila ligado ao esqueleto carbônico central, até estruturas poliméricas mais complexas como a lignina e alguns taninos (JIMÉNEZ *et al*, 2015; NEGI, JAIN, 2022).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em várias subclasses, de acordo com seu anel benzênico principal e as cadeias substituintes ligadas a ele, formando compostos como os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e lignanas (DURAZZO *et al.*, 2019; SINGLA *et al*, 2019). Os flavonoides representam uma das maiores subclasses, englobando compostos como flavonóis (quercetina), flavonas, isoflavonas, antocianinas e flavanonas, sendo amplamente reconhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas e cardioprotetoras. (DIAS, PINTO, SILVA, 2021). Os taninos, divididos em hidrolisáveis e condensados, são responsáveis pela adstringência em alimentos como vinho e chá, além de possuírem propriedades antimicrobianas (HAMDI *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2021). Já as lignanas, encontradas em sementes de linhaça e grãos integrais, destacam-se por seus potenciais efeitos antioxidante, anti-inflamatório e anticâncer (TINIKUL *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2020; JANG *et al.*, 2022; OSMakov *et al.*, 2022).

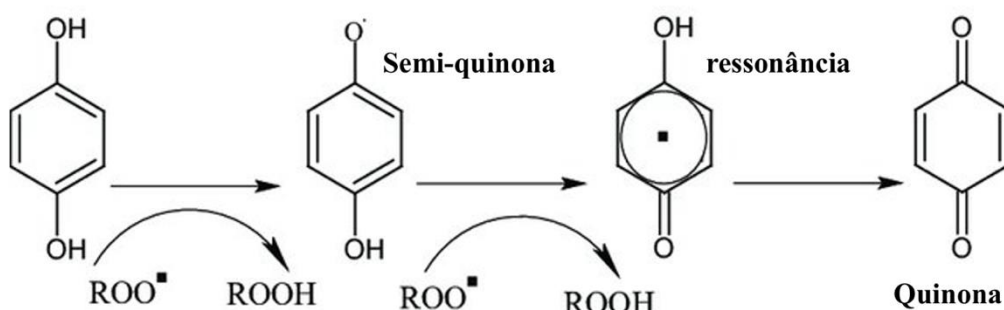
Figura 2 - Classificação estrutural de algumas classes de compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de SUBIRIA-CUETO *et al*, 2022.

A presença de radicais hidroxilados confere aos compostos fenólicos alta reatividade química e, conseqüentemente, um importante potencial antioxidante. Os grupos hidroxila (-OH) ligados aos anéis aromáticos da cadeia principal conferem a capacidade de neutralizar radicais livres por meio da doação de átomos de hidrogênio aos radicais livres (figura 3).

Figura 3 – Mecanismo geral de ação antioxidante de compostos fenólicos.



Fonte: adaptado de Ravichandran *et al.*, 2013.

Essa transferência resulta em um elétron desemparelhado, formando o radical fenóxi. Após a doação do átomo de hidrogênio, o radical fenóxi formado é estabilizado por ressonância, o que diminui sua reatividade. Assim, a capacidade antioxidante desses compostos depende, dentre vários fatores, do número de grupos hidroxila, da localização destes no anel aromático (posição orto, meta, para) e da presença de outros grupos funcionais na molécula (RAVICHANDRAN *et al.*, 2013).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos interrompe reações oxidativas em cadeia que poderiam causar danos às células, ajudando assim a proteger o organismo contra o estresse oxidativo, frequentemente associado ao envelhecimento celular e a diversas doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (OLSZOWY, 2019; ZEB, 2020).

Além da capacidade antioxidante, as diversas propriedades bioativas destes compostos como anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiplaquetários e antiproliferativos, fazem com que se tornem alvos importantes para formulação de novos produtos nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica como conservantes naturais e ingredientes funcionais. A diversidade estrutural e funcional desses compostos torna seu estudo relevante tanto para a saúde quanto para a inovação tecnológica em diferentes setores (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; CALEJA *et al.*, 2017; DE LIMA CHERUBIM *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos podem ser encontrados em diversas fontes vegetais, como frutas, chá verde, vinho tinto e cacau. A copaíba, uma leguminosa amplamente distribuída no Brasil e na América do Sul, também aparece na literatura científica como uma rica fonte desses metabólitos secundários (CARMO *et al.*, 2016). Diversos estudos apontam a presença de compostos fenólicos em várias espécies de copaíba, associando-os aos seus efeitos biológicos. Uma ampla análise feita por Arruda e colaboradores (2019) demonstrou a ocorrência, a composição química e as atividades biológicas de diversos compostos no gênero *Copaifera*. Os compostos encontrados em extratos orgânicos de diferentes partes da copaíba, como folhas, cascas do caule e da raiz, além das frutas e sementes, principalmente associados às atividades gastroprotetora, anti-inflamatórias e anticâncer.

Uma análise metabolômica feita por Antonio e colaboradores (2023) destaca a copaíba como uma das principais plantas medicinais do Brasil, apresentando ampla variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides glicosilados, quercetina e derivados do kaempferol e do ácido galoilquínico. Flavonoides como o kaempferol e quercetina, além de seus derivados heterosídeos, a quercitrina e a afzelina, também são encontrados em extratos hidroalcoólicos de copaíba, estando relacionados à capacidade quimioprotetora contra tratamento antineoplásico. Esses mesmos compostos também são apresentados com potencial gastroprotetor (ALVES, *et al.*, 2013; SENEDESE *et al.*, 2013; LEMOS, *et al.*, 2015; NOGUEIRA, FURTADO, BASTOS 2015; MOTTA *et al.*, 2017; OZELIN *et al.*, 2021).

2.5. INFLAMAÇÃO AGUDA

2.5.1. FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO AGUDA

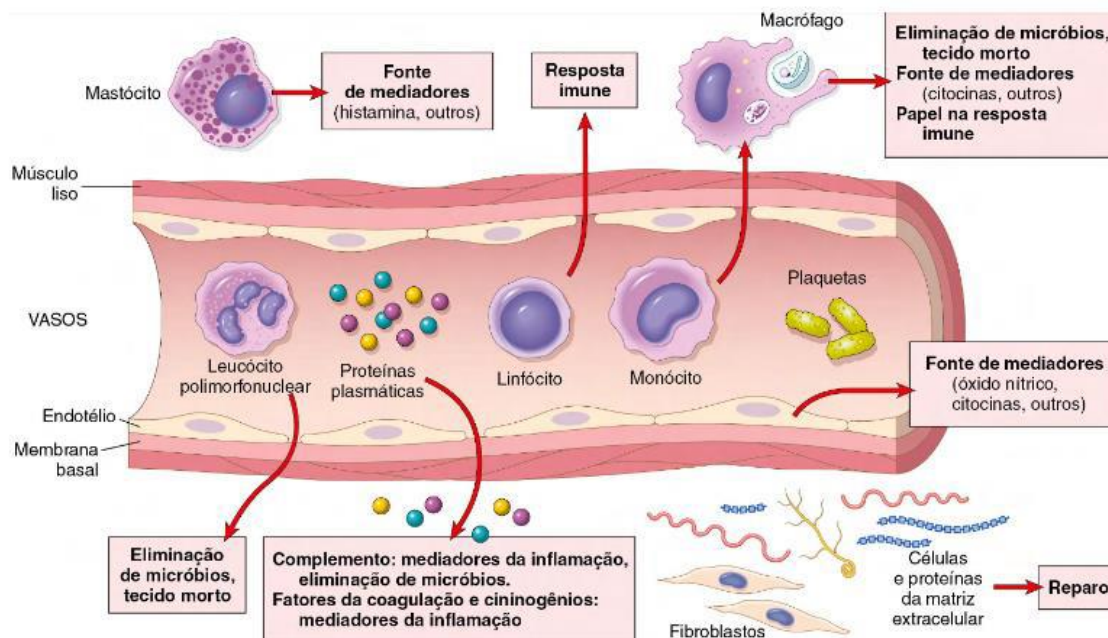
A inflamação é um processo complexo que ocorre quando há infecções ou lesões teciduais estimuladas por patógenos ou fatores irritantes. Estão envolvidas nesse processo células imunes, vasos sanguíneos e diversos mediadores. A inflamação também é um fenômeno associado a uma variedade de condições patológicas induzidas principalmente por fatores físicos, químicos, biológicos e psicológicos. O seu objetivo é limitar e eliminar as causas de dano ao organismo, removendo células e tecidos necróticos e em seguida iniciar a reparação. Duas formas distintas de inflamação são consideradas: aguda e crônica (AHMED *et al*, 2017; TRUONG *et al*, 2019).

A inflamação aguda é uma resposta fisiológica do organismo decorrente de um estímulo de origem exógena, na maioria das vezes causado por micro-organismos patogênicos, que levam a ativação do sistema imunológico (HUBER-LANG *et al*, 2018). Com isso, ocorre o aumento da permeabilidade vascular causada pela dilatação dos vasos sanguíneos, influenciando na migração leucocitária e na liberação de mediadores inflamatórios (LUDEWIG *et al*, 2019).

A vasodilatação é considerada uma das primeiras respostas ao estímulo inflamatório e é mediada pelas aminas vasoativas liberadas, como a histamina e a serotonina (Figura 4). Estas são liberadas especificamente pelos mastócitos e neutrófilos, que são células do sistema imune responsáveis justamente por intensificar o fluxo sanguíneo, caracterizando assim a fase vascular (FORSYTHE, 2019).

O principal papel da vasodilatação é a intensificação do fluxo sanguíneo associada ao aumento da permeabilidade vascular, o que facilita a migração leucocitária para o local da lesão. As proteínas que passam para o espaço extravascular ajudam os leucócitos em sua adesão ao endotélio, além de serem responsáveis pela formação do exsudato, que é um líquido rico em proteínas como a albumina e o fibrinogênio (FORSYTHE, 2019; GAUDET *et al.*, 2019; NETO, 2018).

Figura 4 - Processo inflamatório agudo.



(Fonte: Kumar *et al.*, 2018)

Esse processo inflamatório é classificado de acordo com as características do exsudato, de acordo com o tipo, duração e intensidade da agressão. Os mediadores envolvidos no processo agudo são as aminas vasoativas, metabólitos do ácido araquidônico, que incluem as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, o fator de ativação plaquetária (FAP), quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF), e citocinas, com as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6 e IL-18. Todos esses mediadores compõem uma complexa resposta fisiológica do organismo com o objetivo de neutralizar, inativar e eliminar o agente que iniciou o processo inflamatório, substituindo os tecidos danificados por fibrose, culminando com o reparo tecidual e bloqueio da resposta inflamatória (ETIENNE *et al.*, 2021).

No processo inflamatório patológico, mastócitos, monócitos, macrófagos, linfócitos, e outras células imunes são inicialmente ativadas pois, por possuírem função fagocitária, são as responsáveis por remover o agente patogênico e possibilitar o desenvolvimento dos eventos posteriores de reparo tecidual (KUMAR *et al.*, 2018).

A chegada das células fagocíticas no local da lesão resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são responsáveis por causar danos em diversas macromoléculas, incluindo o DNA. Ao mesmo tempo, essas células inflamatórias também produzem grandes quantidades de mediadores inflamatórios, como as citocinas, quimiocinas e prostaglandinas. Tais mediadores recrutam ainda mais macrófagos para o local da inflamação e ativam diretamente múltiplas cascatas de transdução de sinal intracelular e fatores de transcrição associados à inflamação. O NF- κ B, MAPK e a via de sinalização JAK-STAT estão envolvidas no desenvolvimento da via clássica da inflamação aguda (KAULMANN *et al*, 2014; AHMED *et al*, 2016).

2.5.2. MEDIADORES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO

O processo inflamatório acontece devido a eventos celulares e vasculares desencadeados por mediadores químicos inflamatórios tais como quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas. Esses mediadores podem ser sintetizados pelas células inflamatórias no próprio local da inflamação ou ser produzidos pelo fígado e encontrar-se circulando no plasma sanguíneo na forma de precursores inativos, que são ativados no local da inflamação, onde a sua maioria ligam-se a receptores específicos. Porém alguns, como é o caso das proteases, possuem uma atividade enzimática direta e outros, como os óxidos nítricos, causam danos oxidativos (IKEOKA, 2010).

Os mediadores que são produzidos na célula se dividem em pré-formados, isto é, a célula os produz e engloba em grânulos (histamina, serotonina, enzimas lisossômicas), além disso, existem os chamados recém-sintetizados que são formados no momento do processo (prostaglandinas, leucotrienos, fatores ativadores plaquetários, espécies ativas de oxigênio, óxido nítrico e citocinas). Por outro lado, os mediadores químicos produzidos no fígado ativam o sistema complemento e o fator XII; este último ativa o sistema cinina (KULINSKY, 2007).

As citocinas representam um grupo de proteínas que desempenham um papel importante em eventos da inflamação. Elas são sintetizadas por vários tipos celulares,

além de regular a imunidade inata e adaptativa. Outras citocinas são responsáveis por estimular os precursores da medula óssea para a formação de mais leucócitos, fazendo com que esses sejam substituídos durante o processo inflamatório e nas respostas imune. Molecularmente, as citocinas são conhecidas como interleucinas, indicando a sua capacidade de induzir a interação entre os leucócitos (GRUNNET *et al*, 2012; TAIPA *et al.*, 2019).

Esses mediadores podem ser divididos em grupos, sendo eles os fatores de crescimento (TGF), interferons (IFN), interleucinas (IL) e o fator de necrose tumoral (TNF). Este último é uma das principais classes das citocinas pró-inflamatórias, destacando-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), por ser liberado pelas células mononucleares no momento da lesão. Esta liberação resulta no recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da inflamação. As interleucinas também ocupam um papel importante no evento inflamatório, podendo ser divididas em pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-7) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13) (KUMAR *et al*, 2018; TAIPA *et al.*, 2019; GHAZAVI *et al.*, 2021).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que permitem a transferência de elétrons a moléculas próximas e que causam mudanças no ambiente molecular que interage. Eles apresentam ao menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos. Além de provocar lesões durante a resposta inflamatória, podem atuar também na hepatite alcoólica, complicações nos transplantes de órgãos e choque hemodinâmico (MARTELI *et al*, 2014).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que se forma nas células endoteliais, alguns neurônios e macrófagos, e é conhecido como um potente vasodilatador, a partir do relaxamento da musculatura lisa. Dessa forma, ele se destaca como um dos principais mediadores do processo inflamatório. A síntese do NO se dá a partir de uma enzima denominada óxido nítrico sintase (NOS), fazendo uso do aminoácido L-arginina. Esta enzima se apresenta em três tipos, sendo a iNOS a enzima responsável pela produção de NO na inflamação (FÖRSTERMANN *et al*, 2012; WINK *et al.*, 2011; GALVÃO *et al*, 2014).

Essa enzima pode ser ativada em duas formas. À medida que as enzimas óxido nítrico sintase, neural e endotelial se apresentam em baixas concentrações, pode ocorrer um

aumento no influxo de cálcio do meio, e consequentemente resultar no aumento da produção do NO. Uma segunda forma se dá por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível via macrófagos, estimulando assim a formação de outros mediadores, como o $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e $\text{IFN-}\gamma$ (KOBAYASHI, 2010).

Os efeitos do NO podem ser tanto pro-inflamatórios, causando a vasodilatação, como anti-inflamatório, apresentando a função de regular a resposta inflamatória. Além disso, este radical pode causar a inibição de alguns eventos da inflamação como a degranulação dos mastócitos, impedindo também a migração dos leucócitos (FARO *et al.*, 2014; BRAZ, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar química e biologicamente os extratos orgânicos de diferentes órgãos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae), a fim de elucidar seu potencial terapêutico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair metabólitos secundários presentes nas folhas, casca do caule e lenho da espécie *C. langsdorffii*;
- Identificar diversas classes de metabólitos secundários responsáveis pelas atividades biológicas dos extratos por meio de cromatografia líquida em camada delgada (CCD) e ensaios colorimétricos;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos por meio do sequestro do radical DPPH;
- Investigar o potencial antimicrobiano dos extratos obtidos, determinando a concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida e fungicida;
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos em cultura primária de macrófagos peritoneais;
- Determinar a capacidade anti-inflamatória dos extratos a partir da quantificação de interleucinas produzidas pelos macrófagos peritoneais estimulados por LPS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BOTÂNICO

As partes aéreas (folhas, casca do caule e lenho) de *Copaifera langsdorffii* Desf. foram coletadas no dia 05 de dezembro de 2019, na vila cooperativa Agrodóia, localizada na Serra dos Pau D'óia no município de Exú – PE (7°21'15.9"S 39°53'20.3"W), região de abrangência da Área de Proteção Ambiental (APA) Chapada do Araripe. A coleta foi devidamente autorizada pelo ICMBio e o material botânico foi herborizado e depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), identificado por A. Bocage, sob o nº 93.794.

4.2. EXTRAÇÃO

As folhas, a casca do caule e a madeira do lenho de *C. langsdorffii* foram separadas e secas em estufa a 45 °C. Após a secagem, cada parte foi triturada em moinho de facas e peneirada para separação de partículas não trituradas. Após este procedimento, 20 g de material pulverizado foi extraído individualmente, utilizando o sistema de extração de Soxhlet. Aproximadamente 500 mL dos solventes *n*-hexano, acetato de etila e metanol foram utilizados em cada etapa da extração, mantidos à respectiva temperatura de ebulição de cada solvente. Após o período de aproximadamente 6 horas de extração, o material foi concentrado por meio da evaporação do solvente, sob pressão reduzida. O rendimento total dos extratos foi determinado de acordo com a fórmula: $RTE = (QE/QP) \times 100$, sendo RTE = rendimento total do extrato (%); QE = quantidade obtida de extrato (g); QP = quantidade de pó da parte da planta utilizada na extração (g).

4.3. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) fêmeas de 4 a 6 semanas de idade, pesando entre 25 e 30 gramas. Os animais utilizados foram obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde estiveram aclimatados sob condições controladas de iluminação (ciclo de 12 h claro/escuro), temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45-65%), com acesso livre à água potável e ração. Todos os procedimentos experimentais que foram realizados estão de acordo com as leis brasileiras para experimentação com animais e foram submetidos à Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco.

4.4. ESTUDO FITOQUÍMICO

4.4.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA

A análise do perfil fitoquímico dos extratos foi realizada por meio da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), de acordo com a metodologia descrita por Richardson e Harbone (1990). Como fase fixa, foram utilizadas placas de sílica gel 60_{F254} (MERCK®) e diferentes solventes orgânicos foram utilizados como fase móvel, preparada especificamente de acordo com a polaridade dos metabólitos a serem analisados, conforme apresentado na Tabela 1.

Amostras dos extratos brutos na concentração de 7,5 mg/mL, solubilizados em metanol (MeOH):acetato de etila (ActOEt) (2:1 v/v), foram aplicadas longitudinalmente na parte inferior da placa cromatográfica e estas foram colocadas em contato com o sistema de eluição, onde, por meio da capilaridade, os solventes da fase móvel realizaram a separação dos metabólitos constituintes. Posteriormente, as placas foram reveladas de acordo com a classe dos compostos investigados (RICHARDSON; HARBORNE, 1990).

Tabela 1 – Classes de metabólitos secundários, padrões e sistemas de eluição utilizados na análise fitoquímica dos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae), por meio da cromatografia em camada delgada (CCD).

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Sistema de eluição	Agente cromogênico	Referências
Flavonoides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina, rutina e ácido clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt, 1996 Brasseur & Angenot, 1986
Triterpenos e esteroides	β-sitosterol	Tolueno-AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Diterpenos	Ácido copálico	Hexano-AcOEt (90:10 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
Mono e sesquiterpenos	Timol	Tolueno-AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner & Bladt, 1996
Saponinas	Saponinas	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Lieberman & Burchard Vanilina sulfúrica	Harborne, 1998
Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts <i>et al.</i> 1957
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	AcOEt-Tolueno-HCOOH (10:3:1 v/v)	Alúmen de ferro 1%	Stiasny, 1912

4.4.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DE FENÓIS TOTAIS

Os extratos de *C. langsdorffii* foram submetidos à quantificação dos compostos fenólicos por meio da metodologia proposta por Li et al. (2008) com adaptações.

Alíquotas de 20 µL dos extratos (1 mg/mL) foram adicionados em uma placa de 96 poços. Para padronização do teste, foi realizada uma curva de calibração com ácido gálico (100 – 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 700 – 800 – 900 – 1000 µg/mL), a fim de se obter a equação referente à regressão não-linear. Foi adicionado a todos os poços 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v em dH₂O) e reservado no escuro por três minutos. Após o período, foi adicionado mais 80 µL de Carbonato de Sódio (7,5%) aos poços, seguindo para a leitura após 2 horas de reação. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 735 nm. Os resultados foram expressos pela proporção de miligramas equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g de extrato).

4.4.3. DOSAGEM DE FLAVONOIDES

Utilizou-se a técnica descrita por Pękal e Pyrzynska (2014), com algumas adaptações, para quantificar o conteúdo de flavonoides nos extratos. Inicialmente, foi realizada uma curva padrão de quercetina (0 – 50 – 100 – 150 – 200 – 250 – 300 – 350 – 400 – 450 – 500 µg/mL) para parametrização dos dados. Alíquotas de 100 µL dos extratos (1mg/mL) foram misturadas com 50 µL cloreto de alumínio (2% p/v) e 50 µL de acetato de sódio (1 M) e agitadas vigorosamente para efetivar a reação. Após 10 minutos, as amostras foram dispostas em uma placa de 96 poços e levadas à leitura em espectrofotômetro a 425 nm. O teor de flavonoides nas amostras avaliadas foi expresso como o equivalente em miligramas de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g de extrato).

4.4.4. DOSAGEM DE PROANTOCIANIDINAS

A quantidade de proantocianidinas foi estimada de acordo com a metodologia descrita por Sun *et al.* (1998). A catequina foi utilizada como controle de calibração na regressão não-linear absorvância/concentração (0 – 100 – 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 700 – 800 – 900 – 1000 µg/mL). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 40µL de cada amostra e, posteriormente misturados com 100 µL de vanilina (1 %) e 100 µL de ácido sulfúrico (20%), ambos diluídos em metanol. As amostras foram incubadas durante 15 minutos a 30 °C. Após o tempo de incubação, seguiu-se para a leitura em espectrofotômetro, a 500 nm. O resultado foi expresso baseado na equivalência em miligramas de catequina por grama de extrato (mg EC/g de extrato).

4.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1. SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES

A capacidade sequestradora de radicais livres dos extratos foi avaliada pelo método DPPH. Neste ensaio, o radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH) tem a capacidade de doar hidrogênios, sendo estes adquiridos pelos agentes antioxidantes presentes no meio (BLOIS, 1958).

Em uma microplaca de 96 poços, 40 µL de extrato em diferentes concentrações (62,5 – 125 – 250 – 500 – 1000 µg/mL) foram distribuídas em triplicata e, em seguida, adicionados 250 µL da solução de DPPH (1mM). Após 30 minutos de reação, as placas foram quantificadas por espectrofotometria a 517 nm. O sequestro de radicais livres foi determinado pela fórmula: $SRL (\%) = (Abs \text{ controle} - Abs \text{ amostra}) \times 100 / Abs \text{ controle}$, onde o controle refere-se apenas a absorvância do DPPH, sem amostra. Os resultados foram expressos a partir do valor da concentração de eficiência média (EC₅₀), expressa em µg/L ± EPM (Erro Padrão da Média), que corresponde a concentração do antioxidante necessária para reduzir 50% da quantidade inicial de radicais livres.

4.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada utilizando o teste de susceptibilidade para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB). As cepas utilizadas foram obtidas da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos – UFPE (UFPEDA). Colônias dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416) e *Candida albicans* (UFPEDA 1007) foram suspensas em solução salina 0,9%, sendo a suspensão ajustada em espectrofotômetro a 625 nm, correspondente a uma concentração final de $1,5 \times 10^4$ UFC/mL para bactérias e $1,5 \times 10^5$ UFC/mL para *C. albicans*, de acordo com a escala de McFarland.

4.6.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Neste ensaio, os extratos foram diluídos em um intervalo de concentrações (1024 – 512 – 265 – 128 – 64 – 32 µg/mL) e posteriormente adicionado 10 µL da suspensão padronizada de micro-organismo em meio líquido Muller-Hinton (MH). Foram também reservados os devidos poços para controle de esterilidade e crescimento. As placas foram incubadas com os extratos durante 24 horas a 37 °C. Após esse tempo, o crescimento microbiano foi indicado pela adição de 20 µL de solução aquosa de resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich), com nova incubação a 37 °C durante 2 horas. A CIM foi definida como a concentração mais baixa onde não houve a oxidação-redução do corante, indiretamente, sem atividade microbiana. Todas as concentrações testadas e todos os tratamentos foram realizados em triplicata, em pelo menos três experimentos independentes.

4.6.2. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) E FUNGICIDA (CMF)

Para a determinação da CMB e da CMF foi repicada uma alíquota de cada concentração dos extratos em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Müller-Hinton, variando da concentração de 1,56 a 1024 µg/mL. Estas placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, foi considerada como bactericida ou fungicida a menor concentração dos extratos onde não houve crescimento do microrganismo sobre a superfície da placa de cultura.

4.7. ISOLAMENTO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS

A obtenção dos macrófagos peritoneais murinos seguiu-se de acordo com Ray e Dittel (2010). A proliferação dos macrófagos foi estimulada pela administração única de 1 mL de solução de tioglicolato de sódio estéril a 3,8% (p/v) na cavidade peritoneal dos animais, permanecendo o estímulo por 3 dias. Após esse período, os animais foram eutanasiados por asfixia em câmara de CO₂ e seguiram para o isolamento dos macrófagos. Todos os procedimentos foram realizados em cabine de segurança biológica. Após a antissepsia do abdômen do animal com álcool 70%, foi realizada a exposição do peritônio. Utilizando seringa e agulha descartável estéreis, foi injetada na cavidade abdominal, tomando cuidado para não perfurar nenhum órgão, 10 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) pH 7.3. Após massagear suavemente o abdômen, a suspensão de células foi recolhida utilizando seringa e agulha, e transferida para tubos de centrifugação estéreis. O lavado peritoneal de cada animal foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 2 mL de PBS para homogeneização, seguindo para nova centrifugação. Ao final, as células foram ressuspensionadas em 3 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com 10% de soro fetal bovino (SFB). Dessa suspensão foi retirada uma alíquota para contagem da concentração de células em câmara de Neubauer. Após a determinação da concentração celular, foram preparadas alíquotas de acordo com a necessidade do procedimento experimental utilizado no ensaio da atividade biológica investigada.

4.8. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A atividade citotóxica foi determinada pelo método da Sulforrodamina-B (SRB) descrito por Skehan et al. (1990), utilizando cultura primária de macrófagos isolados do peritônio de camundongo (MPM).

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ L, em cada poço, de uma suspensão de 3×10^5 células/mL em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) e aguardado um período *overnight* para aderência das células à superfície da placa. Após a aderência, os extratos, previamente dissolvidos em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO), foram adicionados aos poços em diferentes concentrações (100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,125 – 1,56 μ g/mL), a fim de encontrar a CI_{50} (concentração média capaz de inibir 50% da viabilidade celular).

Após a incubação, as placas foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 durante 24 horas de tratamento. Após esse tempo, todo o sobrenadante foi retirado e as células foram fixadas com 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e mantidas em geladeira (4 °C) durante 1 hora. Posteriormente, todo o sobrenadante foi novamente retirado e cada poço lavado com água destilada. Após secagem das placas à temperatura ambiente, foi adicionado em cada poço 100 μ L da solução de Sulforrodamina B (SRB) a 0,4% e deixado em incubação durante 30 minutos em estufa. Após a incubação, realizou-se a lavagem de cada poço com ácido acético 1%, e o corante ligado às proteínas foi solubilizado com 200 μ L do tampão Tris Base a 10mM, sob agitação durante 10 minutos. Posteriormente, as microplacas seguiram para leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados três experimentos independentes testados em triplicata.

4.9. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA IN VITRO

A capacidade anti-inflamatória dos extratos foi determinada pela quantificação de óxido nítrico (NO) e citocinas produzidos por macrófagos peritoneais murinos (MPM) estimulados por lipopolissacarídeo da parede celular bacteriana (LPS), obtidos conforme descrito anteriormente.

De uma suspensão celular na concentração de 10^6 células/mL, foram adicionados 500 μ L em cada poço de uma placa de 24 poços. As placas foram incubadas em estufa, a 37°C e 5% de CO₂, por um período *overnight* para adesão das células à superfície do poço. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e um novo meio de cultura contendo 5 μ g/mL de LPS foi adicionado a cada poço, exceto no grupo controle negativo. Após 1 hora, foram adicionados aos poços alíquotas dos extratos em teste, de modo a atingirem a concentração final de 25 μ g/mL. A dexametasona (5 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo de inibição oxidativa. Os macrófagos foram tratados durante 24 horas e, após esse período, os sobrenadantes de cada poço foram coletados, seguindo para a posteriores quantificações.

4.9.1. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A concentração de NO foi avaliada indiretamente pelo acúmulo de nitrito no meio de cultura, que é um produto oxidado estável do NO, utilizando o reagente de Griess. (TSIKAS, 2007). Foi adicionado o mesmo volume (100 μ L) do sobrenadante coletado do ensaio de cultura celular ao reagente de Griess (1% de Sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1% de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina em ácido fosfórico 5%). Após 10 minutos de incubação, a absorbância foi medida em leitor de placas no comprimento de onda 540 nm. A concentração média de nitrito das amostras foi determinada baseada na equação da reta proporcional à relação absorbância/concentrações nitrito (NaNO₂), resultantes uma diluição seriada (0 – 0,4 – 0,8 – 1,56 – 0,39 – 0,78 – 1,56 – 3,125 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 μ g/mL).

4.9.2. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Do sobrenadante coletado dos ensaios celulares, foi investigada a concentração de citocinas associadas à inflamação, como IL-6, IL-10 e TNF- α , seguindo de acordo com as instruções do fabricante.

No primeiro dia, a placa de ELISA foi sensibilizada com 100 μ L de anticorpo de captura por poço na concentração de 5,6 μ g/mL, diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. A placa foi vedada e incubada a 4 °C *overnight* sob agitação. No segundo dia, a placa foi lavada três vezes utilizando solução de lavagem constituída de PBS com 0,05% de Tween 20. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L por poço da solução ELISA/ELISPOT, fornecida pelo *kit*, e incubada em temperatura ambiente por uma hora sob agitação constante no agitador automático de placas de ELISA. A placa foi novamente lavada três vezes com solução de lavagem e, em seguida, foram adicionados em duplicata 100 μ L das amostras, dos padrões e do branco (solução diluente das amostras, ELISA/ELISPOT). Após o vedamento da placa, ela foi novamente incubada a 4 °C *overnight* sob agitação. No terceiro dia, a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem e foram adicionados 100 μ L por poço do anticorpo de detecção diluído em ELISA/ELISPOT. Em seguida, a placa foi incubada em temperatura ambiente por uma hora, sob agitação constante. Após este período, a placa passou pelo processo de lavagem quatro vezes, sendo então, adicionados 100 μ L por poço de solução estreptavidina conjugada à peroxidase, e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos no agitador de placas. A placa foi novamente lavada cinco vezes e foram adicionados 100 μ L por poço da solução cromógeno/substrato contendo 4mg/mL de solução substrato TMB (Tetrametilbenzidina) em 10 mL de tampão citrato e 2 μ L de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) por 15 minutos e abrigado da luz. A reação foi interrompida com a adição de 100 μ L por poço da solução de parada (2N de H₂SO₄).

A leitura da placa de ELISA foi realizada em espectrofotômetro com filtro de referência de 450 nm e 570 nm, utilizando a diferença entre as absorbâncias para determinar as concentrações dos marcadores a partir da curva-padrão através do programa *GraphPad Prism* v. 8.0. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas pelo menos três ensaios independentes de todos os experimentos para garantir a independência e correlação dos resultados. Os resultados foram expressos como valores de média $\pm$ erro padrão da média (EPM), avaliados por meio da análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. Foi utilizado o *software GraphPad Prism* (v. 8.0) e os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MATERIAL BOTÂNICO

A planta utilizada foi a espécie *Copaifera langsdorffi* (Desf), conhecida popularmente como copaíba. Seu uso é amplamente descrito na literatura por possuir diversas propriedades medicinais, além da sua ampla distribuição pela área da Chapada do Araripe. A copaíba destaca-se dentre as diversas plantas da região por possuir a maior diversidade de usos medicinais, de acordo com a população local, com aplicações contra gripes e dores em geral, inflamações e na cicatrização de feridas (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Foram utilizadas diferentes partes da planta, como as folhas, a casca do caule e a madeira do lenho, a fim de investigar o perfil de distribuição dos metabólitos secundários presentes na mesma, com o objetivo de elucidar as partes com o maior potencial bioativo. Embora a copaíba seja amplamente utilizada para fins medicinais, como descrito anteriormente, muito se explora o oleorresina que é extraído do seu caule (CARMO *et al.*, 2016; DA TRINDADE; DA SILVA; SETZER, 2018). Poucos estudos são encontrados descrevendo a composição e as atividades biológicas dos componentes extraídos das partes da planta com os métodos extrativos apresentados no presente estudo. Dados da literatura descrevem a composição e a atividade biológica de extratos hidroalcóolicos das folhas e da oleorresina, como funções gastroprotetora e cicatrizante (BRANCALION *et al.*, 2012; MOTTA *et al.*, 2017; NOGUEIRA; FURTADO; BASTOS, 2015; RICARDO *et al.*, 2018).

5.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para garantir a eficiência da extração dos metabólitos secundários, se faz necessário selecionar e preparar cuidadosamente as partes da planta a ser trabalhada, assim como planejar bem todo processo extrativo. É importante também minimizar a interferência de fatores que possam prejudicar a extração ou causar a decomposição dos

compostos desejados. Portanto, todo o procedimento deve ser bem planejado (JONES; KINGHORN, 2012).

Todo o material coletado foi processado, seco e triturado no Laboratório de Etnofarmacologia no Departamento de Antibióticos – CB da Universidade Federal de Pernambuco.

Após a moagem, os materiais pulverizados (folhas, casca do caule e madeira do lenho) foram submetidos cada um à extração quente em sistema fechado, por exaustão de solvente em aparelho de Soxhlet durante aproximadamente 6 horas (figura 5). Os diferentes métodos extrativos são baseados no contato do material sólido com o solvente, e a extração em Soxhlet está entre as formas mais eficientes e comumente utilizadas (ABUBAKAR; HAQUE, 2020; CHUO *et al.*, 2022). Este processo permite que o material vegetal entre em contato com o solvente renovado, possibilitando uma extração altamente eficiente. Os solventes utilizados foram o n-Hexano, Acetato de Etila e Metanol, aproximadamente 500 mL de cada.

Figura 5 - Processo de extração utilizando o aparelho de Soxhlet.



(Fonte: Autor)

Passado o período de extração, os produtos obtidos foram submetidos à rotoevaporação, para a retirada dos solventes por meio da redução da pressão, até se obter um conteúdo semissólido, pastoso. Estes foram armazenados em frascos de vidro (tubos

de penicilina) e mantidos destampados em temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente e se obter um extrato mais seco possível. Após o processo de máxima secagem, os frascos foram devidamente identificados, selados e mantidos em congelador, à temperatura aproximada de -20°C.

Antes da utilização dos extratos, o rendimento de cada extração foi calculado. Para isso, a massa de cada frasco que os extratos seriam acondicionados foi previamente aferida. Após a evaporação completa dos solventes, foi possível quantificar a massa de extrato restante dentro dos frascos e consequentemente calcular o rendimento de cada extração, a partir da proporção entre a quantidade de material vegetal utilizado e o obtido após o processo, conforme apresentado na tabela 2, a seguir.

Tabela 2 - Rendimento de cada extração calculado a partir da massa de amostra utilizada e a quantidade obtida após as extrações.

#	Extrato	Quantidade de material (g)	Massa Final (g)	Rendimento (%)
1	Hexano_folhas	20	1,1203	7,47
2	Acetato de etila_folhas	20	1,68693	11,25
3	Metanol_folhas	20	2,70385	18,03
4	Hexano_casca	20	0,21078	1,41
5	Acetato de etila _casca	20	0,22813	1,52
6	Metanol_casca	20	2,02414	13,49
7	Hexano_lenho	15	0,02297	0,15
8	Acetato de etila _lenho	15	0,2219	1,48
9	Metanol_lenho	15	0,31475	2,10

Foi observado que os extratos metanólicos apresentaram maior rendimento de acordo com as partes utilizadas da planta, sendo a extração das folhas a que obteve melhor aproveitamento, com cerca de 18%, seguido do extrato da casca do caule, com 13,5%, e do lenho, com 2%. Esta diferença de rendimento pode ser atribuída à diferença de polaridade dos solventes utilizados, a qual desempenha um papel fundamental na solubilidade dos compostos fitoquímicos, determinada pelas suas diferenças estruturais (FELHI *et al.*, 2017). A polaridade e o tipo de solvente, o tempo e a temperatura de extração, assim como as características físicas e químicas do material vegetal são importantes fatores que influenciam na realização das extrações (SALIH *et al.*, 2021).

Os principais constituintes obtidos nas extrações vegetais são os compostos fenólicos, flavonoides e taninos, de acordo com as diferenças de polaridade dos solventes utilizados. O hexano, acetato de etila e metanol são os mais utilizados para a extração de polifenóis, flavonoides e taninos, respectivamente (CHEYNIER, 2012). Entretanto, em comparação aos diferentes tipos de solventes, o metanol recebe destaque por também se mostrar eficiente na extração de compostos fenólicos (FAGBEMI *et al.*, 2022; MAHDIPOUR *et al.*, 2012; THIEN *et al.*, 2020). Assim, é possível sugerir que o maior rendimento das extrações metanólicas das diferentes partes de *Copaifera langsdorffii* possa estar relacionado com a maior presença desses compostos na espécie, uma vez que alguns estudos demonstram a presença de polifenóis em diferentes espécies de Copaíba (ARRUDA *et al.*, 2019; BATISTA *et al.*, 2016).

5.3. ESTUDO FITOQUÍMICO

5.3.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA

O perfil cromatográfico dos extratos orgânicos de *C. langsdorffii* demonstrou a presença de diversos metabólitos secundários, conforme apresentado na Tabela 4. Dentre os compostos analisados, foram encontrados em maior quantidade flavonoides, terpenos, esteroides e cumarinas na maioria dos extratos, enquanto saponinas e proantocianidinas apareceram apenas nos extratos 5 e 6. Dados da literatura demonstram que a oleoresina e alguns extratos orgânicos da copaíba possuem diferentes metabólitos secundários, como terpenos e flavonoides. Esses compostos frequentemente são associados a diversas

atividades biológicas, o que reforça o uso dessa planta na medicina tradicional. A oleoresina de diferentes espécies de copaíba demonstrou potencial atividade antitumoral e anti-inflamatória, sendo essas atividades associadas à presença de alguns diterpenos e sesquiterpenos, os quais são considerados como marcadores químicos do gênero em estudo (CARNEIRO *et al.*, 2020; MANGABEIRA DA SILVA *et al.*, 2020).

Tabela 3 – Prospecção fitoquímica dos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae).

Classe de metabólitos secundários	<i>Copaifera langsdorffii</i>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Flavonoides	-	+++ ¹	+++ ¹	tr ²	+ ²	++ ²	-	-	-
Derivados cinâmicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	tr	tr	+	++	-	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos e Esteroides	+	+	-	+++	+++	+	++	++	+
Diterpenos	+++	++	-	+++	++	+	++	+	tr
Monoterpenos e Sesquiterpenos	+++	++	-	+++	++	+	++	tr	tr
Cumarinas	+	++	-	+++	+++	+	++	+++	+
Quinonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proantocianidinas	-	-	-	-	+ ³	+ ⁴	-	tr	-
Taninos hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-

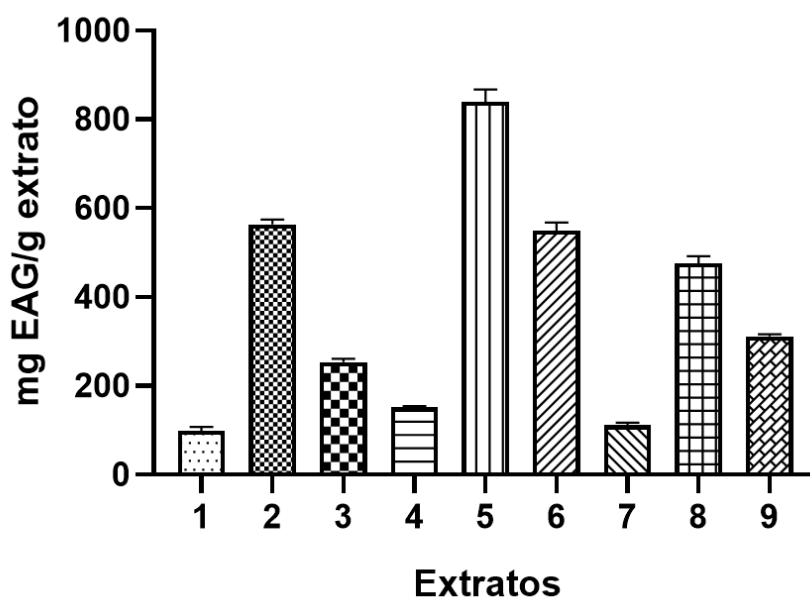
1: heterosídeos de flavonoide 3'-OH e 4'-OH; 2: heterosídeos de flavonoide 3'-OH; 3: proantocianidinas oligoméricas; 4: proantocianidinas poliméricas. (+++) forte; (++) moderada; (+) fraca; (-) ausente; (tr) traços.

5.3.2. ANÁLISE FITOQUÍMICA QUANTITATIVA

Após todo o processo de preparação dos extratos, foi avaliada a quimiodiversidade de cada um dos nove extratos obtidos. O tipo de extração desempenha um papel fundamental na obtenção de diversos metabólitos, onde cada solvente consegue interagir de maneira específica com uma gama diversificada de compostos fitoquímicos.

Para a quantificação fitoquímica, inicialmente foi investigada a presença de compostos fenólicos nas amostras dos extratos, tendo como referência a presença de ácido gálico. A figura 6 apresenta o gráfico que demonstra o equivalente de ácido gálico (mg) por grama de amostra. É possível identificar que os extratos com maior teor de fenóis totais foram os que utilizaram o acetato de etila como solvente, respectivamente os extratos 2, 5 e 8, seguidos pelos extratos metanólicos (3, 6 e 9). É importante destacar que o extrato acetatoético da casca do caule foi o que apresentou maior quantidade de fenóis totais no doseamento.

Figura 6 - Dosagem de compostos fenólicos totais a partir do equivalente de ácido gálico nos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)



Os compostos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila, e geralmente são categorizados como ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas e taninos (SIERRA-CRUZ *et al.*, 2021). Embora estudos com extratos similares de Copaíba sejam escassos na literatura, vegetais da mesma família (Fabaceae) apresentam perfil semelhante quando comparados. O trabalho de Oliveira Rodrigues e colaboradores (2020) demonstra que a fração acetato de etila do extrato de *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) apresenta altas concentrações de compostos fenólicos.

Os fenóis são substâncias vegetais de extrema importância devido suas diversas atividades biológicas, como a citotoxicidade em células cancerígenas, efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antimicrobianos (BOUZIANE *et al.*, 2018; EL YADINI *et al.*, 2023; SOLTANI *et al.*, 2023). Tanee *et al.* (2007) demonstraram que, no extrato acetotílico da casca do caule de *Erythrina lysistemon* Hutch (Fabaceae), foram encontrados diversos polifenóis, como isoflavonoides, flavonas, flavanonas chalconas e lignanas. A extração metanólica da casca de *Senna racemosa* (Fabaceae) também apresentou compostos fenólicos, como algumas antraquinonas, que demonstraram atividade antiparasitária (CAAMAL-FUENTES *et al.*, 2016). *Sophora flavescens* Ailton (Fabaceae), outra leguminosa, apresenta alguns flavonoides, como quercetina, rutina e kushenol C, nos extratos das partes aéreas. Esses fenóis desempenham respostas antioxidantes e anti-inflamatórias pela regulação da expressão de importantes proteínas envolvidas nesses processos, como cinases e citocinas (OH *et al.*, 2023).

Diante do exposto, foi investigado o perfil fenólico dos compostos encontrados nos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii*, a partir do doseamento de flavonoides e proantocianidinas (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Dosagem de flavonoides, a partir do equivalente de quercetina, nos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae).

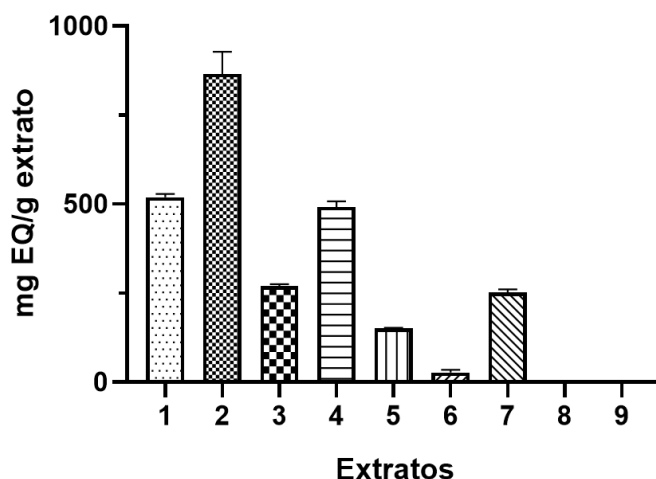
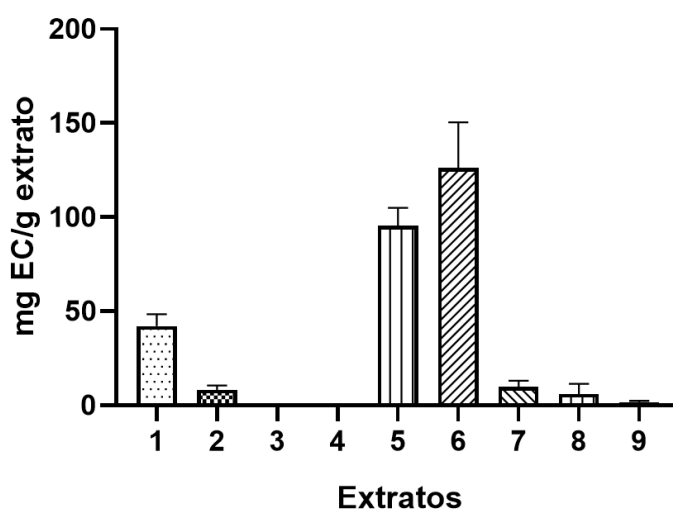


Figura 8 - Dosagem de proantocianidinas, a partir do equivalente de catequina, nos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae).



Os flavonoides, biossintetizados no metabolismo secundário dos vegetais a partir da via dos fenilpropanóides, constituem o maior grupo de compostos fenólicos que ocorrem na natureza. Embora possam ser encontradas em diversas formas estruturais, a maioria dos flavonoides possui 15 átomos de carbono no núcleo fundamental, constituído de duas

fenilas, ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, formando três núcleos A, B e C (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Eles podem ser divididos em várias classes de acordo com o nível de oxidação do anel central (anel C), sendo as classes mais comuns as antocianinas, flavonas e flavonóis (A. HUSSEIN; A. EL-ANSSARY, 2019).

Os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, são compostos que possuem sua estrutura baseada em flavonoides precursores. A utilização de drogas contendo proantocianidinas também apresentam atividades farmacológicas descritas na literatura, como anti-inflamatórias, antioxidantes e antiapoptóticas (HAN *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2015; ÖZKAN *et al.*, 2012). Devido a esse amplo espectro terapêutico, essa classe é de especial interesse para a farmacologia.

Na figura 5, é possível observar um alto teor de flavonoides principalmente no extrato 2. Nos extratos 1, 4 e 7 também se nota uma presença considerável desses metabólitos. Os extratos metanólicos (3, 6 e 9) foram os que apresentaram pouca ou nenhuma expressão significativas de flavonoides. Motta *et al.* (2019) descreve que os flavonoides são os principais compostos fenólicos encontrados nas folhas de *C. langsdorffii*, podendo a quantidade do composto variar de acordo com a localização geográfica que as plantas são coletadas.

Além da variação de acordo com o órgão vegetal, a presença de flavonoides depende da metodologia de extração, bem como a polaridade dos solventes utilizados. Diferentes partes da planta contêm diferentes níveis de metabólitos secundários com polaridades específicas, necessitando assim solventes com determinadas polaridades para uma extração eficiente (BODOIRA *et al.*, 2022; WAKEEL *et al.*, 2019).

A quercetina e a afzelina são dois principais flavonoides encontrados em extratos das partes aéreas de *C. langsdorffii*, demonstrando um efeito antígeno-tóxico em modelos celulares. Além disso, esse efeito pode estar associado à capacidade antioxidante desses metabólitos (ALVES *et al.*, 2013; OZELIN *et al.*, 2021). Esses compostos também demonstraram atividades associadas à inflamação, como a diminuição dos níveis de óxido nítrico e redução do edema de pata em camundongos (FURTADO *et al.*, 2015).

As proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados, são polímeros formados a partir condensação de dois ou mais núcleos de flavonoides (JONKER; YU,

2017). Esses metabólitos, assim como todos os polifenóis, apresentam diversas atividades biológicas amplamente descritas na literatura, sem causar efeitos tóxicos após seu consumo, conforme revisa Zeng e colaboradores (2020).

Analisando os extratos utilizados, foi possível identificar uma presença proeminente de proantocianidinas nas amostras da casca do caule de *C. langsdorffii*, estando em maior quantidade quando extraída com solventes de maior polaridade, como o acetato de etila e o metanol (Figura 6). A literatura demonstra a presença desses compostos em extratos etanólicos da casca do caule de algumas leguminosas, popularmente conhecidas como acácia e verônica. Além da sua presença, as proantocianidinas, como a grande maioria dos compostos fenólicos, também estão associadas às atividades farmacológicas como antioxidante, antidiabética anticâncer e antimicrobiana. A fração acetato de etila da casca do caule da copaíba, avaliada no presente estudo, também demonstrou atividade semelhante (CHEN *et al.*, 2018; DE MOURA *et al.*, 2020; OGAWA; YAZAKI, 2018; XIONG *et al.*, 2017).

Diante das propriedades farmacológicas associadas aos compostos fenólicos, conforme exposto na literatura científica, o presente estudo buscou investigar a relação dos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* com as atividades biológicas descritas, a partir de ensaios que quantificam a capacidade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória do material obtido.

5.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo é causado pelo desbalanço entre a produção inevitável de radicais livres e a presença de agentes antioxidantes que eliminam essas espécies no organismo. Assim, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um dos principais fatores que desencadeiam o surgimento de várias doenças degenerativas, como inflamação, distúrbios cardiovasculares, mutagênese e câncer (SENONER; DICHTL, 2019; VALKO *et al.*, 2006). Diante disso, há um constante interesse na descoberta, obtenção e desenvolvimento de substâncias com capacidades antioxidantes. Os vegetais

recebem destaque por serem uma importante fonte de compostos com tais propriedades (AMAROWICZ; PEGG, 2019).

Diversos produtos do metabolismo secundário de vegetais estão associados à atividade antioxidante, em especial os compostos fenólicos, conforme discutido anteriormente. A família vegetal Fabaceae, a qual pertencem as Copaíbas, é uma das que mais apresentam polifenóis, e diversos estudos correlacionam o consumo dessas leguminosas com a redução da incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo, devido ao seu conteúdo fenólico (LI *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2014).

O presente estudo investigou a capacidade redutora de radicais livres de oxigênio dos extratos orgânicos obtidos das partes coletadas de *C. langsdorffii*, por meio do ensaio do sequestro do radical DPPH•. Este radical livre, estável à temperatura ambiente, possui uma coloração violeta devido a presença de um elétron sobressalente no interior da molécula. Quando na presença de uma molécula antioxidante, o DPPH recebe elétrons e se transforma em sua forma reduzida, resultando no aparecimento de uma solução amarelada. Este ensaio é uma maneira fácil, rápida, barata e amplamente utilizada para avaliar por espectrofotometria a capacidade de compostos agirem como antioxidantes ou doadoras de elétrons (KEDARE; SINGH, 2011).

A tabela 3 apresenta os valores da EC₅₀ respectivos aos extratos avaliados, quanto a sua capacidade de reduzir a quantidade do radical DPPH do meio, indicando assim seu potencial antioxidante. Embora alguns não o considerem como um método apropriado, o DPPH é um radical utilizado há quase 100 anos, devido à sua estabilidade e capacidade de quantificação colorimétrica. Assim, o sequestro desse radical é amplamente relacionado à habilidade antioxidante de alguns compostos naturais, como os compostos fenólicos, dentre outros (FOTI, 2015).

Tabela 4 – Atividade antioxidante dos extratos de *C. langsdorffii* Desf. (Fabaceae) avaliada pelo método de DPPH. Os valores de EC₅₀ estão expressos em µg/mL ± EPM.

#	Extrato	EC ₅₀ (µg/mL)
1	Hexano_folhas	>1000
2	Acetato de etila_folhas	160 ± 41,89
3	Metanol_folhas	299,30 ± 23,08
4	Hexano_casca	>1000
5	Acetato de etila_casca	68,09 ± 9,5
6	Metanol_casca	40,87 ± 32,65
7	Hexano_lenho	>1000
8	Acetato de etila_lenho	275,40 ± 16,83
9	Metanol_lenho	267,80 ± 14,49

Um composto é considerado como um bom antioxidante quando é capaz de interagir com radicais livres do meio e transferir elétrons ou átomos de hidrogênio, a fim de torná-los estes últimos estáveis e impedir que interajam com moléculas celulares importantes, causando assim o estresse oxidativo. Este estresse é amplamente associado como responsável pelo surgimento de diversas condições patológicas como câncer e inflamação (SANTOSH KUMAR; PRIYADARSINI; SAINIS, 2002).

Dentre os nove extratos avaliados, foi possível observar que as extrações utilizando o solvente *n*-hexano não apresentaram potencial antioxidante, sem redução significativa na quantidade de DPPH livre, sendo as EC₅₀ encontradas superiores a 1000 µg/mL. Já os extratos utilizando acetato de etila e metanol apresentaram valores de EC₅₀ razoáveis, quando considerado o erro padrão da média, sendo os extratos da casca do caule os que apresentaram menor concentração de EC₅₀. Esses dados podem ser

associados aos dados das dosagens de fenóis totais, apresentados anteriormente, os quais sinalizam uma maior concentração desses compostos na casca.

A literatura amplamente descreve a relação dos polifenóis, como catequinas, flavonoides e cianidinas, com a capacidade antioxidante, devido suas estruturas químicas e aromaticidade (KOBAYASHI *et al.*, 2010). As leguminosas, vegetais presentes em grande diversidade na alimentação ao redor do mundo, são uma das principais fontes de compostos bioativos com potencial antioxidante, além de outras atividades biológicas (JUÁREZ-CHAIRES *et al.*, 2022). No entanto, a literatura carece de estudos com extratos orgânicos de *C. langsdorffii* com as partes da planta utilizadas no presente estudo. Por outro lado, o óleo extraído do seu tronco é amplamente utilizado e explorado. De acordo com Ghizoni e colaboradores (2017), o óleo de copaíba apresenta ação anti-inflamatória e antioxidante em animais com artrite. Além do óleo, os frutos da *C. langsdorffii* também mostraram um alto conteúdo de polifenóis com capacidade antioxidante (BATISTA *et al.*, 2016).

Os metabólitos secundários estão amplamente distribuídos em diversas partes da planta. A produção desses metabólitos, como os compostos fenólicos, ocorre em maior quantidade nas partes aéreas, como as folhas e frutos. Eles desempenham um importante papel na resposta das plantas a diversos fatores ambientais, como a coloração de flores e frutos, para a atração de agentes polinizadores e dispersores de sementes, e na proteção contra parasitas. Dessa forma, é imprescindível que os metabólitos sejam distribuídos por todo o vegetal (SHEN *et al.*, 2022).

Analisando o perfil dos compostos fenólicos na copaíba, foi encontrado uma ampla distribuição destes em diferentes partes da planta, corroborando com a atividade biológica encontrada na literatura. Assim, é possível presumir que esses compostos sejam distribuídos pelos vasos floemáticos ao longo da planta, das partes aéreas às partes mais externas e inferiores, provavelmente acumulando-se nas porções da casca e do caule onde também se encontra a oleoresina.

A atividade biológica dos polifenóis, como os flavonoides, depende do arranjo estrutural e a presença ou não de alguns radicais hidroxila ou metoxi, variando de acordo com os padrões de distribuição destes no esqueleto carbônico central. Moléculas com grupamento metila demonstraram maior citotoxicidade frente células de leucemia

humana, comparadas às sem o radical. Tais dados sugerem que conhecer a estrutura dos flavonoides pode potencializar suas aplicações biológicas, (PLOCHMANN *et al.*, 2007; WEN *et al.*, 2017).

5.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O tratamento de doenças infecciosas causadas por micro-organismos continua sendo um grande desafio atualmente, devido aos crescentes casos dessas infecções causadas por bactérias resistentes a diversos antibióticos. Dessa forma, a busca por compostos antimicrobianos em fontes naturais, como os extratos vegetais, ainda vem se mostrando como uma importante alternativa na medicina atual (TSAMO *et al.*, 2021).

Diante da diversidade de aplicações biológicas dos compostos encontrados na Copaíba, foi avaliado o potencial antimicrobiano dos extratos orgânicos obtidos. Foram determinados os valores referentes a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos contra às cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa) e a *Candida albicans*, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM), concentração mínima bactericida (CMB) e fungicida (CMF) dos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) contra micro-organismos. Os dados estão expressos como valores de concentração em µg/mL.

#	Extrato	<i>S. aureus</i> CIM (CMB)	<i>C. albicans</i> CIM (CMF)
1	Hexano_folhas	-	512 (1024)
2	Acetato de etila_folhas	32 (64)	512 (512)
3	Metanol_folhas	-	1024
4	Hexano_casca	-	1024
5	Acetato de etila _casca	1024	128 (128)
6	Metanol_casca	1024	64 (128)
7	Hexano_lenho	-	-
8	Acetato de etila_lenho	-	1024
9	Metanol_lenho	-	-

Relatos na literatura apresentam atividade anti-*Pseudomonas* de alguns flavonoides extraídos de vegetais, *in vitro*, *in sílico* e *in vivo* (GEETHALAKSHMI; SUNDARAMURTHI; SARADA, 2018; MOONEY *et al.*, 2021). Entretanto, no presente estudo, utilizando nove diferentes extratos orgânicos de Copaíba, nenhum demonstrou reduzir o metabolismo dessa bactéria nos testes *in vitro* realizados.

A literatura também relata que algumas bactérias, como a própria *P. aeruginosa*, são capazes de realizar biodegradação de compostos fenólicos em condições favoráveis, sugerindo sua aplicação na biorremediação de água poluída com fenóis (JÕESAAR *et al.*, 2017; MAHGOUB *et al.*, 2023). Dessa forma, pode ter ocorrido alguma inibição da atividade dos extratos, causadas por interação de enzimas presentes na bactéria, como a fenol hidroxilase, uma vez que esta causa alterações estruturais nesses compostos, influenciando também suas atividades biológicas (WANG *et al.*, 2018).

Uma das principais vias pelas quais diferentes moléculas induzem atividade antibacteriana está relacionada a permeabilidade da membrana celular bacteriana, sendo uma característica essencial para que o fármaco desempenhe o efeito desejado, seja ele bactericida ou bacteriostático. As bactérias Gram-negativas, como a *P. aeruginosa*, são intrinsecamente menos permeáveis a fármacos, devido à presença de uma membrana externa a sua parede celular, fato que impede a difusão e, conseqüentemente, a ação dos compostos no citoplasma da célula. Por outro lado, as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis e susceptíveis aos efeitos de compostos tóxicos (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017; MORRISON; ZEMBOWER, 2020). Diante disso, essas informações corroboram com os presentes resultados obtidos nos ensaios com a bactéria Gram-negativa.

Não obstante, avaliando a ação dos extratos contra *S. aureus* e *C. albicans*, foi possível identificar uma redução na atividade desses micro-organismos em alguns tratamentos. As extrações das folhas e da casca do caule mostraram melhor desempenho na inibição do crescimento bacteriano, comparado com os extratos do lenho. A extração das folhas com acetato de etila apresentou a menor concentração bacteriostática, cerca de 32 µg/mL. Já diante da levedura *C. albicans*, a extração metanólica da casca demonstrou CMI de 64 µg/mL, enquanto o extrato acetoetílico foi de 128 µg/mL. Os demais extratos não desempenharam inibição significativa ou apresentaram concentrações inibitórias muito elevadas, acima de 1024 µg/mL.

Partindo da atividade bacteriostática dos extratos de *C. langsdorffii*, foi avaliado também seu potencial de inibição do crescimento, pela determinação da concentração mínima bactericida (CMB) contra *S. aureus* e da concentração mínima fungicida (CMF) contra *C. albicans*. Apenas foi investigada as concentrações dos extratos que apresentaram menores valores de CMI. A CMB obtida do extrato acetoetílico das folhas, o único a apresentar atividade inibitória, foi de 64 µg/mL. Já as CMF dos extratos que inibiram a atividade de *C. albicans* (Extratos 1, 2, 5 e 6) foram respectivamente 1024, 512, 128 e 128 µg/mL.

Diversos estudos correlacionam os compostos fenólicos à atividade antimicrobiana. Extratos das folhas e da casca do caule da leguminosa *Amburana cearensis* (Fabaceae), utilizando solventes polares, apresentaram efeitos antibacterianos

contra diversas espécies de bactérias, inclusive *S. aureus*, avaliada no presente estudo (SILVEIRA *et al.*, 2022). Flavonoides isolados de diferentes tipos de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) apresentaram diferentes atividades biológicas, incluindo antibacteriana (WANG *et al.*, 2020). Extratos orgânicos de Cássia (*Cassia fistula*) demonstraram atividade contra três bactérias Gram-positivas, sendo uma delas *S. aureus*, corroborando com os dados obtidos nesse estudo (SEYYEDNEJAD *et al.*, 2014). Compostos extraídos da espécie *Rhynchosia minima* (Fabaceae) apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* devido à presença de diferentes flavonoides encontrados nas várias partes dessa planta (ADEWOLE *et al.*, 2022). Outras leguminosas também apresentam atividade antimicrobiana contra os mesmos micro-organismos avaliados no presente estudo, associando tais atividades à presença de diferentes polifenóis (OBISTIOIU *et al.*, 2021).

A estrutura química dos compostos fenólicos, como a posição de diferentes radicais no esqueleto fenólico, pode modular a atividade antimicrobiana (ARAYA-CLOUTIER *et al.*, 2017). Eles são capazes de interagir com proteínas extracelulares da parede celular bacteriana, causando ruptura do peptidoglicano celular e alterando a permeabilidade da membrana. Além disso, seus grupos hidroxilas também podem contribuir com a sua atividade por meio de ligações de hidrogênio com sítios ativos enzimáticos, alterando o metabolismo bacteriano e a sua lipossolubilidade (AMINI *et al.*, 2021). Baseado nas dosagens anteriormente apresentadas, compostos fenólicos estão amplamente distribuídos nas partes de *Copaifera langsdorffii*, podendo sua atividade antibacteriana estar associada a presença desses metabólitos.

5.6. CITOTOXICIDADE

A presença da Copaíba na medicina tradicional está amplamente associada ao tratamento diversas complicações de saúde, como disfunções urinárias, respiratórias, tegumentares e até inflamatórias. Estudos etnofarmacológicos corroboram a grande maioria deles (ARRUDA *et al.*, 2019).

Diante disso, é imprescindível que estudos de toxicidade sejam desenvolvidos garantido a máxima segurança de uso das diversas preparações com essa planta. A partir

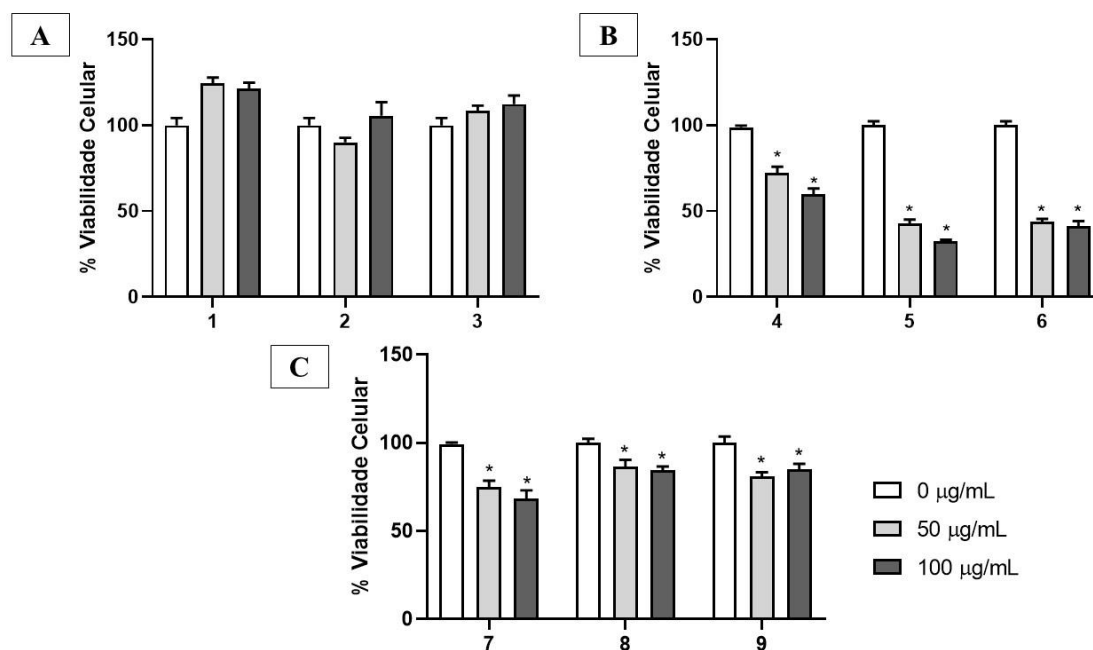
do exposto, foi avaliada a citotoxicidade dos extratos de *C. langsdorffii*, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos como modelo experimental, uma vez que tais células desempenham um papel crucial na resposta inflamatória (JENKINS *et al.*, 2011).

Todos os extratos foram avaliados quanto a sua citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos (MPM), os quais foram quantificados por meio colorimétrico utilizando a Sulforrodamina B (SRB). Este método se baseia na capacidade da SRB se ligar a proteínas celulares em condições ácidas do meio. Assim, a quantidade de coloração pode ser indiretamente correlacionada a quantidade de células no meio e, consequentemente, avaliar a proliferação celular (ORELLANA; KASINSKI, 2016).

Os macrófagos são células protagonistas na resposta inflamatória inata, onde a liberação de mediadores químicos por meio dessas células são fundamentais para o desencadeamento desse processo. Avaliar o efeito citotóxicos de diferentes compostos nesse tipo de células pode levantar sugestões da modulação destes no processo inflamatório (DA LUZ *et al.*, 2020).

Após os ensaios de avaliação dos efeitos dos extratos no metabolismo dos macrófagos peritoneais murinos, foi observado que a maioria dos extratos apresentou valores de CI_{50} próximo ou superior a 100 $\mu\text{g/mL}$, conforme observado na figura 9. As únicas exceções foram os extratos da casca do caule, utilizando acetato de etila e metanol. Estes apresentaram CI_{50} de $33,64 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$ e $38,97 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Tais extratos, já destacados anteriormente, obtiveram resultados promissores, principalmente na dosagem da sua constituição fenólica, assim como no seu potencial antioxidante. Os dados obtidos após a quantificação de proteínas totais pela SRB podem sugerir que o conjunto de metabólitos secundários presentes nesses extratos estejam induzindo uma possível resposta imunomoduladora, reduzindo a quantidade de proteínas sintetizadas pelos macrófagos e resultando na diminuição da sua atividade inflamatória.

Figura 9 - Atividade citotóxica dos extratos orgânicos das (A) folhas, (B) casca do caule e (C) lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) frente a macrófagos peritoneais murinos, avaliados pelo método da Sulforodamina B, após 24 h de incubação. A significância foi determinada pela análise de variância em duas vias (two-way ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (0 $\mu\text{g/mL}$). 1, 4, 7: n-hexano; 2, 5, 8: acetato de etila; 3, 6, 9: metanol.



Embora se espere que extratos vegetais com potencial anti-inflamatório não sejam citotóxicos contra células saudáveis do organismo, de acordo com Marques-Santos et al. (2023), é possível que o mesmo extrato apresente diferentes respostas diante de macrófagos, podendo ou não interferir na sua viabilidade. Outros estudos, como o de Buyinza *et al.* (2021) relacionou a presença de compostos fenólicos, como isoflavonas, à citotoxicidade do extrato da leguminosa *Millettia dura* Dunn (Fabaceae) sobre diferentes linhagens celulares. O extrato metanólico de *Entada abyssinica* (Fabaceae), assim como flavonoides e terpenoides isolados de seus extratos, mesmo apresentando propriedades anti-inflamatórias, demonstraram citotoxicidade e baixo índice de seletividade quando testados frente à macrófagos e células renais (DZOYEM *et al.*, 2017; OLAJIDE; ALADA, 2001).

Os macrófagos podem ser classificados em pelo menos dois fenótipos quando relacionados ao processo inflamatório. O fenótipo M1 possui características pró-inflamatórias, com liberação de mediadores que estimulam este processo, enquanto o

fenótipo M2 produz um efeito anti-inflamatório (ORECCHIONI *et al.*, 2019). Uma vez que os macrófagos são estimulados com fatores pró-inflamatórios, como o LPS, estas células podem apresentar o fenótipo M1 (ORECCHIONI *et al.*, 2019). Assim, os presentes resultados sugerem que os extratos que apresentaram citotoxicidade contra macrófagos desse fenótipo podem contribuir para a redução da resposta inflamatória mediada por tais células.

Devido ao potencial anti-inflamatório de alguns dos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii*, como os extratos da casca do caule, investigou-se o perfil de expressão de alguns marcadores inflamatórios após o tratamento de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS.

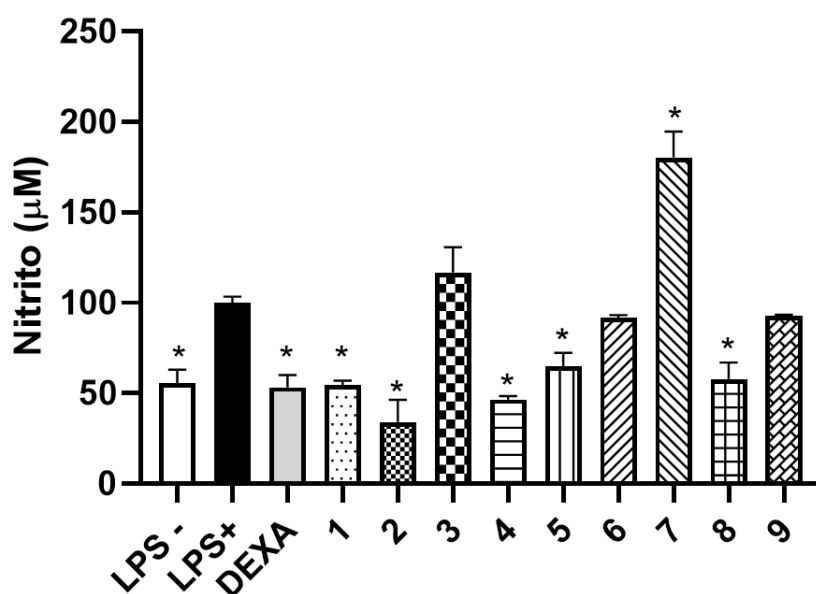
5.7. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma das principais e fundamentais reações de proteção do organismo como uma resposta a infecções, irritações, lesões ou distúrbios fisiológicos. Ela está relacionada a diferentes processos patológicos como asma, artrite, doenças neurodegenerativas, diabetes e até o câncer. Os principais mediadores dessa resposta incluem citocinas e quimiocinas liberadas no local da reação inflamatória, que servem como alvos para moléculas anti ou pró-inflamatórias (KUPRASH; NEDOSPASOV, 2016). Um desses mediadores é o óxido nítrico (NO), uma molécula importante no sistema de defesa, atuando como vasodilatador e agente citotóxico em processos infecciosos. Durante o processo inflamatório, o NO, produzido pela isoforma induzível óxido nítrico sintase (iNOS), é uma importante fonte de geração de espécies reativas de oxigênio (BAILEY *et al.*, 2019).

Os macrófagos são as principais células fagocíticas que adquirem funções e fenótipos específicos em resposta a uma variedade de ativadores externos. Esse tipo de células extraídas, por exemplo, do peritônio de camundongos se tornam um potencial modelo de investigação de diferentes respostas fisiológicas, principalmente da sua participação no processo inflamatório, a partir da identificação e quantificação dos mediadores por eles liberados (PINEDA-TORRA *et al.*, 2015).

Dessa forma, foi avaliado, por meio da reação de Griess, o quantitativo de nitrito, um precursor do óxido nítrico, produzido por macrófagos peritoneais murinos tratados com os extratos orgânicos de Copaíba após estimulação com LPS (Figura 10).

Figura 10 - Efeito dos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae), a 25 µg/mL, na produção de nitrito por macrófagos peritoneais murinos após 24 h de tratamento, avaliado pela reação de Griess. Dados expressos em média ± erro padrão da média (E PM) e a significância foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett, e considerados significativos (*) quando $p < 0,05$, comparados ao grupo controle (LPS+). DEXA: dexametasona.



Inicialmente, os macrófagos foram efetivamente ativados na presença do LPS, aumentando significativamente a quantidade de nitrito quando comparado ao tratamento controle (células não estimuladas com LPS). Também foi observado que o grupo tratado com o controle padrão anti-inflamatório (dexametasona) reverteu significativamente o efeito pró-inflamatório do LPS, não apresentando diferença significativa com o grupo não estimulado.

Após o tratamento com os extratos orgânicos de Copaíba, diversos deles demonstraram reduzir significativamente os níveis de nitrito, consequentemente na

produção de NO pelos macrófagos ativados por LPS. Os extratos hexânicos das folhas e da casca (1 e 4) demonstraram semelhante ação na redução na quantidade de NO, para respectivamente 54,75 µg/mL e 46,56 µg/mL, respectivamente. Todos os extratos com acetato de etila (2, 5 e 8) também reduziram os níveis de nitrito, sendo o efeito mais proeminente causado pelo extrato 2, referente ao extrato das folhas com acetato de etila, com redução de cerca de 82% da quantidade de nitrito. Nenhum extrato metanólico (3, 6 e 9) foi eficiente na redução dos níveis de nitrito, conforme observado no gráfico da figura 8. Tais resultados levantam a hipótese de que os compostos extraídos com solventes mais polares foram menos eficientes quando comparados aos apolares ou de polaridade mediana.

Já se sabe que o NO pode ser potencialmente tóxico quando em maior quantidade, podendo gerar intermediários de oxigênio e desencadear um processo de estresse oxidativo. Dessa forma, a descoberta de compostos redutores da quantidade ou inibidores da produção de NO tem sido um dos principais alvos da indústria farmacêutica (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). A literatura também relata que os flavonoides, metabólitos encontrados em alta quantidade nos extratos 1, 2 e 4 do presente estudo, desempenham uma importante atividade regulatória na inflamação e no estresse oxidativo, agindo em diferentes vias de sinalização, sendo uma delas a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio. Essa inibição se dá por meio da ligação dos flavonoides a receptores da membrana plasmática de algumas células, suprimindo diferentes cascatas de sinalização e mediadores pró-inflamatórios intracelulares (LI *et al.*, 2020). Outro flavonoide, a quercetina, mostrou-se como potencial anti-inflamatório por meio do aumento da expressão da enzima superóxido dismutase, além de reduzir significativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (LI *et al.*, 2021).

Dessa forma, a literatura corrobora os dados encontrados no presente estudo, sugerindo que os flavonoides, presentes principalmente nas extrações das folhas e na casca do caule, estejam atuando por meio dessas vias de redução da expressão de NO pelos macrófagos peritoneais. Além disso, amplia o espectro para a atuação dos compostos nos níveis de outros mediadores associados à inflamação como as citocinas. Portanto, foi investigado os níveis das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10, por meio do teste

de ELISA, a fim de determinar a interferência dos extratos sobre a produção de tais citocinas pelos macrófagos.

Os flavonoides, metabólitos amplamente presentes em diferentes extratos vegetais, tem atraído a atenção da comunidade científica devido a suas diversas atividades biológicas. A ação desses metabólitos *in vitro* relacionada à inflamação depende da modulação de diferentes mediadores inflamatórios, como as citocinas. No entanto, mais estudos ainda são necessários para investigar a atividade desses compostos também *in vivo*, uma vez que eles podem ser metabolizados em moléculas com estruturas e atividades diferentes (SERAFINI; PELUSO; RAGUZZINI, 2010). Dentre os diversos mediadores intracelulares relacionados à inflamação, as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 recebem destaque por estarem envolvidas nos mais deferentes tipos de patologias ligadas à desordem do sistema imune, infecções virais, bacterianas, câncer, dentre outras (ROE, 2021).

Os dados apresentados na figura 11 demonstram que o extrato 2 conseguiu reduzir significativamente os níveis de TNF- α produzida pelos macrófagos. Esse dado, em conjunto com a redução dos níveis de NO, sugerem seu potencial anti-inflamatório por meio da alteração no perfil desses mediadores avaliados. Não obstante, o mesmo extrato também demonstrou reduzir significativamente o quantitativo da interleucina 6 (IL-6), outro marcador pró-inflamatório (Figura 12). Assim como o extrato 2, as amostras dos extratos 4 e 8 também apresentaram redução significativa dessa citocina. Diante desses resultados, é possível observar que existe um amplo espectro de metabólitos, espalhados pelas diferentes partes da Copaíba, tanto nas folhas como na casca e no lenho, que podem desempenhar um papel anti-inflamatório por meio da supressão desses mediadores.

Figura 11- Dosagem de TNF- α do sobrenadante de macrófagos peritoneais tratados com extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e a significância foi determinada pela análise de variância (AN OVA), seguido do pós-teste de Dunnett, e considerados significativos (*) quando $p < 0,05$, comparados ao grupo controle (LPS+). DEXA: dexametasona.

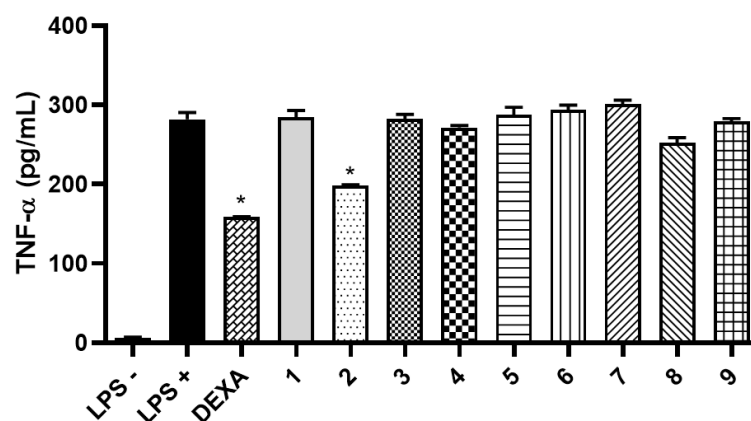
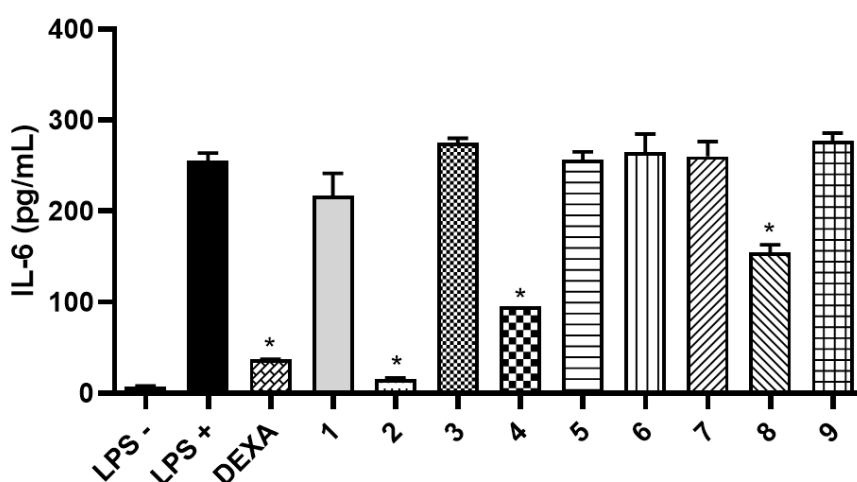


Figura 12 - Dosagem de IL-6 do sobrenadante de macrófagos peritoneais tratados com extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e a significância foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett, e considerados significativos (*) quando $p < 0,05$, comparados ao grupo controle (LPS+). DEXA: dexametasona.

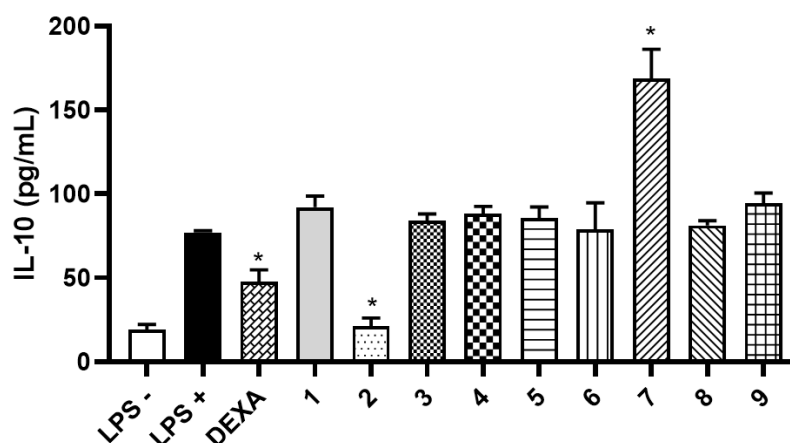


A inflamação é um processo altamente regulado, que funciona a partir do equilíbrio na liberação de uma série de mediadores e mecanismos pró e anti-inflamatórios. Caso haja um descontrole entre estes fatores, isto pode resultar no desenvolvimento em um amplo espectro de doenças inflamatórias. É diante desse cenário que a plasticidade

fenotípica das células inflamatórias, como os macrófagos, desempenha um papel crucial nessa mediação. A expressão do fenótipo M1, ou pró-inflamatório, caracteriza o macrófago produtor de fatores indutores da inflamação, como as citocinas IL-6, IL-1 e TNF- α . Já o fenótipo M2 está associado a fatores imunomodulatórios e anti-inflamatórios, como a liberação das citocinas IL-10 e TGF- β (FUNES *et al.*, 2018; SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018; STENVINKEL *et al.*, 2005).

A quercetina, um conhecido flavonoide obtido em extratos de diferentes leguminosas, mostrou-se uma importante supressora da resposta inflamatória de macrófagos estimulados por LPS (LU *et al.*, 2018). A luteolina, outro flavonoide de origem natural, possui correlação com a redução de mediadores pró-inflamatórios e o aumento de mediadores anti-inflamatórios (WANG *et al.*, 2020). Diante dos dados obtidos no presente trabalho, como a presença de flavonoides nos extratos avaliados, além do envolvimento deste na resposta inflamatória, foi investigada a influência dos extratos estudados na expressão da interleucina 10 (IL-10), conforme demonstrado abaixo na figura 13.

Figura 13 - Dosagem de IL-10 do sobrenadante de macrófagos peritoneais tratados com extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii*. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e considerados significativos (*) quando $p < 0,05$, comparados ao grupo controle (LPS+). DEXA: dexametasona.



Foi possível observar que, de todos os extratos orgânicos estudados, apenas o extrato 7 aumentou a expressão da interleucina 10, sugerindo a correlação desse extrato com a supressão da resposta inflamatória. Por outro lado, este extrato não interferiu na expressão das citocinas pró-inflamatórias avaliadas, uma vez que a expressão de TNF- α , por exemplo, pode ser inibida pela alta produção de IL-10 (ANDREA et al., 1993; BSEISO et al., 2022). Este fato pode estar correlacionado ao processo natural de defesa do organismo, o que resulta no equilíbrio da resposta Th1/Th2 das citocinas (JOSHI et al., 2015).

Por outro lado, o extrato 2, que também reduziu a expressão de TNF- α e IL-6, também diminuiu os níveis de IL10, o que corroborou com os dados encontrados por Saiki e colaboradores (2018), os quais demonstram que a presença de compostos como a quercetina, um flavonoide de origem vegetal com propriedades anti-inflamatórias bem conhecidas, reduziu tanto os níveis de IL-6 e IL-10 em macrófagos estimulados por LPS.

De acordo com a literatura, a quercetina, além de reduzir a produção de várias espécies reativas de oxigênio, também está envolvida no equilíbrio do perfil M1/M2 dos macrófagos, reduzindo a expressão dos marcadores associados ao perfil M1 (pró-inflamatório) e aumentando os níveis dos marcadores M2 (anti-inflamatório), como a IL-10. Assim, sugere-se que a quercetina pode atuar como um composto com alto potencial para o tratamento de doenças relacionadas à inflamação (CHEN et al., 2020; TANG et al., 2019; TSAI et al., 2021).

Uma vez que diferentes estudos demonstram a presença de compostos fenólicos presentes em extratos de leguminosas com alto potencial biológico, sobretudo anti-inflamatório, é fundamental um maior aprofundamento para isolar, purificar e elucidar os principais componentes presentes nos extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii*. No presente trabalho, foi possível observar diferentes respostas dos diferentes extratos avaliados, permitindo correlacionar as atividades biológicas obtidas à presença dos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (AL-KHAYRI et al., 2022; ARULSELVAN et al., 2016; JUÁREZ-CHAIRES et al., 2022; ZHU; DU; XU, 2018).

A partir das informações etnobotânicas disponíveis sobre a utilização da espécie em estudo, de maneira geral sabe-se da importância do óleo da Copaíba na medicina popular, por estar associada à diversas aplicações biológicas, dentre elas o cicatrizante,

descongestionante e anti-inflamatório (RICARDO *et al.*, 2018). No entanto, a obtenção desse óleo é um problema importante a se chamar a atenção, devido a principal forma de extrações, sendo necessária a perfuração profunda do tronco para estimular a liberação da oleorresina. Isso pode provocar sérios danos às árvores exploradas, inclusive induzindo a sua morte (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009b).

O óleo da Copaíba é rico em metabólitos como os sesquiterpenos, que também são associados a diferentes atividades biológicas, conforme descrito. Com isso, o uso do óleo se torna cada vez mais frequente na medicina popular, o que aumenta a demanda de extração deste produto e, conseqüentemente, interfere na conservação da integridade das árvores desse gênero. Deste modo, novos métodos alternativos de obtenção de compostos bioativos da Copaíba são cada vez mais necessários para minimizar os riscos à população dessas árvores, uma vez que a prática extrativista desordenada é uma das principais causas da extinção de espécies com potencial farmacológico, uma crescente ameaça à conservação das mesmas (COSTA *et al.*, 2021; FEITOSA; ALBUQUERQUE; MONTEIRO, 2014; SANTOS *et al.*, 2022).

Diante do exposto no presente estudo, é possível que diferentes compostos bioativos possam ser obtidos de partes distintas da Copaíba, como as folhas e a casca, estruturas vegetais que apresentam relativa perenidade e a extração provocam danos menos letais à espécie. Além disso, a obtenção de compostos com atividades biológicas semelhantes ao óleo dispensa a necessidade da perfuração do tronco dessas árvores para obtê-lo, propondo-se então alternativas para o uso etnofarmacológico da Copaíba e minimizando o seu risco de extinção.

Juntamente com os dados levantados até o momento, pretende-se seguir com o isolamento, identificação e avaliação os metabólitos secundários farmacologicamente ativos na espécie *Copaifera langsdorffii*, assim como a investigação de outras atividades biológicas dos extratos orgânicos utilizados, como anticâncer, antiparasitária e antiofídica, levantando conhecimentos que servirão como suporte para a compreensão da composição química desta espécie e confirmar seu potencial bioativo. Vale também destacar o certo ineditismo deste estudo, uma vez que existe uma grande lacuna na literatura descrevendo a composição química, atividade biológica e mecanismos de ação de alguns extratos aqui apresentados.

6. CONCLUSÃO

Após a análise dos dados obtidos, foi observado que os extratos orgânicos de *C. langsdorffii* demonstraram efeitos biológicos proeminentes, como a redução da atividade de microrganismos como *S. aureus* e *C. albicans*, onde os extratos 1, 2, 5 e 6 apresentaram menores concentrações inibitórias. Também foi observada a capacidade antioxidante dos extratos, reduzindo a quantidade do radical DPPH com valores de EC_{50} inferiores a 300 $\mu\text{g/mL}$. Alguns extratos também demonstraram citotoxicidade contra macrófagos peritoneais murinos, reduzindo a viabilidade dessas células e sugerindo uma ação pela via inflamatória. Ao avaliar o potencial anti-inflamatório dos extratos da copaíba, foi observada uma alteração significativa de marcadores inflamatórios, como a diminuição dos níveis de nitrito, precursor do óxido nítrico, e de citocinas pró-inflamatórias, como o $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6. Além disso, a maioria dos extratos manteve os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. Dessa forma, foi possível confirmar o potencial anti-inflamatório de alguns extratos nas condições testadas, sendo esta atividade associada à presença de diversos metabólitos secundários, identificados por cromatografia, como flavonoides, terpenos e cumarinas. Dessa forma, os dados corroboram o potencial etnofarmacológico da espécie, não só o uso da oleorresina, conforme relata a literatura científica, mas também de extratos orgânicos de diferentes partes da espécie, principalmente as folhas e casca do caule, no tratamento de infecções e inflamações, o que fornece informações relevantes para o corroborar a segurança do uso da espécie em questão na medicina tradicional e popular.

REFERÊNCIAS

- ADEWOLE, A. H.; FAMUYIDE, I. M.; MCGAW, L. J.; SELEPE, M. A.; OCTOBER, N. Antifungal Compounds from the Leaves of *Rhynchosia minima*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, n. 12, 17 dez. 2022.
- ALBERNAZ, L. C.; DE PAULA, J. E.; ROMERO, G. A. S.; SILVA, M. do R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L. S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116–121, 2010.
- ALBUQUERQUE, U. P. de. **Introdução à Etnobotânica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. 80 p.
- ALBUQUERQUE, B. R.; HELENO, S. A.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14–29, 2021.
- AL-KHAYRI, J. M.; SAHANA, G. R.; NAGELLA, P.; JOSEPH, B. V.; ALESSA, F. M.; AL-MSSALLEM, M. Q. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2901, 2 maio 2022.
- ALVES, J. A.; ABRÃO, F.; SILVA MORAES, T. da; DAMASCENO, J. L.; DOS SANTOS MORAES, M. F.; SOLA VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; DANTAS MIRANDA, M. L.; GOMES MARTINS, C. H. Investigation of *Copaifera* genus as a new source of antimycobacterial agents. **Future Science OA**, v. 6, n. 7, 1 ago. 2020.
- ALVES, J. M., MUNARI, C. C., DE AZEVEDO BENTES MONTEIRO NETO, M., FURTADO, R. A., SENEDESE, J. M., BASTOS, J. K., & TAVARES, D. C. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of applied toxicology**. v. 33, n 8, p. 854–860, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.2777>
- ALY, S. H.; ELISSAWY, A. M.; ELDAHSHAN, O. A.; ELSHANAWANY, M. A.; EFFERTH, T.; SINGAB, A. N. B. The pharmacology of the genus *Sophora* (Fabaceae): An updated review. **Phytomedicine**, v. 64, p. 153070, nov. 2019.

ANDREA, A. D. ' ; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. INTERLEUKIN 10 (IL-10) INHIBITS HUMAN LYMPHOCYTE INTERFERON 3,-PRODUCTION BY SUPPRESSING NATURAL KILLER CELL STIMULATORY FACTOR/IL-12 SYNTHESIS IN ACCESSORY CELLS. v. 178, p. 1041-1048. Disponível em: <<http://rupress.org/jem/article-pdf/178/3/1041/1675111/1041.pdf>>.

ANDREWS, M.; ANDREWS, M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 705, 26 mar. 2017.

ANTONIO, A. S., FRANCO, L. O., CARDOSO, S. R. S., DOS SANTOS, G. R. C., PEREIRA, H. M. G., WIEDEMANN, L. S. M., FERREIRA, P. C. G., & VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemical variability of *Copaifera langsdorffii* Desf. from environmentally contrasting populations. **Natural product research**, v. 37, n. 14, p. 2446–2450, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2043856>

ARAÚJO, G. M.; NASCIMENTO, A. R. T.; LOPES, S. F.; RODRIGUES, R. F.; RATTER, J. A. Structure and floristics of the arboreal component of a dystrophic cerradão and comparison with other cerradões in central Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 68, n. 3, p. 401–418, 2011.

ARRUDA, C.; ALDANA MEJÍA, J. A.; RIBEIRO, V. P.; GAMBETA BORGES, C. H.; MARTINS, C. H. G.; SOLA VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1–20, jan. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218348546>>.

ARULSELVAN, P.; FARD, M. T.; TAN, W. S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S. S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–15, 2016.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.

Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.

BORCHARDT, J. K. The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. **Drug news & perspectives**, v. 15, n. 3, p. 187–192, abr. 2002.

BSEISO, O.; ZAHDEH, A.; ISAYED, O.; MAHAGNA, S.; BSEISO, A. THE ROLE OF IMMUNE MECHANISMS, INFLAMMATORY PATHWAYS, AND MACROPHAGE ACTIVATION SYNDROME IN THE PATHOGENESIS OF HEMOPHAGOCYTIC LYMPHOHISTIOCYTOSIS. *Cureus*, 31 dez. 2022.

CALEJA, C.; RIBEIRO, A.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic Compounds as Nutraceuticals or Functional Food Ingredients. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 19, p. 2787–2806, 20 jul. 2017.

CAO, X. L.; XU, J.; BAI, G.; ZHANG, H.; LIU, Y.; XIANG, J. F.; TANG, Y. L. Isolation of anti-tumor compounds from the stem bark of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb. & Zucc. by silica gel column and counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 929, p. 6–10, 2013.

CARMO, J. F., MIRANDA, I., QUILHÓ, T., SOUSA, V. B., CARDOSO, S., CARVALHO, A. M., CARMO, F. H. D. J., LATORRACA, J. V. F., PEREIRA, H. *Copaifera langsdorffii* Bark as a Source of Chemicals: Structural and Chemical Characterization. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 36, n. 5, p. 305–317, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/02773813.2016.1140208>

CARNEIRO, L.; TASSO, T.; SANTOS, M.; GOULART, M.; DOS SANTOS, R.; BASTOS, J.; DA SILVA, J.; CROTTI, A.; PARREIRA, R.; ORENHA, R.; VENEZIANI, R.; AMBRÓSIO, S. *Copaifera multijuga*, *Copaifera pubiflora* and *Copaifera trapezifolia* Oleoresins: Chemical Characterization and in vitro Cytotoxic Potential against Tumoral Cell Lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

CARTAXO, S. L.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CASTRO, A. A. J. F. Cerrados do Nordeste do Brasil: caracterização, biodiversidade e desastres. **Publicações Avulsas em Ciências Ambientais**, v. 1, n. October 2015, p. 1–19, 1999.

CHEN, T.; ZHANG, X.; ZHU, G.; LIU, H.; CHEN, J.; WANG, Y.; HE, X. Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway in vitro. **Medicine**, v. 99, n. 38, p. e22241, 18 set. 2020.

COSTA, É. L. G.; FARNESE, F. dos S.; DE OLIVEIRA, T. C.; ROSA, M.; RODRIGUES, A. A.; RESENDE, E. C.; JANUARIO, A. H.; SILVA, F. G. Combinations of Blue and Red LEDs Increase the Morphophysiological Performance and Furanocoumarin Production of *Brosimum gaudichaudii* Trécul in vitro. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 21 jul. 2021.

COSTA, J.A.S. *Copaifera in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22895>>. Acesso em: 11 ago. 2023.

COUTINHO, L. M. O conceito de Cerrado. **Revista brasileira de Botânica**, v. 1, p. 17–23, 1978.

CREPALDI, C. G.; CAMPOS, J. L. A.; ALBUQUERQUE, U. P.; SALES, M. F. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 157–165, 2016.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural Products from Plants, Second Edition**. [s.l.: s.n.]569 p.

CUI, Q., DU, R., LIU, M., RONG, L. Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. **Molecules**. v. 25, n 1, p. 183, 2020. DOI: 10.3390/molecules25010183.

DE ALBUQUERQUE, U. P.; DE MEDEIROS, P. M.; DE ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; DE FREITAS LINS NETO, E. M.; DE MELO, J. G.; DOS SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.

DE CARVALHO NILO BITU, V.; DE CARVALHO NILO BITU, V.; MATIAS, E. F. F.; DE LIMA, W. P.; DA COSTA PORTELO, A.; COUTINHO, H. D. M.; DE

MENEZES, I. R. A. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 265–272, 13 jul. 2015.

DE LIMA CHERUBIM, D. J., BUZANELLO MARTINS, C. V., OLIVEIRA FARIÑA, L., & DA SILVA DE LUCCA, R. A. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 19, n.1, p. 33–37, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jocd.13093>

DE MORAES REGO, C. A. R.; ROCHA, A. E.; DE OLIVEIRA, C. A.; PACHECO, F. P. F. Levantamento etnobotânico em comunidade tradicional do assentamento Pedra Suada, do município de Cachoeira Grande, Maranhão, Brasil. **Acta Agronômica**, v. 65, n. 3, p. 284–291, jan. 2016.

DE PAULA-SOUZA, J.; GIBAU DE LIMA, A.; SILVA COSTA, J. A.; PAGANUCCI DE QUEIROZ, L. A Step Out of the Chaos—A Nomenclatural Revision of New World *Copaifera* (Fabaceae, Detarieae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 107, p. 467–479, 19 out. 2022.

DE S. VARGAS, F.; D. O. DE ALMEIDA, P.; ARANHA, E.; DE A. BOLETI, A.; NEWTON, P.; DE VASCONCELLOS, M.; JUNIOR, V.; LIMA, E. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194–6210, 9 abr. 2015.

Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. **Molecules**, 26(17), 5377, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>

DIEFENBACH, A. L.; MUNIZ, F. W. M. G.; OBALLE, H. J. R.; RÖSING, C. K. Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 4, p. 586–596, abr. 2018.

DURAZZO A., LUCARINI M., SOUTO E. B., CICALA, C., CAIAZZO, E., IZZO, A. A, NOVELLINO, E., SANTINI, A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**. v. 33, p. 2221–2243, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

FEITOSA, I. S.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M. Knowledge and extractivism of *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. in a local community of the Brazilian Savanna, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 1, p. 64, 9 dez. 2014.

FELHI, S.; DAOUD, A.; HAJLAOUI, H.; MNAFGUI, K.; GHARSALLAH, N.; KADRI, A. Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial activities and functional group analysis of *Ecballium elaterium* seeds and peels fruits. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 483–492, 2017.

FIRMO, W. da C. A.; MENEZES, V. de J. M. de; PASSOS, C. E. de C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. especial, p. 90–95, 2011.

FRANCO, F.; LAMANCO-FERREIRA, A. P. D. N.; FERREIRA, M. L. Etnobotânica: Aspectos Históricos E Aplicativos Desta Ciência. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 10, n. 2, 2013.

FUNES, S. C.; RIOS, M.; ESCOBAR-VERA, J.; KALERGIS, A. M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**, v. 154, n. 2, p. 186–195, 8 jun. 2018.

HAMDI ABDULKAREEM, M., ABBAS ABOOD, I., & MUNIS DAKHEEL, M. Antimicrobial Resistance of Tannin Extract against *E. coli* Isolates from Sheep. **Archives of Razi Institute**, v. 77, n. 2, p. 697–701, 2022. DOI: <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.356982.1955>

HEINRICH, M. Ethnopharmacology: Quo vadis? Challenges for the future. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 2, p. 99–102, 2014.

HOHLEMWERGER, S. V. A. Metabólitos E Atividades Biológicas De Espécies De *Zanthoxylum* Da Bahia. p. 246, 2010.

HUSSEIN, R. A.; EL-ANSSARY, A. A. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. **Long-Haul Travel Motivation by International Tourist to Penang**, v. i, n. tourism, p. 13, 2018.

JANG, W. Y., KIM, M. Y., & CHO, J. Y. Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Menopausal, and Anti-Cancer Effects of Lignans and Their Metabolites. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 24, 15482, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232415482>

JENKINS, S. J.; RUCKERL, D.; COOK, P. C.; JONES, L. H.; FINKELMAN, F. D.; VAN ROOIJEN, N.; MACDONALD, A. S.; ALLEN, J. E. Local Macrophage Proliferation, Rather than Recruitment from the Blood, Is a Signature of TH2 Inflammation. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1284–1288, 10 jun. 2011.

JIMÉNEZ, N., CARRILLO-HORMAZA, L., PUJOL, A., ÁLZATE, F., OSORIO, E., LARA-GUZMAN, O. Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia, **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 272-279, 2015. ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.050>.

JOSHI, L.; PONNANA, M.; SIVANGALA, R.; CHELLURI, L. K.; NALLARI, P.; PENMETSA, S.; VALLURI, V.; GADDAM, S. Evaluation of TNF- α , IL-10 and IL-6 Cytokine Production and Their Correlation with Genotype Variants amongst Tuberculosis Patients and Their Household Contacts. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0137727, 11 set. 2015.

JUÁREZ-CHAIRES, M. F.; MEZA-MÁRQUEZ, O. G.; MÁRQUEZ-FLORES, Y. K.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C. Potential anti-inflammatory effects of legumes: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 128, n. 11, p. 2158–2169, 14 dez. 2022.

KIM J, GRIPENBERG S, KARONEN M, SALMINEN JP. Seed tannin composition of tropical plants. **Phytochemistry**. 187:112750, 2021. DOI: [10.1016/j.phytochem.2021.112750](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112750).

KOKOSKA, L.; KLOUCEK, P.; LEUNER, O.; NOVY, P. Plant-Derived Products as Antibacterial and Antifungal Agents in Human Health Care. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 29, p. 5501–5541, 26 out. 2019.

KLEIN, A. Luiz. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro : um século depois**. [s.l.] Editora da UNESP, 2000. 156 p.

KRAUSE, M. S.; BONETTI, A. D. F.; TURNES, J. D. M.; DIAS, J. D. F. G.; MIGUEL, O. G.; DUARTE, M. D. R. PHYTOCHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE - MINI REVIEW. **Visão Acadêmica**, v. 14, n. 4, 27 dez. 2013.

LEMONS, M., JOSÉ SANTIN, J. R., MIZUNO, C. S., BOEING, T., DE SOUSA, J. P. B., NANAYAKKARA, D., BASTOS, J. K., ANDRADE, S. F. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, 2015, p. 238-245, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.005>.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. **Royal Bot. Gard. Kew**, 2005.

LI, W.; ZHOU, W.; SHIM, S. H.; KIM, Y. H. Chemical constituents of *Zanthoxylum schinifolium* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 60–65, 2014.

LOPES, S. D. F.; VALE, V. S.; OLIVEIRA, A. P.; SCHIAVINI, I. Análise comparativa da estrutura e composição florística de Cerrado no Brasil Central. **Interciência**, v. 36, n. 1, p. 8–15, 2011.

LU, H.; WU, L.; LIU, L.; RUAN, Q.; ZHANG, X.; HONG, W.; WU, S.; JIN, G.; BAI, Y. Quercetin ameliorates kidney injury and fibrosis by modulating M1/M2 macrophage polarization. **Biochemical Pharmacology**, v. 154, p. 203–212, ago. 2018.

MACÊDO, N. S.; SILVEIRA, Z. de S.; BEZERRA, A. H.; COSTA, J. G. M. da; COUTINHO, H. D. M.; ROMANO, B.; CAPASSO, R.; CUNHA, F. A. B. da; DA SILVA, M. V. *Caesalpinia ferrea* C. Mart. (Fabaceae) Phytochemistry, Ethnobotany, and Bioactivities: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3831, 23 ago. 2020.

MANGABEIRA DA SILVA, J. J.; PENA RIBEIRO, V.; LEMOS, M.; MILLER CROTTI, A. E.; ROGEZ, H.; KENUPP BASTOS, J. Reliable Methods for Analyses of Volatile Compounds of *Copaifera* Oleoresins Combining Headspace and Gas Chromatography. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 1, 4 jan. 2020.

MELO NETO, B.; LEITÃO, J. M. S. R.; OLIVEIRA, L. G. C.; SANTOS, S. E. M.; CARNEIRO, S. M. P.; RODRIGUES, K. A. F.; CHAVES, M. H.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A. Inhibitory effects of *Zanthoxylum rhoifolium* lam. (Rutaceae) against the infection and infectivity of macrophages by *Leishmania amazonensis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 88, n. 3, p. 1851–1861, 2016.

MILLER, J. S. The Discovery of Medicines from Plants: A Current Biological Perspective. **Economic Botany**, v. 65, n. 4, p. 396–407, 2011.

MOTTA, E. V., LEMOS, M., COSTA, J. C., BANDERÓ-FILHO, V. C., SASSE, A., SHERIDAN, H., & BASTOS, J. K. Galloylquinic acid derivatives from *Copaifera langsdorffii* leaves display gastroprotective activity. **Chemico-biological interactions**, v. 261, p.145–155, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.028>

MOTTA, E. V. S.; SAMPAIO, B. L.; COSTA, J. C.; TEIXEIRA, S. P.; BASTOS, J. K. Quantitative analysis of phenolic metabolites in *Copaifera langsdorffii* leaves from plants of different geographic origins cultivated under the same environmental conditions. **Phytochemical Analysis**, v. 30, n. 3, p. 364–372, 15 maio 2019.

MUKHIJA, M.; LAL DHAR, K.; NATH KALIA, A. Bioactive Lignans from *Zanthoxylum alatum* Roxb. stem bark with cytotoxic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 1, p. 106–112, 2014.

NEGI, A. S., JAIN, S. Chapter 10 - Recent advances in natural product-based anticancer agents, Editor(s): Atta-ur-Rahman, Studies in Natural Products Chemistry, **Elsevier**, v. 75, p. 367-447, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91250-1.00010-0>.

NEGI, J. S.; BISHT, V. K.; BHANDARI, A. K.; SIGH, P.; SUNDYAL, R. C. Chemical constituents and biological activities of the genus *Zanthoxylum*: A review. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 5, n. 12, p. 412–416, 2011.

NEVES, E. M. dos S. F. T. **Macrófago: Biologia, Diversidade e Função**. 2015. Universidade Fernando Pessoa, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NOGUEIRA, M. S., FURTADO, R. A., & BASTOS, J. K. Flavonoids and Methoxygalloylquinic Acid Derivatives from the Leaf Extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n.31, p. 6939–6945. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01588>

OBISTIOIU, D.; COCAN, I.; TÎRZIU, E.; HERMAN, V.; NEGREA, M.; CUCERZAN, A.; NEACSU, A.-G.; COZMA, A. L.; NICHITA, I.; HULEA, A.; RADULOV, I.; ALEXA, E. Phytochemical Profile and Microbiological Activity of Some Plants Belonging to the Fabaceae Family. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 662, 1 jun. 2021.

OLSZOWY M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? **Plant physiology and biochemistry**, v. 144, p. 135–143, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>.

ORECCHIONI, M.; GHOSHEH, Y.; PRAMOD, A. B.; LEY, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 24 maio 2019.

OSMAKOV, D. I., KALINOVSKII, A. P., BELOZEROVA, O. A., ANDREEV, Y. A., & KOZLOV, S. A. Lignans as Pharmacological Agents in Disorders Related to Oxidative Stress and Inflammation: Chemical Synthesis Approaches and Biological Activities. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 11, p. 6031, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23116031>

OZELIN, S. D., SENEDESE, J. M., ALVES, J. M., MUNARI, C. C., COSTA, J. C. D., RESENDE, F. A., CAMPOS, D. L., LIMA, I. M. S., ANDRADE, A. F., VARANDA, E. A., BASTOS, J. K., & TAVARES, D. C. Preventive activity of *Copaifera langsdorffii* Desf. leaves extract and its major compounds, afzelin and quercitrin, on DNA damage in *in vitro* and *in vivo* models. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 84, n. 14, p. 569–581, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/15287394.2021.1898505>

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S.; Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 11, n. 4. 2009.

POLAT, R.; ÇAKILCIOĞLU, U.; KALTALIOĞLU, K.; ULUSAN, M. D.; TÜRKMEN, Z. An ethnobotanical study on medicinal plants in Espiye and its surrounding (Giresun-Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 1–11, 2015.

PREMPRASERT, C.; TEWTRAKUL, S.; PLUBRUKARN, A.; WUNGSINTAWEEKUL, J. Anti-inflammatory activity of diterpenes from *Croton stellatopilosus* on LPS-induced RAW264.7 cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 1, p. 174–181, 2013.

RAY, A.; DITTEL, B. N. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. **Journal of Visualized Experiments**, n. 35, p. 9–11, 2010.

RAVICHANDRAN, K., SAW, N. M. M. T., MOHDALY, A. A. A., GABR, A. M. M., KASTELL, A., RIEDEL, H., CAI, Z., KNORR, D., Smetanska, I. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. **Food Research International**. v. 50, n. 2, p. 670-675, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.002>.

RIBEIRO, D. A.; DE MACEDO, D. G.; DE OLIVEIRA, L. G. S.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; DE ALMEIDA, B. V.; MACEDO, J. G. F.; MACÊDO, M. J. F.; SOUZA, R. K. D.; DE SOUZA ARAÚJO, T. M.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M. Conservation priorities for medicinal woody species in a cerrado area in the Chapada do Araripe, northeastern Brazil. **Environment, Development and Sustainability**, v. 21, n. 1, p. 61–77, 2019.

RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S. De; MACÊDO, D. G. De; MENEZES, I. R. A. De; COSTA, J. G. M. Da; SILVA, M. A. P. Da; LACERDA, S. R.; SOUZA, M. M. D. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522–1533, 2014.

RICARDO, L. M.; DIAS, B. M.; MÜGGE, F. L. B.; LEITE, V. V.; BRANDÃO, M. G. L. Evidence of traditionality of Brazilian medicinal plants: The case studies of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) barks and *Copaifera* spp. (copaíba) oleoresin in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 319–336, 12 jun. 2018.

RICHARDSON, P. M.; HARBORNE, J. B. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Second Edition. **Brittonia**, v. 42, n. 2, p. 115, abr. 1990.

RÜCKERL, D.; ALLEN, J. E. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. **Immunological Reviews**, v. 262, n. 1, p. 113–133, 2014.

SAGAR, N. A., PAREEK, S., SHARMA, S., YAHIA, E. M., & LOBO, M. G. Fruit and vegetable waste: bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 512, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12330> PMid:33350136.

SAIKI, P.; NAKAJIMA, Y.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; MIYAZAKI, K. Real-time monitoring of IL-6 and IL-10 reporter expression for anti-inflammation activity in live RAW 264.7 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 505, n. 3, p. 885–890, nov. 2018.

SALEHI, B.; ABU-REIDAH, I. M.; SHAROPOV, F.; KARAZHAN, N.; SHARIFIRAD, J.; AKRAM, M.; DANIYAL, M.; KHAN, F. S.; ABBAASS, W.; ZAINAB, R.; CARBONE, K.; FAHMY, N. M.; AL-SAYED, E.; EL-SHAZLY, M.; LUCARINI, M.; DURAZZO, A.; SANTINI, A.; MARTORELL, M.; PEZZANI, R. *Vicia plan ts*—A comprehensive review on chemical composition and phytopharmacology. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 2, p. 790–809, 15 fev. 2021.

SANTIAGO, M. B.; DOS, R. A.; CARLOS, S.; MARTINS, H. G. **Guia das copaíbas: pra quê serve?** 2021.

SANTOS, M. de O.; CAMILO, C. J.; RIBEIRO, D. A.; MACEDO, J. G. F.; NONATO, C. de F. A.; RODRIGUES, F. F. G.; MARTINS DA COSTA, J. G.; SOUZA, M. M. de A. Chemical composition variation of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. from different vegetational formations. **Natural Product Research**, p. 1–6, 28 maio 2022.

SANTOS-SILVA, J.; ARAÚJO, T. J. Are Fabaceae the principal super-hosts of galls in Brazil? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 2, 2020.

SARGIN, S. A.; SELVI, S.; BÜYÜKCENGİZ, M. Ethnomedicinal plants of Aydıncik District of Mersin, Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 200–216, 2015.

SENEDESE, J. M., ALVES, J. M., LIMA, I. M., DE ANDRADE, E. A., FURTADO, R. A., BASTOS, J. K., & TAVARES, D. C. Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1,2-dimethylhydrazine-induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. **BMC complementary and alternative medicine**, 13, v. 3, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-3>

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J. T.; SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425–6440, set. 2018.

SINGLA R. K., DUBEY A. K., GARG A., SHARMA R. K., FIORINO M., AMEEN S. M., HADDAD M. A., AL-HIARY M. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. **Journal of AOAC International**. v. 1; n. 102(5), p.1397-1400. 2019. DOI: 10.5740/jaoacint.19-0133.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990.

SMÝKAL, P.; VON WETTBERG, E. J. B.; MCPHEE, K. Legume Genetics and Biology: From Mendel's Pea to Legume Genomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3336, 8 maio 2020.

STENVINKEL, P.; KETTELER, M.; JOHNSON, R. J.; LINDHOLM, B.; PECOITS-FILHO, R.; RIELLA, M.; HEIMBÜRGER, O.; CEDERHOLM, T.; GIRNDT, M. IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly. **Kidney International**, v. 67, n. 4, p. 1216–1233, abr. 2005.

SUBIRIA-CUETO, R., CORIA-OLIVEROS, A. J., WALL-MEDRANO, A., RODRIGO-GARCÍA, J., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A., MARTINEZ-RUIZ, N. R., ALVAREZ-PARRILLA, E. Antioxidant dietary fiber-based bakery products: a new alternative for using plant-by-products. **Food Sci. Technol, Campinas**, v. 42, e. 57520, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.57520>

TANG, J.; DIAO, P.; SHU, X.; LI, L.; XIONG, L. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In Vitro Assessment and a Theoretical Model. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–8, 28 out. 2019.

TINIKUL R, CHENPRAKHON P, MAENPUEN S, CHAIYEN P. Biotransformation of Plant-Derived Phenolic Acids. **Biotechnol J.** v.13, n. 6, e 1700632, 2018. DOI: 10.1002/biot.201700632. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29278307.

TOR-ROCA, A.; GARCIA-ALOY, M.; MATTIVI, F.; LLORACH, R.; ANDRES-LACUEVA, C.; URPI-SARDA, M. Phytochemicals in Legumes: A Qualitative Reviewed Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 47, p. 13486–13496, 25 nov. 2020.

TSAI, C.-F.; CHEN, G.-W.; CHEN, Y.-C.; SHEN, C.-K.; LU, D.-Y.; YANG, L.-Y.; CHEN, J.-H.; YEH, W.-L. Regulatory Effects of Quercetin on M1/M2 Macrophage Polarization and Oxidative/Antioxidative Balance. **Nutrients**, v. 14, n. 1, p. 67, 24 dez. 2021.

USMAN, M.; KHAN, W. R.; YOUSAF, N.; AKRAM, S.; MURTAZA, G.; KUDUS, K. A.; DITTA, A.; ROSLI, Z.; RAJPAR, M. N.; NAZRE, M. Exploring the Phytochemicals and Anti-Cancer Potential of the Members of Fabaceae Family: A Comprehensive Review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 12, 16 jun. 2022.

VALADAS, L. A. R.; LOBO, P. L. D.; FONSECA, S. G. da C.; FECHINE, F. V.; RODRIGUES NETO, E. M.; FONTELES, M. M. de F.; AGUIAR TRÉVIA, L. R. de; VASCONCELOS, H. L. P.; LIMA, S. M. da S.; LOTIF, M. A. L.; FERNANDES, A. M. B.; BANDEIRA, M. A. M. Clinical and Antimicrobial Evaluation of Copaifera langsdorffii Desf. Dental Varnish in Children: A Clinical Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1–7, 25 mar. 2021.

WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma Cerrado: síntese terminológica e relações florísticas**. 2006. Universidade de Brasília, 2006.

WANG, S.; CAO, M.; XU, S.; SHI, J.; MAO, X.; YAO, X.; LIU, C. Luteolin Alters Macrophage Polarization to Inhibit Inflammation. **Inflammation**, v. 43, n. 1, p. 95–108, 31 fev. 2020.

YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

ZEB, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 9, e13394, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 8, p. 1260–1270, 24 maio 2018.