



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

LUCAS ANDRADE OLIVEIRA CAVALCANTE

**LIGNINA ALCALINA DA MADEIRA DE *Clarisia racemosa*: AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA E ESQUISTOSSOMICIDA *in vitro* E SUA UTILIZAÇÃO
COMO EXCIPIENTE NO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES
CONTENDO PRAZIQUANTEL**

Recife
2025

LUCAS ANDRADE OLIVEIRA CAVALCANTE

**LIGNINA ALCALINA DA MADEIRA DE *Clarisia racemosa*: AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA E ESQUISTOSSOMICIDA *in vitro* E SUA UTILIZAÇÃO
COMO EXCIPIENTE NO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES
CONTENDO PRAZICUANTEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia. Área de concentração em Inovações Tecnológicas em Ciências Morfológicas e sublinha em Produtos Naturais e Sintéticos Aplicados a Ensaios Toxocológicos.

Orientador: Dr. André de Lima Aires

Coorientador: Dr. Iranildo José da Cruz Filho

Coorientador: Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Cavalcante, Lucas Andrade Oliveira.

Lignina alcalina da madeira de *Clarisia racemosa*: avaliação toxicológica e esquistossomicida *in vitro* e sua utilização como excipiente no desenvolvimento de formulações contendo praziquantel / Lucas Andrade Oliveira Cavalcante. - Recife, 2025.

112f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, 2025.

Orientação: André de Lima Aires.

Coorientação: Iranildo José da Cruz Filho.

Coorientação: Hallysson Douglas Andrade de Araújo.

Inclui referências e anexos.

1. Ligninas; 2. Biomaterial; 3. *Schistosoma mansoni*. I. Aires, André de Lima. II. Filho, Iranildo José da Cruz. III. Araújo, Hallysson Douglas Andrade de. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

**LIGNINA ALCALINA DA MADEIRA DE *Clarisia racemosa*: AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA E ESQUISTOSSOMICIDA *in vitro* E SUA UTILIZAÇÃO COMO
EXCIPIENTE NO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES CONTENDO
PRAZIQUANTEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Inovações Tecnológicas em Ciências Morfológicas e sublinha em Produtos Naturais e Sintéticos Aplicados a Ensaios Toxicológicos.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

PROF.º DR.º JACINTO DA COSTA SILVA NETO

Universidade Federal de Pernambuco - Examinador Interterno ao PPGM

PROF.ª DR.ª MARY ÂNGELA ARANDA DE SOUZA

Universidade Federal de Pernambuco - Examinadora Externa ao PPGM

PROF.º DR.º DIEGO SANTA CLARA MARQUES

Universidade Federal de Pernambuco - Examinador Externo ao PPGM

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço primeiramente pela força, saúde e pelas oportunidades que me permitiram chegar até aqui.

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio, incentivo e colaboração de muitas pessoas. A todas elas, expresso minha mais sincera gratidão.

Ao meu orientador, André de Lima Aires, agradeço o apoio, incentivo, ensinamentos, as broncas (que não foram poucas) e dedicação. Um ser humano incrível, excelente professor e o melhor orientador que já tive.

Ao meu coorientador, Iranildo José da Cruz Filho, agradeço o suporte, conselhos, motivação, puxões de orelha. Um grande amigo e excelente profissional, me fez concluir uma pós, uma licenciatura e o mestrado ao longo de dois anos. Não teria chegado tão longe sem a motivação e o direcionamento de vocês.

A Hallysson Douglas Andrade de Araújo, agradeço a coorientação e suporte.

Aos docentes que fizeram parte dessa caminhada. Em especial, a professora Dr.^a Maria do Carmo de Lima, por me abrir as portas de seu laboratório, me apoiando, motivando e cobrando, sempre buscando meu desenvolvimento, minha mais sincera gratidão.

À minha família, meu alicerce e maior fonte de apoio. Aos meus pais, Gilberto Cavalcante e Jane Cavalcante, que com amor, paciência e incentivo incondicional sempre acreditaram em mim e me motivaram a seguir em frente. Ao meu irmão, cunhada e sobrinha, Gustavo Cavalcante, Amanda Cavalcante e Heloísa Cavalcante, sou grato pelo suporte emocional. Aos demais familiares que, de modo geral, são presentes em minha vida e torcem pelo meu sucesso. A minha avó, Josete Cavalcante, que sempre vibrou questionando quando concluiria o mestrado, sou grato por não me deixar parar.

Ao meu avô, José Marcos da Silva (Táto), que mesmo não estando mais presente fisicamente, continua vivo em minhas lembranças como a primeira pessoa a me chamar de “dotô”. Falta pouco, vô.

Aos meus companheiros do PPGM, Amanda Albuquerque, Wesley Brandão e Bianca Barreto, agradeço a parceria e apoio para completar esse processo.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório do Departamento de parasitologia, Wilza Wanessa França, Kennya Hevellyn Souza, Thierry Wesley Aguiar, Maria Taira Gonçalves, Emily Gabriele Diniz, Lucas Vinícius Andrade, Célio

Henrique Brandão e João Victor Ritinto, obrigado pelas risadas, ensinamentos, incentivo e correções. A vida acadêmica tem sido muito mais leve graças a vocês.

Às pessoas que fazem parte da minha vida. Meus amigos de longa data, Mayara Santiago, Katharina Pedrosa, Rodolpho Souza e Marina Lima, que sempre torceram pelo meu crescimento pessoal e profissional, assim como torço por eles, meu muito obrigado pelo carinho, força e paciência. A Thiago Garcia, agradeço o carinho, apoio, paciência, incentivo e parceria, que faz da minha trajetória uma caminhada mais tranquila. A Hugo Kenji, agradeço o carinho, apoio, incentivo, tanto na minha vida pessoal quanto acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), meu sincero agradecimento pelo apoio financeiro concedido durante minha trajetória acadêmica. O incentivo à pesquisa e à formação de novos pesquisadores é essencial para o avanço do conhecimento, e sou grato pela oportunidade proporcionada por este financiamento.

RESUMO

Ligninas são macromoléculas versáteis com inúmeras aplicações na indústria, incluindo na tecnologia farmacêutica. Compostos naturais, derivados de espécies vegetais da região amazônica, tem sido explorados como potenciais antiparasitários e no isolamento de ligninas aplicadas à indústria farmacêutica e biomédica. *Clarisia racemosa* é endêmica na região amazônica e não tem sido explorada em estudos biológicos e farmacológicos, além disto estudos preliminares de segurança toxicológica são fundamentais para sua aplicação na indústria farmacêutica, incluindo de lignina como excipiente de medicamentos. Praziquantel (PZQ) é única droga recomendada pela Organização Mundial da Saúde para controle e tratamento da esquistossomose, infecção causada por helmintos do gênero *Schistosoma* spp., acomete cerca de 264 milhões de pessoas e é responsável por 200.000 óbitos todos os anos. Apesar de seguro e eficaz, PZQ apresenta limitação físico-químicas, incluindo solubilidade aquosa e liberação. Assim, objetivamos isolar e caracterizar a lignina alcalina de *Clarisia racemosa*, sua avaliação toxicológica e esquistossomicida *in vitro* e utilização como excipiente na produção de comprimidos contendo PZQ. A lignina alcalina foi isolada e caracterizada da madeira de *C. racemosa*. A extração da lignina foi realizada usando extração ácida seguida de deslignificação. A lignina obtida foi caracterizada e foi verificado que sua estrutura é do tipo GSH, composta predominantemente por unidades G (65,41%). Além disso, foi identificada estabilidade térmica e baixo peso molecular. Em seguida, foram realizado ensaios *in vitro* de atividades antioxidante, citotoxicidade, hemolítica, imunomoduladora e esquistossomicida. A lignina exibiu atividade antioxidante moderada em ensaios de DPPH, ABTS, NO e OH. Além disso, demonstrou baixa toxicidade em diferentes linhagens de mamíferos (viabilidade >95%) e ausência de hemólise. As propriedades imunomoduladoras promoveram a proliferação celular, modulando citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10) e ativação de células imunes, demonstrando um perfil Th2. A atividade esquistossomicida reduziu a motilidade de casais de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* com mortalidade de 65% após 120h (500 µg/mL) e alterações tegumentares. Como excipiente farmacêutico, a lignina mostrou-se um biomaterial promissor, capaz de promover a liberação controlada de PZQ em comprimidos (40.1 ± 0.41 min) e boas propriedades físico-químicas apresentando friabilidade otimizada (0.93± 0.02%) em relação a comprimidos sem lignina (0.18 ± 0.0%). Os resultados destacam a biossegurança toxicológica *in vitro* da lignina e contribuem para a indústria farmacêutica ao demonstrar seu potencial na produção de comprimidos sustentáveis para o tratamento da esquistossomose.

Palavras-chave: ligninas, biomaterial, *Schistosoma mansoni*

ABSTRACT

Lignins are versatile macromolecules with broad industrial applications, including pharmaceutical technology. Natural compounds derived from plant species native to the Amazon region have been explored as potential antiparasitic agents and as sources of lignin for pharmaceutical and biomedical use. *Clarisia racemosa*, an Amazon-endemic species, has not been previously investigated in biological or pharmacological studies. Moreover, preliminary toxicological safety assessments are essential for its pharmaceutical application, including the use of lignin as a drug excipient. Praziquantel (PZQ) is the only drug currently recommended by the World Health Organization for the treatment and control of schistosomiasis, an infection caused by helminths of the genus *Schistosoma* spp., affecting approximately 264 million people and causing about 200,000 deaths annually. Despite its safety and efficacy, PZQ presents physicochemical limitations, such as low aqueous solubility and inadequate release profile. This study aimed to isolate and characterize alkaline lignin from *Clarisia racemosa*, evaluate its toxicological and schistosomicidal effects *in vitro*, and assess its application as an excipient in PZQ tablet formulations. Lignin was extracted from *C. racemosa* wood using acid extraction followed by delignification, and was identified as GSH-type, with a predominance of G units (65.41%). It exhibited thermal stability and low molecular weight. *In vitro* assays demonstrated moderate antioxidant activity (DPPH, ABTS, NO, OH), low cytotoxicity (cell viability >95%), no hemolysis, and immunomodulatory properties, including cytokine modulation (IL-4, IL-10) and activation of immune cells (Th2 profile). The lignin also showed schistosomicidal activity, with 65% mortality of adult *Schistosoma mansoni* worms after 120 hours (500 µg/mL), along with tegumental damage. As a pharmaceutical excipient, lignin enabled controlled PZQ release in tablets (40.1 ± 0.41 min) and improved physical properties, such as friability (0.93 ± 0.02%) compared to lignin-free tablets (0.18 ± 0.0%). The findings highlight the *in vitro* biosafety of lignin and its promising potential for sustainable tablet formulations targeting schistosomiasis.

Keywords: lignin, biomaterial, *Schistosoma mansoni*

LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1	a) Tronco de <i>Clarisia racemosa</i> ; b) Tora de <i>Clarisia racemosa</i> em corte transversal.	21
Figura 2	a) <i>Clarisia racemosa</i> ; b) casca de tons castanho-escuro à acinzentado; c) folhas simples e elípticas de uma plântula; d) folhas simples e elípticas de indivíduo adulto; e) frutos de coloração amarela, alaranjado e vermelho; f) semente e perianto.	22
Figura 3	Forma estrutural dos monolignóis que compõem as ligninas: álcool sinapílico (S), álcool coniferílico (G) e álcool <i>p</i> -cumarílico (H).	24
Figura 4	Estrutura química do praziquantel.	31
Figura 5	Obtenção do cerne de <i>Clarisia racemosa</i> .	36
Figura 6	Processamento do material vegetal para obtenção do material lignocelulósico	37
Figura 7	Processamento do material moído e obtenção de celulignina (Etapa 1).	37
Figura 8	Processamento da celulignina para obtenção de lignina (Etapa 2).	38

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1	FTIR (A and B), UV/Vis (C), and straight line for determining the extinction coefficient (D) for <i>Clarisia racemosa</i> lignin.	66
Figura 2	³¹ P NMR (A) and pyrogram (B) for <i>Clarisia racemosa</i> lignin.	68
Figura 3	Thermal analysis TGA (A), DTG (B), and DSC (C), respectively.	72
Figura 4	(A-B) SEM images of adult male <i>S. mansoni</i> worms not subjected to treatment (RPMI medium + DMSO) after 24h of observation. (A) Gynecophoric canal (GC) of male worms showing no abnormalities. (B) Tubercles (TU) with spicules (S). (C-D) SEM images of adult male <i>S. mansoni</i> worms treated with praziquantel (10 µM) after 24h of observation. (C) Worm showing a contorted body (arrow). (D) Severe damage to the tegument, with the appearance of burst blisters (BU) with loss of spicules. (E-F) SEM images of adult male <i>S. mansoni</i> worms treated with lignin (500 µg/mL) after 24h of observation. (E) Preservation of the gynecophoric canal (GC) and slight muscle contraction, tubercles (TU) (F) appearance of few bubbles (BU) without causing serious damage to the tegument.	77
Figura 5	Praziquantel release profile from tablets with and without lignin over a period of 120 min.	79

LISTA DE QUADROS DA DISSERAÇÃO

Tabela 1 -	Potencial biotecnológico de plantas Amazônicas.	18
Tabela 2 -	Classificação filogenética de <i>C. racemosa</i> .	20
Tabela 3 -	Histórico acerca do estudo das ligninas.	23 -24

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1 -	Results of analysis of the composition of untreated and treated <i>Clarisia racemosa</i> wood.	64
Tabela 2 -	Relative peak area distribution of the main products for <i>Clarisia racemosa</i> lignin in Py-GC/MS.	70
Tabela 3 -	Results of <i>in vitro</i> antioxidant activity promoted by lignin in a study against different assays.	73
Tabela 4 -	Motility scores of <i>Schistosoma mansoni</i> adult worms incubated with Lignin.	76
Tabela 5 -	Characterization parameters for tablets with and without lignin as excipient respectively.	78

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1.	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS DA FLORESTA AMAZÔNICA	16
2.2.	<i>CLARISIA RACEMOSA</i>	18
2.3.	LIGNINAS	22
2.4.	POSSÍVEIS APLICAÇÕES DE LIGNINAS NA INDÚSTRIA BIOMÉDICA E FARMACÊUTICA	24
2.4.1	<i>ANTIOXIDANTE</i>	25
2.4.2	<i>ATIVIDADE IMUNOMODULADORA</i>	26
2.4.3	<i>ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</i>	26
2.4.4	<i>ATIVIDADE ANTITUMORAL</i>	27
2.4.5	<i>ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA</i>	27
2.4.6	<i>ENCAPSULAMENTO DE FÁRMACOS</i>	28
2.5.	PRAZIQUANTEL	29
3.	OBJETIVOS	33
3.1.	OBJETIVO GERAL	33
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4.	METODOLOGIA	34
4.1.	PLANTA: <i>CLARISIA RACEMOSA</i>	34
4.2.	OBTENÇÃO DA LIGNINA	35
4.3.	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SÓLIDOS OBTIDOS DURANTE A ETAPA DE TRATAMENTO ÁCIDO E BASE.	36
4.4.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA LIGNINA DA MADEIRA DE <i>CLARISIA RACEMOSA</i>	37
4.5.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO	39
4.6.	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS	40
4.7.	ANIMAIS EXPERIMENTAIS E COMITÊ DE ÉTICA	41
4.8.	ATIVIDADE HEMOLÍTICA	41
4.9.	ATIVIDADE IMUNOMODULADORA IN VITRO	41
4.10.	ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA IN VITRO	42
4.10.1.	INFECÇÃO POR <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	42
4.10.2.	RECUPERAÇÃO DE VERMES E AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA IN VITRO DA LIGNINA CONTRA VERMES ADULTOS DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	42
4.10.3.	AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE E MORTALIDADE DE VERMES ADULTOS	43
4.11.	CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DOS COMPRIMIDOS DE LIGNINA DE <i>CLARISIA RACEMOSA</i> E ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE PRAZIQUANTEL	43
4.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
	ARTIGO	46
1.	INTRODUCTION	47
2.	MATERIALS AND METHODS	49
3.	RESULTS AND DISCUSSION	61
4.	CONCLUSION	76
6.	CONCLUSÃO DA DISSERTAÇÃO	109
	REFERENCIAS DA DISSERTAÇÃO	110
	ANEXO I	115

1. INTRODUÇÃO

Ligninas são biopolímeros fenólicos amorfos que fazem parte da composição primária da biomassa lignocelulósica. Essas macromoléculas, ligadas a celulose e hemicelulose, são encontradas de forma ramificada em diversas conformações (Funaoka et al., 1995; Sun, 2020). Possuindo alto peso molecular, esse componente biopolimérico é formado por anéis aromáticos com grupos hidroxila e metoxi (Ariyanta et al., 2023). Esse constituinte da madeira é considerado matéria-prima industrial subutilizada, devido ao fato de 95% da lignina produzida por fontes industriais ser queimada como combustível em usinas de calor e energia (Chio; Sain; Qin, 2019; Li et al., 2015; Ye et al., 2021). Sua estrutura complexa e versátil dificulta a utilização industrial direta, desde que apenas 2% da produção dos resíduos industriais de lignina é utilizado para aplicações após modificações (Schoenherr, 2018).

Estruturalmente, ligninas são compostas por três monolignóis: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Esses monolignóis formam as unidades primárias conhecidas como grupos siringil (S), guaiacil (G) e p-hidroxifenil (H) (Ariyanta et al., 2023; Lu e Gu, 2023). A presença de grupos hidroxilas na estrutura da lignina estabelece fortes ligações de hidrogênio intra e intermoleculares ao longo de sua cadeia e fonte natural de compostos fenólicos (Ariyanta et al., 2023; Lu e Gu, 2023).

Devido a versatilidade de suas estruturas, a lignina tem ganhado espaço na produção de bioprodutos, sendo utilizados como fonte de compostos fenólicos e aromáticos, permeando a produção de pesticidas e fertilizantes, fibras de carbono, síntese de carvões ativados, mistura com polímeros termoplásticos e extração de compostos de baixo peso molecular, como vanilina, aldeídos e ácidos alifáticos (Hu et al., 2018; Vishtal e Kraslawski, 2011). Além disso, constituintes moleculares da lignina têm sido estudados devido as suas propriedades biológicas, como, atividades anticoagulante, antioxidante, antitumoral, antiviral, imunomoduladora e antiparasitária (Da Silva Lima, 2024; Khadem et al., 2024). Os mecanismos de ação destas atividades ainda não foram elucidados, sendo objetivo de investigação.

É conhecido o potencial biológico e farmacológico de diversas plantas brasileiras (Agnes et al., 2023; Fernandes et al., 2024; Pires de Souza Junior, 2023). Desses trabalhos destacamos o crescente aumento de estudos realizados com plantas da região amazônica (Martins et al., 2021; Canteral et al., 2023; De Freitas, 2024). A floresta Amazônica, em sua vasta extensão geográfica, é amplamente reconhecida por sua biodiversidade global (De Souza, 2023). *Clarisia racemosa*, comumente conhecida como guariúba, é uma espécie arbórea encontrada nessa região, sua madeira confere destaque na indústria madeireira, sendo utilizada na carpintaria, marcenaria, construção civil e naval (Santos; Camargo & Ferraz, 2008). Embora

suas aplicações comerciais sejam bem estabelecidas, suas propriedades biológicas ainda são, em grande parte, pouco conhecidas. Alguns estudos reportam atividades biológicas de extrativos derivados de partes vegetais, com destaque para o cerne, a saber, citotoxicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*, atividades antitumoral antiparasitárias, inseticida, antioxidante e efeitos fotoprotetores (Albuquerque Nerys et al., 2022; Cruz Filho et al., 2023; Júnior et al., 2018; Melo, 2015). As propriedades biológicas da madeira de *C. racemosa* sugerem seu potencial como fonte de biocompostos de importância biomédica e farmacológica.

O uso de ligninas como biomaterial para indústria farmacológica é de interesse da comunidade científica. Suas propriedades físico-químicas permitem que essas macromoléculas sejam utilizadas como excipiente ou encapsulamento de compostos naturais, sintéticos e de drogas já comercializadas. Sua capacidade de encapsular fármacos lipofílicos pode conferir a lignina liberação controlada e/ou direcionada de fármacos, como reportado na terapia de câncer (Sugiarto, 2022). Seu uso como excipiente de fármacos já foi explorado com antiparasitários, melhorando dureza, tempo de liberação e desintegração de comprimidos com benzonidazol (Cruz-Filho et al., 2023b).

Esses resultados incentivam o melhoramento de drogas já consolidadas pela indústria farmacológica, a exemplo do Praziquantel (PZQ), única droga recomendada pela Organização Mundial da Saúde para controle e tratamento da esquistossomose. A infecção causada por *Schistosoma mansoni* afeta cerca de 264 milhões de pessoas em todo o mundo (WOH, 2024). Apesar de seguro e eficaz, PZQ apresenta limitação físico-químicas, incluindo solubilidade aquosa e liberação, demonstrando a necessidade de melhoramento de sua entrega.

Este estudo objetiva, pela primeira vez, isolar e caracterizar a lignina alcalina de *Clarisia racemosa*, avaliar sua segurança toxicológica *in vitro* a partir de ensaios de citotoxicidade, hemolítico, antioxidantes e imunorregulatórios; além da atividade esquistossomicida e sua utilização como excipiente na produção de comprimidos contendo Praziquantel. Este estudo certamente contribuirá para a indústria farmacêutica ao demonstrar pela primeira vez a segurança toxicológica e o potencial da lignina na fabricação de comprimidos sustentáveis para tratamento da esquistossomose.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Potencial biotecnológico de plantas da floresta amazônica

A floresta Amazônica é a região de maior riqueza e diversidade biológica do mundo, compreendendo cerca de 40% do continente Sul-americano (7,5 milhões de Km²) (Silva-Souza e Souza, 2020). Estendendo-se por 9 países, a floresta Amazônica corresponde a 25% da biodiversidade global, abrigando 16.000 espécies de árvores, contribuindo para o funcionamento biogeoquímico e climático da Terra (Malhi et al., 2008; ter Steege et al., 2013), bem como para a colonização de outras regiões, atuando como fonte de linhagens biológicas (Antonelli et al., 2018).

Cada planta possui particularidades, diferenciando-se tanto por características morfológicas, quanto por sua composição fitoquímica. A compreensão dessa diversidade impulsiona estudos em várias vertentes. Em seus trabalhos ecológicos e biogeográficos, Asner e colaboradores (2014, 2015) utilizaram dados espectrais para avaliar características de espécies vegetais, buscando compreender sua ecologia, evolução e distribuição. Através de refração de luz e/ou transmitância da folhagem da planta, utilizando espectroscopia, obtiveram previsões precisas de várias características químicas funcionais, dentre elas crescimento das plantas e metabólitos primários, como conteúdo foliar de carbono, nitrogênio, fósforo e clorofila, bem como características ligadas à defesa e metabólitos secundários, como compostos fenólicos e lignina (Asner e Martin 2011, Asner et al. 2014, 2015). Sabe-se que os bioativos das espécies vegetais corresponde até 40% em seu peso seco, sendo disposto um grande investimento energético para que a árvore os produza (Salazar et al. 2018). Cada espécie arbórea produz dezenas de metabólitos secundários de diferentes vias metabólicas que, de forma individual ou combinada, atuam minimizando a herbivoria de animais vertebrados e invertebrados, eliminam patógenos fúngicos, microbianos e vírus (Richards et al. 2015, 2016). Esses compostos, além de conferir proteção as espécies vegetais são importantes fontes de compostos com potencial biotecnológico, sendo empregados em varios setores industriais como: setor farmacológico, biocombustíveis, cosméticos, celulose e agroindústria. Alguns dos trabalhos mais recentes que evidenciam o potencial biotecnológico de plantas amazônicas estão listados na quadro 1.

Quadro 1: Potencial biotecnológico de plantas Amazônicas.

Autor/ano	Espécie/parte vegetal	Propriedades estudadas
Reis et al. (2019)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bertholletia excelsa</i> (Castanha-do-brasil) - casca; • <i>Euterpe oleracea</i> (Açaí) - semente; 	Potencial de combustão de biomassa: todas apresentaram potencial para uso em bioenergético.

	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Theobroma grandiflorum</i> (Cupuaçu) – casca; • <i>Theobroma cacao</i> (Cacau) - casca; • <i>Cocos nucifera</i> L. (Coco) – casca. 	
Mohd-Salleh et al. (2020)	<i>Pereskia bleo</i> (ora-pro-nóbis) - Folhas	Propriedades citotóxica e anticâncer do extrato aquoso das folhas: <ul style="list-style-type: none"> • Atividade citotóxica com CI_{50} de 14,37 $\mu\text{g/mL}$, seletividade contra células HeLa (células de câncer cervical). • Alto potencial anticâncer através da via de sinalização Bax/Bcl-2 com envolvimento da caspase-3.
Santana (2020)	<i>Protium altsonii</i> Sandwith e <i>Protium hebetatum</i> Daly – Casca e folhas	Atividade <i>leishmanicida in vitro</i> de monoterpenos presentes nos óleos essenciais contra <i>Leishmania amazonensis</i> .
Tavares et al., (2020)	<i>Euterpe olerace</i> (Açaí) - Sementes	Uso de agentes de acoplamento de compósitos de Polipropileno a partir de influência do tratamento térmico das fibras de sementes.
Martins et al. (2021)	<i>Siparuna guianensis</i> - Folhas	Óleo extraído das folhas com fitocompostos com ação neuroprotetora e contra Alzheimer (<i>in silico</i>).
Canteral et al., (2023)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Euterpe oleracea</i> (açaí) - sementes; • <i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-pará) - Casca; • <i>Elaeis guineensis</i> Jacq (Dendê) - palm kernel cake. 	Uso de biochars, produzido a partir de resíduos agroindustriais derivados de plantas amazônicas, como fonte de fósforo aplicados ao solo na forma de biofertilizante.
De Freitas (2024)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Coccoloba mollis</i> - raiz e folha; • <i>Mauritia flexuosa</i> (buriti) - raiz e folha; • <i>Mouriri arborescens</i> - raiz e folha 	Potencial fitorremediador diferencial de mercúrio por plantas acumuladoras.

O potencial biotecnológico das espécies vegetais amazônicas vem ganhando espaço nas pesquisas, tanto a nível industrial quanto laboratorial em pesquisas básicas e aplicadas. No setor agrícola, trabalhos sugerem investigações sobre fitotoxicidade, observando o potencial alelopático de espécimes vegetais a partir dos seus metabólitos secundários, onde tais metabólitos podem interferir no estabelecimento de outras plantas, influenciando aspectos do desenvolvimento, como germinação e crescimento (Latif et al., 2017; Lima, 2021). Aspectos importantes para a qualidade dos produtos comercializados e nas esferas da economia industrial e cadeia produtiva de pequenos agricultores.

No setor farmacológico, óleos e extratos vegetais derivados de plantas Amazônicas vem sendo priorizados como fontes de propriedades biológicas, tais como atividades antioxidantes, antibacterianas, antiparasitárias e citotóxicas (Chura, 2023; Da Cruz Filho et al., 2023; De

Queiroz et al., 2023; de Albuquerque Nerys et al., 2022). Azevedo e colaboradores (2021) investigaram propriedades biológicas de plantas amazônicas da família Euphorbiaceae onde uma nanoemulsão produzida a partir do óleo essencial extraído das folhas da *Croton cajucara* Benth, apresentaram resultados antifúngicos contra zigomicetos, especialmente contra as cepas *Mucor ramosissimus* e *Candida albicans* testadas, inibindo 100% de sua atividade de protease extracelular. Outros estudos e revisões etnofarmacológicas analisaram o uso popular de *C. cajucara* e seus derivados; óleos, cápsulas e pílulas; como potencial analgésico e agente hepatoprotetor, bem como para o tratamento de diabetes, diarreia, dores de estômago, febre, hepatite e malária (Antunes, 2022; Costa, 2007; Tieppo, 2006; Veiga, 2005).

Pantoja et al, (2023), analisou as atividades biológicas de compostos fenólicos bioativos da casca de *Brosimum acutifolium*, planta amazônica pertencente a família Moraceae, onde os compostos fenólicos da classe flavonoide foram encontrados como majoritários. Os flavonoides foram indicados como responsáveis pelas atividades biológicas observadas, tais como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e neuroprotetora, corroborando trabalhos como o de Maués et al. (2019), acerca do potencial desta espécie.

Ainda sobre a família Moraceae, Albuquerque Nerys et al. (2022) publicaram resultados da caracterização química e diferentes atividades biológicas, incluindo antiproliferativa, antimicrobiana, antioxidante, antiglicante, fotoprotetora, toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico de *Clarisia racemosa*. Os resultados destacam seu potencial terapêutico e os autores despertam a pesquisa sobre espécies vegetais da região amazônica como fonte importante de bioativos aplicados na saúde. Estudos *in vitro*, realizados com extrato do cerne de *C. racemosa* demonstrou baixa toxicidade, estímulo da atividade promotora de proliferação de células imunes, além de estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias. Ademais, o extrato exibiu promissora atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis*, *Schistosoma mansoni* e *Tripanosoma cruzi* (Da Cruz Filho et al., 2023). Destacando seu potencial como agente antiparasitário e segurança toxicológica.

2.2. *Clarisia racemosa*

Encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, incluindo algumas espécies de áreas temperadas, a família Moraceae compreende cerca de 1500 espécies de plantas distribuídas em 63 gêneros (Souza & Lorenzi, 2012). Baseado em inferências filogenéticas, Moraceae foi recuperada como uma das nove famílias atualmente reconhecidas na ordem Rosales (APG IV, 2016). A família se destaca pela abundância de indivíduos e pela riqueza de espécies presentes na Floresta amazônica, junto a família Fabaceae, é uma das dez

com maior número de espécies arbóreas no mundo (Torres et al., 2023). Além disso, é reconhecida pelo alto valor econômico de suas madeiras (Daïnou et al., 2014) e seus usos medicinais (Nair, 2021). No Brasil, esta família é representada por 21 gêneros e 231 espécies, com endemismo para 71 delas e 206 referidas como sinônimos (Pederneiras et al., 2020).

O gênero *Clarisia* foi descrito inicialmente por Abat em 1792 e, logo a após, por Ruiz & Pavon em 1794 (Lanjouw & Rossberg 1936). O gênero conta com 12 espécie conhecidas, tendo a *Clarisia racemosa* (Ruiz et Pavon) (Quadro 2) como uma das suas principais representantes. *C. racemosa*, comumente conhecida como grariúba, é uma espécie arbórea encontrada na região Amazônica.

Quadro 2: Classificação filogenética de *C. racemosa*.

Reino:	Plantae
Sub-reino:	Embryophyta
Superfilo:	Spermatophyta
Divisão:	Angiospemae (Magnoliophyta)
Classe:	Dicotyledoneae (Magnoliopsida)
Subclasse:	Archichlamydeae (Hamamelidae)
Ordem:	Urticales
Família:	Moraceae
Gênero:	<i>Clarisia</i>
Espécie:	<i>Clarisia racemosa</i>
Nome popular:	Guariúba, oiticica e tatajuba amarela (Brasil); murere (Bolívia), moral, aji e guariú-ba (Colômbia), pituca e matapolo (Equador) e capinuri e murere (Peru).

Fonte: Braz-Filho (1994); Cronquist (1981), Joly (1998); Santos; Camargo & Ferraz (2008).

Considerada de médio a grande porte, sua altura pode chegar aos 40 metros, com diâmetro em torno de 70 cm seu troco é delgado e retilíneo, com coloração amarelo-vivo (Figura 1: b) que exposta à luz solar e ao ar atmosférico escurece tornando-se castanho amarelo-escuro (Santos; Camargo & Ferraz, 2008). Sua casca é de cor castanho-escuro a acinzentada e internamente vermelha (Figura 2: b). A árvore exsuda abundantemente um látex viscoso branco, também encontrado em outras espécies de Moraceae. Suas folhas são alternas e simples de forma elíptica (Figura 2: c e d), e suas árvores são dióicas, produzindo apenas inflorescência masculina ou feminina, sendo a última encontrada em menor quantidade (Santos; Camargo & Ferraz, 2008). Seu fruto é classificado como pseudofruto, embora não haja consenso entre a

comunidade científica. O fruto é adnato ao perianto, e possui coloração amarela, alaranjado e vermelho quando maduros (Figura 2: e) (Santos; Camargo & Ferraz, 2008).

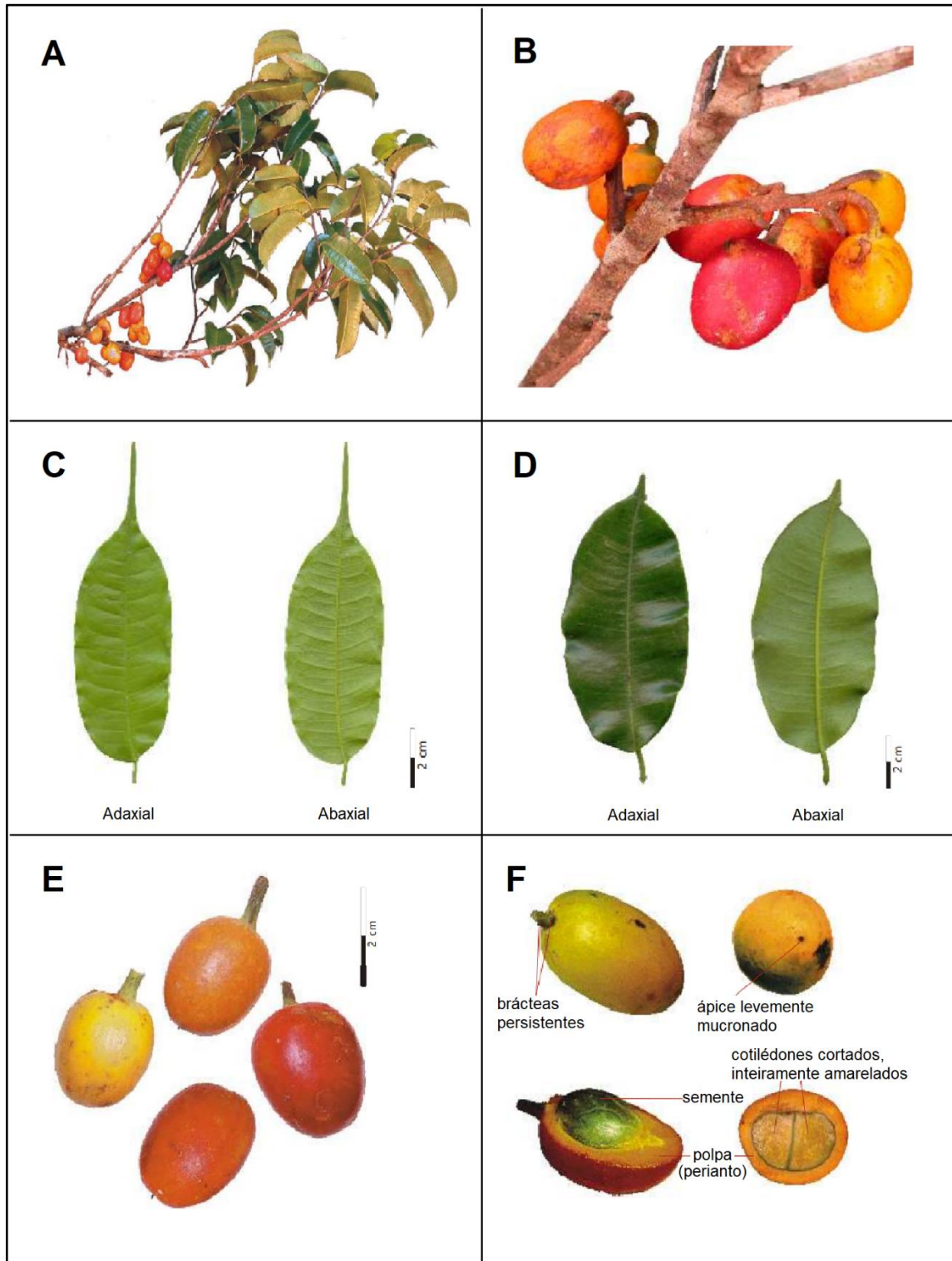
Em ensaios biológicos realizados até o fim da década de 1970, já apresentavam resistência contra fungos e insetos (Chundoff 1979; Santos; Camargo & Ferraz, 2008). O cerne da árvore de *C. racemosa* é moderadamente resistente a fatores de decomposição, onde sua madeira é utilizada em larga escala na indústria madeireira, para construção e carpintaria, sendo importante na indústria de compensados e laminados do estado do Amazonas (Lima et al. 2005). É comercializada principalmente no Brasil, mas também é exportada.

Figura 1: a) Tronco de *Clarisia racemosa*; b) Tora de *Clarisia racemosa* em corte transversal.



Fonte: (a) Foster; (b) LFP- Governo Federal

Figura 2: a) *Clarisia racemosa*; b) casca de tons castanho-escuro à acinzentado; c) folhas simples e elípticas de uma plântula; d) folhas simples e elípticas de indivíduo adulto; e) frutos de coloração amarela, alaranjado e vermelho; f) semente e perianto.



Fonte: adaptado de Santos; Camargo & Ferraz, 2008.

Apesar do amplo conhecimento sobre o aplicações comerciais desta planta, as propriedades biológicas derivadas de seus compostos ainda são, em grande parte, pouco

conhecidas. Trabalhos recentes buscam preencher lacunas acerca das atividades biológicas da *C. Racemosa*. Souza de Melo (2014) e Albuquerque Nerys et al. (2022), investigaram sua toxicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*, atividade antioxidante e efeitos fotoprotetores. Além destes, outros autores estudaram suas atividades antitumoral (Melo, 2015), antiparasitárias (Cruz Filho et al., 2023a) e inseticida (Júnior et al., 2018).

Os principais constituintes da madeira de *C. racemosa* conferem a planta uma alta complexidade estrutural quanto a sua composição bioquímica, isso se deve ao entrelaçamento da celulose (hexoses), hemicelulose (pentoses) e lignina. A composição da madeira apresentam valores que variaram de 40,58% a 50,51% para celulose, 16,54% a 24,1% para hemicelulose, 25% a 34,72% para lignina, 3,82% a 16,01% para extrativos e 0,3% para 1,67% para cinzas, tais variações são atribuídas a fatores diversos, tais como sazonalidade, condições climáticas, altitude e métodos de quantificação (Sluiter et al., 2010; Santos, 2015; Ingá & Castillo 2016; Albuquerque Nerys et al. 2022). Através do estudos fitoquímicos, Santos (2015), relatou que a madeira continha 0,95% de polifenóis totais e 0,71% taninos.

2.3.Ligninas

Descrita como um biopolímero fenólico amorfo, a lignina é um componente primário da biomassa lignocelulósica, encontrada ramificada de diversas formas e estando fortemente ligadas a celulose e hemicelulose (Funaoka et al., 1995; Sun, 2020). Possuindo um alto peso molecular, esse componente biopolimérico aromático natural, apresenta grupos hidroxila e metoxi em seus anéis aromáticos (Ariyanta et al, 2023). Tal constituinte da madeira, estudado desde o século IX (Quadro 3), é considerado matéria-prima industrial subutilizada, isso se deve ao fato de, atualmente, 95% da lignina produzida por fontes industriais ser queimada como combustível em usinas de calor e energia (Chio; Sain; Qin, 2019; Li et al., 2015; Ye et al., 2021). Sua estrutura complexa dificulta sua utilização industrial direta, desde que apenas 2% da produção dos resíduos industriais de lignina é utilizada para aplicações após modificações (Schoenherr, 2018).

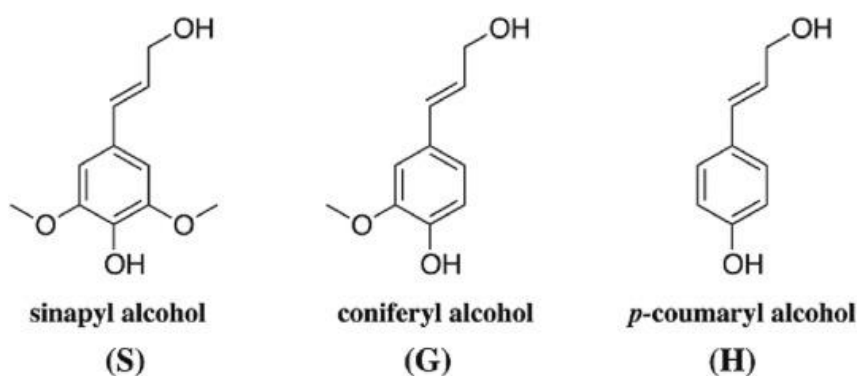
Quadro 3: Histórico acerca do estudo das ligninas.

Histórico	
Schulze, 1865	Criou o termo “lignina”, originário da palavra latina <i>lignum</i> (madeira).
Peter Klason, 1897	Sugeriu a hipótese de que a lignina seria ligada estruturalmente ao álcool conifilico; teoria confirmada posteriormente a partir de métodos de caracterização que encontraram unidades de álcool coniferílico em sua conformação.

Klason, 1908	Propõe que a lignina possui uma complexa estrutura molecular;
Klason, 1917	Afirmou que ligações éter conectavam o álcool coniferílico.
Klason, 1920	No mesmo ano, autor relata a primeira quebra elementar da lignina Klason (lignina isolada, chamada de Klason em sua homenagem).
Winsvold e Heurser, 1921	Descobriram que a fusão alcalina da lignina produzia quantidades consideráveis de ácido oxálico.
Heurser e Samuelson, 1922	Propuseram que 25% de ácido oxálico é produzido pela oxidação da lignina em um meio alcalino após pré-hidrólise e metilação.

Estruturalmente, as ligninas são compostas por três monolignóis: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (figura 3). Esses monolignóis formam as unidades primárias conhecidas como grupos siringil (S), guaiacil (G) e *p*-hidroxifenil (H) (Ariyanta et al., 2023; Lu e Gu, 2023). Para que a lignina seja formada, é preciso que unidades de fenilpropano sejam unidas por conexões químicas de grupos alquil-aril, alquil-alquil e aril-aril. A proporção de lignina e sua estrutura varia de acordo com a espécie de planta (Hatakeyama e Hatakeyama, 2009). No âmbito funcional, ligninas facilitam o transporte de água e nutrientes, conferindo também, resistência à parede celular e proteção aos polissacarídeos contra a degradação microbiana (Yang et al., 2024). Lignina apresenta potencial de valorização para bio-compósitos e materiais antioxidantes, devido à sua natureza fenólica e à presença de vários grupos funcionais (OH, COOH, OCH₃ e C=O) (Agustiany et al., 2022; Ridho et al., 2022).

Figura 3: Forma estrutural dos monolignóis que compõem as ligninas: álcool sinapílico (S), álcool coniferílico (G) e álcool *p*-cumarílico (H).



Fonte: Strassberger, Tanase e Rothenberg (2014)

Os biocompósitos e materiais antioxidantes, obtidos a partir da lignina, são úteis na agroindústria, servindo como aditivos, estimuladores de crescimento de plantas para produção alimentar, materiais de embalagem e fertilizantes (Abbas, 2022). Atualmente as pesquisas sobre o uso das ligninas tem como foco a sua aplicação nas biorrefinarias e na indústria bioenergética direcionadas a produção de combustíveis, tratamento de águas residuais e transformações biológicas (Khan, 2019; Li, 2015; Liu, 2020; Ye, 2021; Yaguchi, 2021).

De forma massiva, a lignina é comumente adquirida em indústrias de celulose e papel, onde os componentes não celulósicos da madeira são dissolvidos e separados das fibras por meio do processo de cozimento para a obtenção desse subproduto na forma de licor negro (licor negro), (Amieva, 2025; Pola et al., 2022). Até 2030, estima-se que a indústria de papel e celulose irá gerar cerca de 225 milhões de toneladas de lignina por ano (Yang et al., 2024). Apenas no ano de 2021, o mercado mundial movimentou cerca de US\$ 864,67 milhões, com produtos a base de lignina e a expectativa é que ele atinja US\$ 1.179,48 milhões até 2030 (Straits et al., 2022). Essas macromoléculas fenólicas podem ser isoladas e extraídas do licor por tecnologia de precipitação ácida, pela tecnologia de fracionamento de solvente orgânico e pela tecnologia de ultrafiltração por membrana (Yang et al., 2024; Huang et al., 2024).

Seja como derivado residual ou valorizado pela incineração, o licor negro vem despertando o interesse como um recurso renovável emergente, devido ao seu potencial de recuperação ou transformação de produtos de alto valor agregado (Amieva, 2025). Com aplicações versáteis na produção de bioprodutos avançados, bem como alternativa a compostos fenólicos e aromáticos, a utilização das ligninas permeiam os setores de produção de pesticidas e fertilizantes, produção de fibras de carbono, síntese de carvões ativados, mistura com polímeros termoplásticos e extração de compostos de baixo peso molecular, como vanilina, aldeídos e ácidos alifáticos (Hu et al., 2018; Vishtal e Kraslawski, 2014). Sua versatilidade também confere a essa macromolécula propriedades biológicas, como atividades anticoagulante, antioxidante, antitumoral, antiviral e imunomoduladora e antiparasitária (Da Silva Lima, 2024; Khadem et al., 2024). Os mecanismos de ação para compreensão de tais atividades ainda não foi elucidada, e continuam sendo discutidos pela comunidade acadêmica.

2.4. Possíveis aplicações de ligninas na indústria biomédica e farmacêutica

No campo biomédico, parte da biomassa lignocelulósica já possui estudo e aplicações reportadas na literatura. A exemplo da celulose, que é um reconhecido material biomédico a décadas devido às suas propriedades mecânicas únicas, disponibilidade, biodegradabilidade e biossegurança (Sugiarto et al., 2022). Ligninas, por sua vez, possuem menor espaço nesse setor,

com estudos de aplicações biomédicas e farmacológicas mais recentes. Os trabalhos sugerem que a aplicação em biomateriais baseados em lignina carecem de foco na biocompatibilidade, metabolização e excreção *in vivo*. A heterogeneidade da lignina natural é constatada a partir dos múltiplos recursos e métodos de extração, o que torna difícil seu desenvolvimento e aplicação nessas áreas, tanto em pesquisa quanto na indústria (Khadem et al., 2024; Sugiarto et al., 2022). A compreensão limitada dos mecanismos de metabolização e excreção da lignina pelo corpo humano ainda representa um dos principais desafios para sua aplicação como biomaterial atualmente (Lima et al., 2024; Sugiarto et al., 2022), porém, a utilização dessa macromolécula pela indústria farmacológica é defendida devido suas propriedades anteriormente comprovadas. Khadem e colaboradores (2024), revisaram e elucidaram as propriedades biológicas de hidrogéis a base de ligninas de diversas origens, tais como atividades antioxidante, anticoagulante, antitumoral, antiviral e imunomoduladora. Outros autores apontam ainda suas propriedades antimicrobianas (Araújo et al., 2022; da Cruz Filho et al., 2023b; Figueiredo et al., 2018) e antiparasitária (da Cruz Filho et al., 2023b; Silva et al., 2021) e suas aplicações nanotecnológicas (Liu et al., 2020; Figueiredo et al., 2018). Estes recentes estudos, destacam o potencial inovador e sustentável de ligninas e sua aplicação em diferentes áreas da saúde humana e animal.

2.4.1 Antioxidante

São classificadas como antioxidantes toda molécula capaz de eliminar ou inibir radicais livres em sistemas vivos e alimentos de modo a evitar ou reverter suas oxidações. A propriedade de eliminar radicais livres pela lignina é conhecida pela ciência a pelo menos duas décadas (Dizhbite et al., 2004). Azadfar e colaboradores (2015) observaram que a atividade antioxidante da lignina obtida do pré-tratamento de palha de trigo com ozônio e imersão em amônia aquosa, é comparável aos antioxidantes usados comercialmente, a exemplo do guaiacol e hidroxitolueno butilado. Os resultados obtidos a partir de ensaio antioxidante DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) sugeriram uma porcentagem de inibição dos radicais DPPH na seguinte ordem: guaiacol ($103,6 \pm 1,36$) > hidroxitolueno butilado ($103,3 \pm 1,0$) > ácido ferúlico ($102,6 \pm 0,8$) > lignina pré-tratada ($86,9 \pm 0,3$) (Azadfar et al., 2015). Em 2019, Cruz Filho e colaboradores compararam ligninas isoladas de duas espécies da família Cactaceae, *Opuntia cochenillifera* e *Opuntia ficus-indica*, ambas encontradas em regiões áridas do nordeste brasileiro e comumente utilizadas como ração para gado. Em seu estudo, constataram maior atividade antioxidante para ligninas de *O. cochenillifera*, que apresentou valor de EC_{50} de $253,9 \mu\text{g/mL}$ no ensaio ABTS. O resultado sugerem que a capacidade antioxidante das ligninas está associada à presença de grupos fenólicos, visto que, *O. cochenillifera* possui uma maior quantidade de grupos fenólicos em sua estrutura química.

2.4.2 *Atividade imunomoduladora*

Apesar da capacidade imunomoduladora da lignina ser conhecida, o mecanismo de ação para essa atividade ainda não está totalmente elucidado, o que pode levar a diferentes respostas imunológicas (Arruda et al., 2021). Em sua estrutura, ligninas possuem grupos funcionais que incluem hidroxilas alifáticas e aromáticas, éteres, carbonilas e metoxilas, que podem ser reconhecidos por receptores presentes da superfície de membranas celulares, desencadeando respostas imunes observadas em ensaios *in vitro* (Arruda et al., 2021; Santos et al., 2020). As ligninas alcalinas de *Opuntia cochenillifera* e *Opuntia ficus-indica*, avaliadas por Cruz Filho e colaboradores (2019), indicaram que as macromoléculas demonstraram alta viabilidade celular (>96%) e proliferação celular. Seus resultados incluem ainda aumentos nas espécies reativas de oxigênio (ROS) e níveis de cálcio citosólico, bem como mudanças no potencial da membrana mitocondrial. As ligninas estudadas por Cruz Filho, induziram uma alta produção de TNF- α , IL-6 e IL-10, ao passo que reduziram a liberação de óxido nítrico (NO), demonstrando assim potencial como moléculas de perfil pró-inflamatório.

Em seus estudos de perfil imunomodulador de lignina de *Conocarpus erectus*, Santos e colaboradores (2020), identificaram que a macromolécula estimulou a diferenciação de linfócitos e monócitos, ativou células T CD8⁺ e aumentou a liberação de nitrito e citocinas associadas às respostas Th1 e Th2, particularmente aquelas ligadas a uma resposta pró-inflamatória. Araújo e colaboradores avaliaram as ligninas das folhas de *Buchena viavidiflora*, e seus resultados mostraram que elas induziram significativamente a produção de citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL-10 e IL-6, demonstrando um perfil Th2. Esses resultados sugerem que as ligninas são promissores agentes imunomoduladores.

2.4.3 *Atividade antimicrobiana*

Para proteção da própria planta da qual são derivadas, ligninas atuam como antimicrobianos naturais. Resultados *in vitro*, sobre essas propriedades frente a ação de microrganismos já foram relatados em literatura. Araújo e colaboradores (2022), observaram ações bactericidas das ligninas de ramos e folhas de *Buchena viavidiflora*, ao qual essas macromoléculas apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* UFPEDA-709, *Enterococcus faecalis* UFPEDA-69 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA-261. As atividades contra bactéria são atribuídas ao fragmento fenólico da lignina, que possui uma ligação dupla na posição C α = C β da cadeia lateral e um grupo metil na posição γ (Kai et al., 2016). Araújo e colaboradores (2022), também constataram que as ligninas foram capazes de inibir o

crescimento da levedura *Candida albicans* 4664. Em estudo similar, Cruz Filho e colaboradores (2023) investigaram lignina obtida a partir de folhas de *Morinda citrifolia*, frente a *Staphylococcus aureus* UFPEDA-709, bem como para *Candida albicans* 4664 e *Candida glabrata* UFPEDA-6393, constatando atividade antimicrobiana, com concentração inibitória mínima (CIM) de 512 µg/mL.

2.4.4 Atividade antitumoral

Ligninas alcalinas obtidas de ramos e folhas de *Buchena viavidiflora*, foram avaliadas quanto a sua atividade anticâncer, obtendo valores de CI₅₀ frente a células Jurkat (21,37; 25,76 µg/mL), MCF-7 (12,63; 24,88 µg/mL), T47D (25,46; 47,74 µg/mL), DU145 (37,56; 41,65 µg/mL) e HepG2 (>100 µg/mL) (Araújo et al., 2022). Em estudo similar, Silva e colaboradores (2023) avaliaram as atividades antitumorais da lignina de *Caesalpinia férrea*, frente a células obtendo valores de CI₅₀: MCF-7 (45,1 ± 0,1 µg/mL), T-47D (50,4 ± 0,2 µg/mL), NCI-H292 (65,9 ± 0,01 µg/mL), HT-29 (78,5 ± 0,2 µg/mL), Jurkat (79,8 ± 0,0 µg/mL), DU145 (87,2 ± 1,0 µg/mL), HepG2 (88,5 ± 0,3 µg/mL), HL-60 (95,2 ± 0,1 µg/mL) e HEp-2 (98,4 ± 0,2 µg/mL).

2.4.5 Atividade antiparasitária

Estudos recentes abordaram atividades antiparasitárias de ligninas contra *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*. Atividades leishmanicidas foram avaliadas por Silva e colaboradores (2021), contra a forma promastigota do parasito, utilizando lignina de *Morinda citrifolia* e por Cruz Filho e colaboradores (2023), utilizando ligninas de *Protium puncticulatum* e *Scleronema micranthum*. Em ambos os trabalhos foi realizada análise ultraestrutural usando microscopia eletrônica, que constatou alterações ultraestruturais na morfologia do parasito.

Contra *Trypanosoma cruzi*, Silva e colaboradores (2023), avaliaram a atividade tripanocida contra formas epimastigota, tripomastigota e amastigota do parasito, utilizando lignina de folhas de *Caesalpinia ferreana*. Em seus experimentos obtiveram resultados para as duas primeiras formas em ensaios *in vitro*, com valores de CI₅₀ de 29,34 ± 0,5 µg/mL para a forma epimastigota, 47,59 ± 0,1 µg/mL para a forma tripomastigota e 200,49 ± 0,4 µg/mL para a forma amastigota. Acredita-se que, devido ao tamanho das moléculas de lignina, o efeito citotóxico observado ocorre pela interação de grupos presentes na estrutura da macromolécula com a superfície do parasito. Tal efeito pode explicar a baixa citotoxicidade promovida pela macromolécula contra formas amastigotas de *T. cruzi*, visto que essa forma desenvolve no meio intracelular. Cruz Filho e colaboradores (2023), avaliaram a atividade tripanocida das

ligninas de ramos e folhas de *Protium puncticulatum* e *Scleronema micranthum*, obtendo valores de CI_{50} variando de 15,54 a 20,34 $\mu\text{g/mL}$.

A atividade anti-*Plasmodium*, a partir da lignina encontrada nos ramos e folhas de *Buchena viavidiflora*, foi investigada por Araújo e colaboradores (2022). Em seu estudo, forem observados valores de CI_{50} de 5592,38 ng/mL para lignina de ramo e 2511,44 ng/mL para lignina de folha contra a cepa *Plasmodium falciparum* 3D7. Para cepas Dd2 de *P. falciparum* foi encontrada CI_{50} de 9.760 ng/mL (lignina de galho) e 2.440 ng/mL (lignina de folha). No mesmo estudo em que avaliou as atividades leishmanicida e tripanocida, Cruz Filho e colaboradores (2023), avaliou o perfil anti-*Plasmodium* das ligninas dos ramos e folhas de *Protium puncticulatum* e *Scleronema micranthuman*, tendo seu valor de concentração inibitória inferior a 20% frente as cepas 3D7 (A) e Dd2.

2.4.6 Encapsulamento de fármacos

Devido suas propriedades físico-químicas, as macromoléculas de lignina são estudadas como potenciais biomateriais para encapsulamento de compostos naturais, sintéticos e de drogas já comercializadas. Sua capacidade de encapsular fármacos lipofílicos pode conferir a lignina liberação controlada e/ou direcionada de fármacos que são aplicáveis na terapia de câncer e tumor (Sugiarto, 2022). Alqahtani e colaboradores (2019), estudaram a viabilidade potencial da utilização de nanopartículas de lignina organosolv reticuladas (LNP) para administração oral de fármacos, onde encapsularam com sucesso um modelo de fármaco lipofílico usando curcumina em LNP com um tamanho médio de 104 nm com uma eficiência de encapsulamento de 92%. Além do fármaco encapsulado ser considerado estável sobre condições de armazenamento, ensaios de liberação *in vitro*, apresentaram alta estabilidade em condições gástricas simulada e liberação lenta desejável sob condições intestinais. A biodisponibilidade da curcumina aumentou em 10 vezes em comparação com a curcumina não formulada (Alqahtani et al., 2019).

Tortora e colaboradores (2014), estudaram a formação assistida de microcápsulas de lignina Kraft preenchidas com óleo, por ultrassom. Seu trabalho mostrou que as microcápsulas de seriam viáveis para o estudo de liberação de fármacos de cumarina-6 (em diferentes meios), bem como para a biocompatibilidade, direcionada a estudos *in vitro* utilizando células de ovário de hamster chinês (CHO). Seus resultados mostraram que as microcápsulas de lignina não apresentaram citotoxicidade para as células de ovário de hamster chinês. Esses trabalhos trazem boas perspectivas do potencial do uso de fontes de lignina renováveis de base biológica no campo biomédico.

2.5. Praziquantel

Desde o início da década de 1970, nos laboratórios da Bayer[@], Alemanha, vem sendo explorada atividades antiparasitárias do sistema de anéis pirazino isoquinolina (estrutura central que compõe o Praziquantel (PZQ) (Andrews 1981). Ainda na década de 70, uma grande série de compostos pirazino isoquinolina foram sintetizados pela empresa E. Merck, também na Alemanha, como ação tranquilizantes. Um acordo entre as empresas Bayer[@] e E. Merck[@] foi estabelecido para a realizar triagem *in vivo* desses produtos sobre espécies de helmintos (Seubert et al. 1977; Cioli & Pica-Mattoccia, 2003). Após triagem *in vitro* destes compostos, um promissor composto denominado de EMBAY 8440 ou Praziquantel foi explorado em estudos *in vivo*. Assim, em 1977 foram publicados estudos que reportaram a atividade anticestóide e antitrepatóide em animais tratados com EMBAY 8440 ou praziquantel (Thomas e Gönnert 1977; Gönnert & Andrews, 1977). Um ano após, foram realizados os primeiros estudos com voluntários humanos, que junto a Organização Mundial de Saúde (OMS), permitiram os primeiros ensaios clínicos em áreas endêmicas para *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* (Davis et al. 1979; Katz et al. 1979; Leopold et al., 1978).

Todos os testes mencionados, junto com muitos outros que se seguiram, alcançaram um alto nível de sucesso, estabelecendo inequivocamente o PZQ ((RS)-2-(ciclo-hexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazin-[2,1-a]-isoquinolina-4-ona) como o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose (SUN; BU, 2012). Em todos os ensaios realizados com PZQ contra trematódeos e cestóides, apresentam dois eventos notáveis após a exposição:

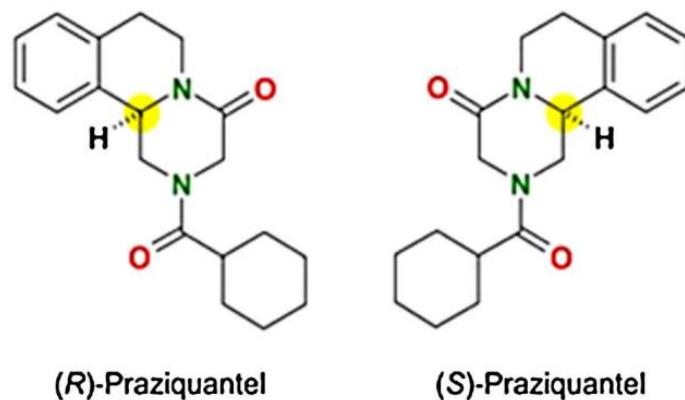
- Contração muscular quase instantânea, detectável em apenas 11 segundos;
- Dano tegumentar rápido, evidenciado por bolhas na superfície em apenas 15 minutos.

Segundo Andrews (1985) e Harder (2020), ambos os fenômenos só podem ocorrer na presença de íons Ca^{2+} . O dano tegumentar é mediado pela indução de fases HII em membranas fosfolipídicas com alta porção de ácido fosfolipídios pela presença simultânea de PZQ e íons Ca^{2+} . Ainda não se conhece o completo mecanismo de ação de PZQ, no entanto sabe-se que PZQ causa influxo de Ca^{2+} através da desregulação da Na^+/K^+ -ATPase causando intensa contração muscular, paralisia espástica, encurtamento intenso e perda de adesão das ventosas, mecanismos responsáveis pela eliminação de *S. mansoni* (You et al. 2013).

Atualmente, o PZQ é comercializado na sua forma racêmica, ou seja, apresenta misturas iguais (1:1) de dois enantiômeros de uma molécula quiral (figura 4). O enantiômero (R) é o eutômero, apresentando atividade anti-helmíntica, enquanto o enantiômero (S) é inefetivo, porém, associado a efeitos colaterais é o principal responsável pelo sabor extremamente amargo

deste fármaco. Devido a essas características, visando melhorar suas aplicações, alguns autores sugerem estudos em espectroscopia e outros estudos com foco em outras propriedades físico-químicas, (Cioli et al., 2014; Cugovcan et al., 2017). O praziquantel está disponível no mercado em dosagens de 150, 500 e 600 mg, onde a posologia é realizada de acordo com o peso corporal do paciente (Ribeiro da Silva et al., 2017).

Figura 4: Estrutura química do praziquantel.



Fonte: Siqueira et al., 2017.

PZQ é utilizado a décadas no controle e tratamento das esquistossomoses, apresentando elevada taxa de cura parasitológica, estabilidade química, baixo custo, leves efeitos colaterais, administração por via oral e extenso uso clínico, vantagens que contribuiram para a redução da morbidade e mortalidade de milhões de infectados em todo o mundo. Essas vantagens, em parte, contribuiram para a redução ou mesmo ausência de investimento financeiro na busca por novas alternativas farmacológicas no tratamento da esquistossomose; além da redução do desenvolvimento de novas tecnológicas e inovação, bem como na qualificação e formação de recursos humanos.

No cenário das esquistossomose, PZQ representa importante destaque, uma vez que é a única droga disponível. Segundo a Organização Mundial (OMS) de Saúde, em 2021 cerca de 251 milhões de pessoas necessitaram de tratamento para esquistossomose, hoje esse número ultrapassa 264 milhões (WHO, 2024); dois quais 20 milhões evoluem para forma crônica, 400 mil resultam em óbito todos os anos e ainda coloca em risco iminente de infecção 800 milhões de pessoas (WHO, 2023; WHO, 2024). O aumento da prevalência, incidência e mortalidade por esquistossomose, em parte, atribuído à disponibilidade de PZQ. Em 2021, apenas 30% das pessoas que necessitavam tiveram acesso ao PZQ, uma redução de 38% das doses em relação

a 2019, em parte em decorrência da pandemia da COVID-19 que suspendeu campanhas em áreas endêmicas; mas também é um reflexo da falta de incentivo da indústria farmacêutica e da execução de políticas públicas em saúde que garantem acesso ao tratamento (Kokaliaris et al., 2022; WHO, 2023). Esse cenário contribui para o surgimento de cepas de *Schistosoma* spp. resistentes e/ou tolerantes ao PZQ, e um possível colapso no tratamento da infecção.

As recomendações da OMS, no que diz respeito a administração do medicamento, é de 40-60 mg/kg de PZQ por peso corporal, onde as menores doses são recomendadas para o tratamento da *S. mansoni* e *S. haematobium*, enquanto doses mais elevadas (geralmente dividida em duas administrações com algumas horas de intervalo) são recomendadas para esquistossomos endêmicos de regiões asiáticas (*S. japonicum* e *Schistosoma mekongi*) (WHO, 2023).

Com relação a toxicidade, em testes com animais, PZQ apresentou baixa toxicidade, tanto para experimentos agudos como para os de longo prazo, sendo considerado tolerável e eficaz em paciente de todas as idades que apresentem as diferentes formas clínicas da esquistossomose, mesmo em casos hepatoesplênicos avançados (Bassily et al. 1985; Froberg 1984).

Por apresentar solubilidade aquosa limitada de 0,4 mg.mL⁻¹, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, PZQ é classificado como fármaco de classe II, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade, de modo que a taxa de dissolução é o fator limitante de sua absorção (Lindenberg; Kopp; Dressman, 2004). Apesar de ser hidrofóbico, é absorvido através do trato gastrointestinal, em apenas 1 hora após a ingestão. Contudo, sofre depuração hepática de primeira passagem tendo 80% da droga metabolizada pelo fígado em metabólitos inativos e excretados na urina. Assim, são necessárias altas doses por via oral, para que possa superar o extenso metabolismo em sua passagem hepática e consequentemente, alcançar concentrações adequadas nos tecidos alvo (Borrego-Sánchez et al., 2016; Cugovcan et al., 2017; Ribeiro Da Silva et al., 2017). PZQ pode ser excretado pelo leite materno, mas em pouca quantidade, mas não causa efeitos adversos à criança. No entanto, é recomendado não amamentar no dia do tratamento e nas primeiras 72 h após tratamento. Vale ressaltar que PZQ é eficaz contra vermes adultos de *Schistosoma* spp. (MCMANUS et al., 2018).

Apesar do PZQ apresentar elevada taxa de cura parasitológica, conforme já descrito apresenta entraves em suas propriedades físico-químicas, incluindo sua baixa solubilidade em meio aquoso. Assim, PZQ tem sido explorado em tecnologias farmacêuticas na busca novas alternativas para obtenção de formulações que aumentem sua solubilidade, e consequentemente, aumente sua biodisponibilidade e redução de doses para alcançar cura

parasitológica, além de contribuir para a redução do desenvolvimento de cepas resistentes e/ou tolerantes ao PZQ. Trabalhos recentes sugerem o uso das macromoléculas de lignina como excipiente na produção e liberação de fármacos. Pishnamazi e colaboradores (2019) avaliaram comprimidos à base de lignina contendo ácido acetilsalicílico e relataram valores de dureza que variaram de 3,9 kgf/cm² a 7,9 kgf/cm². Em trabalho similar, Gil-Chávez e colaboradores (2021) investigaram comprimidos à base de lignina Aquasolv contendo ibuprofeno e observaram variações na espessura, diâmetro, massa e tempo de desintegração do comprimido. Cruz Filho e colaboradores (2023) avaliaram comprimidos à base de lignina alcalina contendo benznidazol e encontraram diferenças na dureza e nos tempos de desintegração do comprimido. Esses resultados sugerem que ligninas podem contribuir para o melhoramento de biodisponibilidade, solubilidade e entrega de fármacos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Isolar e caracterizar lignina alcalina de *Clarisia racemosa*, sua avaliação toxicológica e esquistosomicida *in vitro* e utilização como excipiente no desenvolvimento de formulações contendo praziquantel.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar a físico-química e fitoquímica da lignina alcalina de *C. racemosa*;
- Mensurar a atividade antioxidante da lignina alcalina de *C. racemosa*;
- Avaliar a citotoxicidade sobre células de mamíferos da lignina alcalina de *C. racemosa*;
- Avaliar a atividade hemolítica da lignina alcalina de *C. racemosa*;
- Avaliar a atividade imunomoduladora da lignina alcalina de *C. racemosa*;
- Avaliar a atividade esquistosomicida *in vitro* da lignina alcalina de *C. racemosa* contra e casais de vermes adultos de *S. mansoni*;
- Desenvolver formulações utilizando lignina alcalina de *Clarisia racemosa* como excipiente ao Praziquantel e avaliar parâmetros de qualidade.

4. METODOLOGIA

4.1. Planta: *Clarisia racemosa*

A matéria-prima vegetal utilizada foi obtida da Mil Madeiras Preciosas, uma divisão do grupo suíço Precious Woods. O site pode ser acessado em <http://preciouswoods.com.br/>. A coleta ocorreu em uma região localizada no município de Itacoatiara, Manaus, Amazonas, Brasil (Figura X A e B). As coordenadas geográficas específicas do local de coleta são 03°08'31"N de latitude e 58°26'33"W de longitude. A madeira de *Clarisia racemosa* (figura 4 C e D) foi devidamente registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sobre registro AAF588D.

A madeira em forma de serragem do resíduo industrial (Figura 4 E) foi submetida a um processo de secagem em uma estufa Tecnal (modelo TE-393/1) a 105 °C até atingir peso constante, o que levou 72 h. Em seguida, o material foi triturado utilizando um moinho de lâminas (FRITSCH – Pulverisette 14) e peneirado até alcançar um tamanho de grão de 0,150 mm. Foi realizada previamente a análise da composição físico-química da madeira, incluindo celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas, no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco e publicada por Nerys et al. (2022).

Figura 5: Obtenção do cerne de *Clarisia racemosa*.

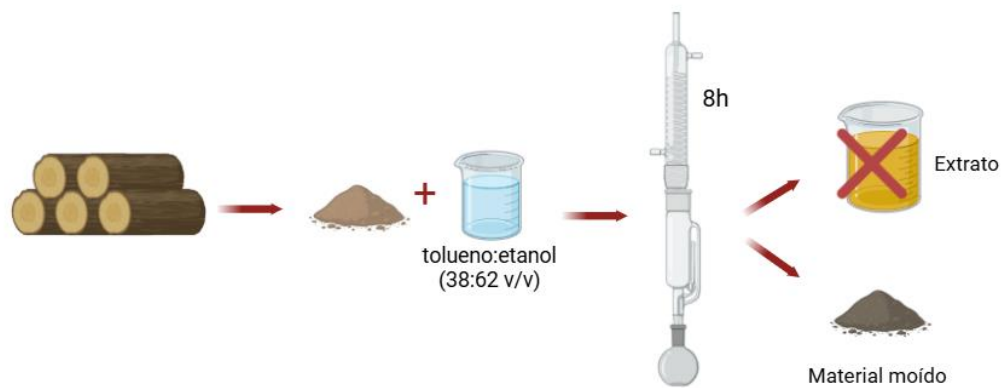


Fonte: Compilação do autor.

4.2. Obtenção da Lignina

A madeira livre de extrativos (obtida por extração em aparelho Soxhlet utilizando um sistema tolueno:etanol (38:62 v/v) como solvente por 8 h) passou por três etapas de fracionamento para isolar a lignina. Os procedimentos foram realizados seguindo a metodologia descrita por Cruz Filho et al. (2023).

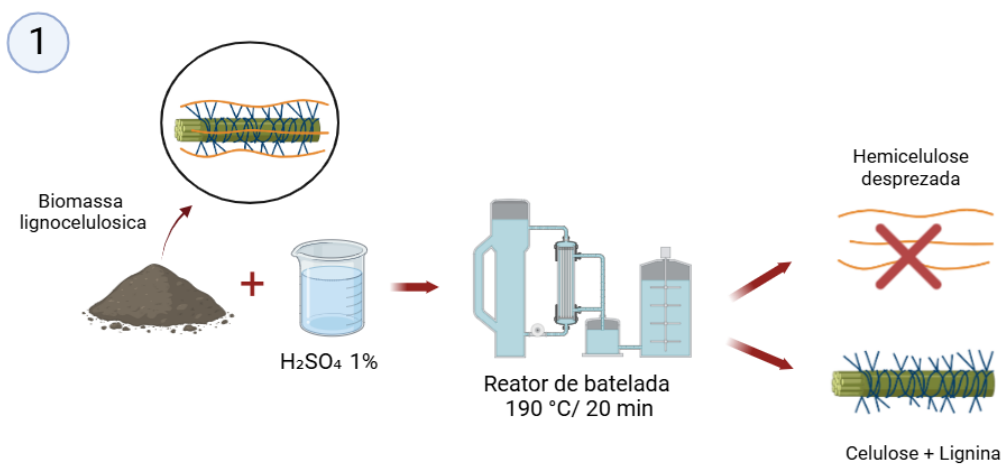
Figura 6: Processamento do material vegetal para obtenção do material lignocelulósico



Fonte: Autoria própria

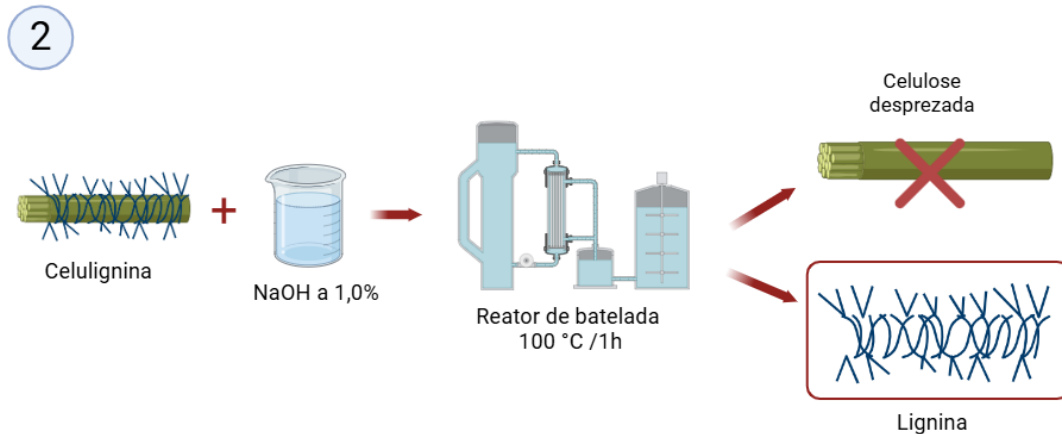
O primeiro estágio envolveu o tratamento do material moído com uma solução de H_2SO_4 a 1% (H_2SO_4 : água, v/v) a $190\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. A proporção sólido-líquido foi de 1:10 (p/v). Esta etapa (Etapa 1) (Figura 7) teve como objetivo a remoção da hemicelulose. O material sólido resultante, denominado celulignina, foi seco a $105\text{ }^\circ\text{C}$ e então submetido a um processo de deslignificação alcalina em uma solução de NaOH a 1,0% (NaOH:água, p/v).

Figura 7: Processamento do material moído e obtenção de celulignina (Etapa 1).



Fonte: Autoria própria

Figura 8: Processamento da celulignina para obtenção de lignina (Etapa 2).



Fonte: Autoria própria

Esta segunda etapa (Etapa 2) (Figura 8) foi realizada a 100 °C por 1 h, também usando uma razão sólido-líquido de 1:10 (p/v). Ambas as etapas foram conduzidas em um reator de batelada com um volume de trabalho de 10 L (REGMED AU/E-20). O material sólido foi filtrado e seco a 105 °C após cada etapa. O rendimento da extração foi determinado e calculado usando a Equação 1.

$$Y(\%) = \left(\frac{\text{Massa final (g)}}{\text{Massa inicial I(g)}} \right) * 100\% \quad (1)$$

A fração líquida, contendo lignina (extraída usando 1,0% NaOH p/v na Etapa 2), foi acidificada com H₂SO₄ para precipitar a lignina. O sistema foi deixado em repouso por 12 h (Etapa 3). Após esse período, a lignina precipitada foi filtrada e seca a 70 °C. O rendimento foi calculado usando a Equação 2.

$$Y(\%) = \left(\frac{\text{Massa da lignina extraída}}{\text{Massa total de lignina nas folhas}} \right) * 100\% \quad (2)$$

Essas etapas iniciais foram projetadas para obter uma lignina mais pura, livre de carboidratos e outras biomoléculas em sua estrutura.

4.3. Análise da composição química dos sólidos obtidos durante a etapa de tratamento ácido e base.

A análise da composição dos sólidos obtidos nas Etapas 1 e 2 foi conduzida seguindo o protocolo descrito por Nerys et al. (2022). A determinação de polissacarídeos foi realizada após

hidrólise ácida, onde 2 g de material sólido foram tratados com 72% (v/v) de H₂SO₄ a 45 °C por 7 min. Uma porção da amostra hidrolisada foi então filtrada através de uma membrana de 0,22 µm, e as concentrações de carboidratos e ácidos orgânicos foram quantificadas usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A identificação e quantificação de carboidratos foram conduzidas usando um cromatógrafo líquido de alta performance (Agilent, série 1100) equipado com uma coluna Aminex HPX87H (Bio-Rad). A análise foi realizada a 60 °C, com uma fase móvel de 5 mM H₂SO₄, uma vazão de 0,6 mL/min e detecção por índice de refração (RI). Para a identificação e quantificação de ácidos orgânicos, o mesmo modelo de cromatógrafo líquido (Agilent, série 1100) foi usado, mas com uma coluna reversa C-18 (Agilent Technologies). A fase móvel consistiu em uma solução de acetonitrila-água 1:8 com 1% de ácido acético, e a detecção foi realizada por UV/Vis a 274 nm e uma temperatura de 25 °C. Ambos os métodos utilizaram um volume de injeção de amostra de 5 µL.

O resíduo sólido retido no papel de filtro foi identificado como o componente de lignina insolúvel. O teor total de cinzas foi determinado pela ignição de 2 g de sólidos a 800 °C por 2 h, com o material restante representando o teor de cinzas.

4.4. Caracterização física e química da lignina da madeira de *Clarisia racemosa*

A composição molecular da lignina foi analisada usando procedimentos químicos e físicos para fornecer informações sobre sua estrutura, seguindo metodologias previamente estabelecidas por Silva et al. (2021), Araújo et al. (2022) e Cruz Filho et al. (2023). A composição elementar de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O) em uma amostra de 10 mg de lignina foi determinada usando um analisador elementar PerkinElmer 2400 Series II. Os grupos funcionais na lignina foram identificados por meio de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) com uma amostra de 10 mg, enquanto suas características fenólicas foram avaliadas usando um espectrofotômetro UV/Vis (Perkin Elmer, Lambda 650). A lignina foi dissolvida em uma solução de NaOH a 1% (NaOH: água, p/v) em concentrações variando de 0,01 - 1,0 g/L a 30 °C. As medições de absorvância foram registradas a 280 nm para determinar a absorvância, e uma varredura espectral de 250 – 600 nm foi conduzida em uma solução de 0,02 g/L.

A estrutura de carbono e o arranjo de hidrogênio foram analisados usando técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN). Para análise de RMN 31P, aproximadamente 50 mg de lignina foram dissolvidos em uma solução de piridina deuterada e clorofórmio (1,6:1, v/v). A essa mistura, 62,5 µL de uma solução contendo 11,4 mg/mL de acetilacetato de cromo (III)

e 125 μ L de uma solução 0,12 M de endo-N-hidroxi 5-norborneno-2,3 dicarboximida foram adicionados como padrões internos, seguidos pela adição de 125 μ L de 2-cloro-4,4,5,5 tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano. Para RMN 2D (HSQC), a lignina foi acetilada em uma mistura de piridina e anidrido acético (2:1, v/v) por 8 h a 50 °C. O pH foi então ajustado para 3,0 usando 3,0 M de HCl, e a solução foi agitada por mais 12 h a 30 °C. Após evaporação sob pressão reduzida e lavagem com etanol, tolueno e clorofórmio, 20 mg de lignina foram dissolvidos em DMSO deuterado (1,0 mL) e analisados usando um espectrômetro de RMN Varian Unity Plus de 300 MHz.

As unidades guaiacil (G), siringil (S) e p-hidroxifenil (H) da lignina foram analisadas usando um analisador de pirólise rápida conectado a um sistema GC/MS (Agilent Technologies 7890A/5975C). Uma amostra de lignina de 10 mg foi pirolisada a 550 °C com uma taxa de aquecimento de 20 °C/seg. Os componentes foram identificados usando um sistema Shimadzu GC/MS (modelo QP2010) equipado com uma coluna capilar DB-35MS (5 m de comprimento, 0,20 mm de diâmetro, 0,33 μ m de espessura). A vazão de hélio foi ajustada em 1 mL/min, a temperatura do injetor em 300 °C, e a temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 40 °C por 3 min, aumentada para 200 °C a 4 °C/min e mantida por 1 min, seguida por um aumento para 280 °C a 20 °C/min e mantida por 1 min. Os espectros de massa foram gerados usando ionização de elétrons (EI) em um nível de energia de 70 eV, e a faixa de massa para carga (m/z) registrada foi de 50 – 650.

A massa molecular da lignina foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC) usando instrumentação JASCO. O sistema incluiu uma interface LC NetII/ADC, um detector de índice de refração RI-2031 Plus e duas colunas Polar Gel-M (Phenogel 5 μ m 50Å e 1000Å, 4,6 mm \times 300 mm, Phenomenex). Dimetilformamida com 0,1% de brometo de lítio foi usada como eluente a uma vazão de 0,7 mL/min e uma temperatura de 40 °C. A calibração foi realizada usando padrões de poliestireno (Sigma-Aldrich) variando de 266 a 70.000 g/mol. A resistência térmica foi avaliada usando análise termogravimétrica (TGA/DTG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) em um aparelho PerkinElmer STA 6000. Aproximadamente 20 mg de lignina foram analisados em uma cápsula de alumina aberta sob um fluxo de gás nitrogênio de 20 mL/min, com medições de temperatura registradas entre 35 °C e 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

O conteúdo fenólico total da lignina foi quantificado usando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A lignina foi dissolvida em 1% de DMSO (DMSO: água, v/v) a uma concentração de 1000 μ g/mL. Uma porção de 2,5 mL desta solução foi misturada com 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:10, v/v) e incubada por 5 min, seguido pela adição

de 2 mL de carbonato de sódio a 7,5%. Após uma incubação de 2 h a 25 °C, a absorbância a 760 nm foi medida. A quantificação foi realizada usando uma curva de calibração preparada com ácido gálico, e os resultados foram expressos como miligramas de ácido gálico equivalente por grama de lignina (GAE). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.5. Atividade Antioxidante in vitro

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados para avaliar ligninas alcalinas, seguindo metodologias descritas por Silva et al. (2021), Araújo et al. (2022), Cruz Filho et al. (2023) e Silva et al. (2023). A lignina foi dissolvida em 1% de DMSO (DMSO:água, v/v) em concentrações variando de 1,0 a 1000 µg/mL. Os ensaios incluíram testes de eliminação de radicais e redução iônica. A atividade de eliminação de radicais foi avaliada usando vários métodos. No ensaio DPPH, 0,5 mL de solução de lignina foi misturado com 2,5 mL de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e incubado por 45 min a 30 °C. A absorbância da mistura foi medida a 517 nm, com etanol servindo como branco. Para o ensaio ABTS, 0,5 mL de solução de lignina foi combinado com 2,5 mL de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e incubado por 5 min a 30 °C. A absorbância foi medida a 734 nm, novamente usando etanol como branco. No ensaio de radical de óxido nítrico (NO), 0,5 mL de nitroprussiato de sódio (20 mM SNP) foi misturado com 0,5 mL de solução de lignina e incubado por 60 min. Depois, 0,5 mL de uma solução de ácido fosfórico a 2% e 0,5 mL do reagente de Griess foram adicionados, seguidos por uma incubação de 10 min, e a absorbância foi medida a 562 nm.

O ensaio de radical hidroxila (OH·) envolveu a preparação de uma mistura contendo FeSO₄·7H₂O (1,5 mM), H₂O₂ (6 mM) e salicilato de sódio (20 mM). A mistura foi incubada a 37 °C por 1 h, e a absorbância foi medida a 515 nm, com água servindo como branco. Testes de redução de íons também foram conduzidos. O método de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) envolveu a combinação de 0,5 mL de solução de lignina, 0,1 mL de água destilada e 2,6 mL de reagente FRAP. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min, e a absorbância foi medida a 595 nm, usando o reagente FRAP como branco. Para o método do ferricianeto de ferro, uma mistura de 2,5 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6), 2,5 mL de ferricianeto de potássio e 2,5 mL de ácido tricloroacético foi preparada e centrifugada a 3000 rpm por 30 min. Então, 2,5 mL do sobrenadante foram misturados com 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico, e a absorbância foi medida a 700 nm.

O teste de redução do complexo de fosfomolibdênio usou uma solução reagente contendo 28 mM de fosfato de sódio, 4,0 mM de molibdato de amônio e 0,6 M de ácido sulfúrico. Uma alíquota de 3,0 mL deste reagente foi misturada com 0,3 µL de solução de

lignina e incubada a 95 °C por 90 min. O método de redução de íons de cobre (CUPRAC) envolveu misturar 0,5 mL de solução de lignina com 0,5 mL de 0,01 M de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mL de 0,0075 M de neocuproína etanólica e 0,5 mL de tampão de acetato de amônio 1 M (pH 7). A mistura foi incubada a 30 °C por 30 min, e a absorbância foi medida a 450 nm, com um branco contendo apenas os reagentes e água.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, e as medições de absorbância foram feitas usando um espectrofotômetro UV/VIS (Hewlett-Packard, modelo 8453). Ácido ascórbico e hidroxitolueno butilado (BHT) foram usados como padrões para calcular o CI_{50} , representando a concentração na qual 50% dos radicais ou íons redutores foram capturados.

4.6. Citotoxicidade em células de mamíferos

A viabilidade celular após exposição à lignina foi avaliada usando o ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo). Os procedimentos foram conduzidos seguindo metodologias delineadas por Silva et al. (2021), Araújo et al. (2022), Cruz Filho et al. (2023) e Silva et al. (2023). A lignina foi previamente dissolvida em DMSO a 1% (DMSO: água, v/v) em concentrações variando de 3,9 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Macrófagos J774.A1, fibroblastos V79, Células Vero e HepG2 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células por poço e expostas a concentrações variáveis de lignina por 48 h sob condições controladas (37 °C, 95% de umidade e 5% de CO_2). Os poços de controle continham apenas células cultivadas sem tratamento com lignina.

Após o período de incubação, para aderência celular, a solução meio foi cuidadosamente removido e 100 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por mais uma hora nas mesmas condições, porém na ausência de luz. Depois disso, o sobrenadante foi removido e 100 μL de DMSO foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi medida a 550 nm usando um espectrofotômetro de microplacas Thermo Scientific.

A viabilidade celular de cada concentração foi calculada a partir das absorbâncias obtidas pela leitura da placa, usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Absorbância (células tratadas)} - (\text{Absorbância em branco})}{\text{Absorbância (controle negativo)} - (\text{Absorbância em branco})} \times 100$$

A concentração citotóxica para tornar 50% das células inviáveis (CC_{50}) foi determinada por regressão dose-resposta não linear e intervalo de confiança de 95% no software GraphPad Prism 5.0.

4.7. Animais experimentais e comitê de ética

Os camundongos foram obtidos e mantidos no Biotério do Instituto Keizo Asami (iLIKA/UFPE) em condições controladas de criação e manutenção (20 ± 2 °C e ciclo de luz de 12 horas) e livre acesso a ração Labitum/Purina (São Paulo, SP) e água. Todos os processos metodológicos foram conduzidos de acordo com os padrões éticos definidos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biociências da UFPE, sob o protocolo nº 0060/2019 CEUA/UFPE.

4.8. Atividade hemolítica

A atividade hemolítica também foi avaliada usando uma suspensão de eritrócitos de camundongo a 1%. Um total de 1,1 mL da suspensão de eritrócitos foi misturado com 0,4 mL de lignina em concentrações variadas. Os grupos de controle incluíram um meio de cultura com 1% de DMSO como controle negativo e Triton X-100 como controle positivo. Após 45 min de incubação a 30 °C, as amostras foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante foi medida a 540 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para garantir a confiabilidade.

4.9. Atividade imunomoduladora *in vitro*

Ensaio de atividade imunomoduladora *in vitro* foram conduzidos com adaptações baseadas nos protocolos descritos por Cruz Filho et al. (2019), Santos et al. (2020) e Araújo et al. (2022). A lignina foi dissolvida em uma solução de DMSO a 1% (DMSO:água, v/v) em concentrações variando de 3,9 a 1000 µg/mL. Esplenócitos foram obtidos de camundongo Balb/c e distribuídos em placas de poços (10^6 células/poço) foram expostas a essas concentrações variáveis de lignina por 24 e 48 h em uma incubadora controlada a 37 °C, com 95% de umidade e 5% de CO₂. Uma plataforma FACS Calibur foi usada para analisar as células por citometria de fluxo.

Os efeitos citotóxicos da lignina foram avaliados usando iodeto de propídio e anexina V como marcadores. A proliferação celular foi avaliada usando coloração CFSE. A dosagem de citocinas estimuladas por lignina foi mensura usando um kit de matriz de esferas citométricas de camundongo (CBA), que quantificou as interleucinas (IL) como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ . Os níveis de óxido nítrico (NO) no sobrenadante da cultura foram determinados usando o método de Griess. Uma curva analítica de nitrito de sódio (3,12– 400 µM) foi usada para quantificar NO, e a absorbância foi medida a 595 nm com um espectrofotômetro de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific®).

Parâmetros de estresse oxidativo, associados à ativação celular, também foram avaliados. Isso incluiu mensurações de espécies reativas de oxigênio (ROS) citosólicas e mitocondriais, potencial transmembrana e concentrações de Ca^{2+} citosólico. Técnicas de citometria de fluxo foram empregadas para essas análises usando corantes diidroetídio (DHE), MitoSox Red, MitoStatus e Fluo-3AM. Ensaio de imunofenotipagem foram realizados para identificar populações celulares específicas usando anticorpos direcionados a anti-CD4-FITC e anti-CD8-PE para linfócitos, anti-CD16-PE para células natural Killer e anti-CD16/32 PercyP para monócitos. Todos os experimentos foram conduzidos em quintuplicata para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

4.10. Atividade Esquistossomicida in vitro

4.10.1. Infecção por *Schistosoma mansoni*

Dezenove camundongos Swiss Webster (fêmeas, 28 ± 2 g, com 35 dias de vida), foram infectados percutaneamente com aproximadamente 120 cercárias de *Schistosoma mansoni* (cepa BH, Belo Horizonte, Brasil), utilizando o método descrito por Olivier e Stirewalt em 1952.

4.10.2. Recuperação de vermes e avaliação esquistossomicida in vitro da Lignina contra vermes Adultos de *Schistosoma mansoni*

Após 45 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os vermes foram recuperados através de perfusão do sistema porta e as veias mesentéricas com solução salina estéril (0,9% NaCl p/v), seguindo o método estabelecido por Smithers e Terry em 1965. Apenas casais de vermes intactos foram transferidos diretamente para meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20 mM HEPES, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (SBF). Os vermes foram lavados quatro vezes com este meio de cultura. Os vermes foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços, onde cada poço continha 2 mL de meio RPMI suplementado. Cada poço recebeu dois casais de vermes. As placas foram incubadas a 37 °C em ambiente úmido com 5% de CO_2 . A lignina foi diluída em DMSO a 1% (DMSO: água v/v) e adicionada ao meio de cultura para atingir concentrações finais de 500, 250 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Vermes foram distribuídos em placas e incubados em apenas em meio **RPMI 1640** suplementado (Controle 1) ou com meio RPMI suplementado e acrescido de 1% de DMSO (Controle 2). Além disto, casais de vermes foram incubados em praziquantel (PZQ) a 10 μM para formar o grupo controle positivo. Dois experimentos independentes foram realizados em quadruplicata.

4.10.3. Avaliação da Motilidade e Mortalidade de Vermes Adultos

Um microscópio invertido (Leica Microsystems, DM IL Wetzlar, Alemanha) foi utilizado para avaliar a motilidade e mortalidade dos pares de vermes. Os vermes foram monitorados inicialmente nos intervalos de 3, 6, 12 e 24 h após a incubação. Observações subsequentes foram realizadas em intervalos de 24 h por cinco dias consecutivos, ou seja, em 24, 48, 72, 96 e 120 h.

A motilidade e mortalidade foram com base nos critérios adaptado de Cruz Filho et al. (2023), utilizando uma score de viabilidade variando de 3 a 0: Score 3: Os vermes no grupo controle negativo apresentam características típicas, incluindo movimentos ativos, peristaltismo de órgãos internos e ventosas aderentes. Score 2: Os vermes apresentam movimentos corporais reduzidos, incluindo peristaltismo de órgãos internos, mas retêm ventosas ativas. Score 1: Os vermes apresentam movimento limitado nas extremidades (regiões anterior e/ou posterior) sem peristaltismo interno e têm ventosas não aderentes. Score 0: Os vermes apresentam ausência completa de movimento e integridade do tegumento, com ou sem alterações de cor. A eficácia do tratamento foi determinada quando os vermes apresentaram uma pontuação de motilidade de 0, sem movimento observável por pelo menos dois minutos. Adicionalmente, os efeitos causados pela lignina foram avaliados por meio de microscopia eletrônica de varredura.

4.11. Caracterização preliminar dos comprimidos de lignina de *Clarisia racemosa* e estudo de liberação de Praziquantel

Cruz-Filho et al. (2023) e Silva et al. (2023) conduziram um estudo sobre formulação de comprimidos usando lignina como excipiente, introduzindo alguns ajustes em seus trabalhos anteriores. O estudo envolveu dois tipos de formulações de comprimidos. A primeira formulação, denominada LIGCP, continha 1,0% de estearato de magnésio, 3,0% de croscarmelose sódica, 5,0% de praziquantel, 20% de lignina, 20% de lactose e 51% de celulose microcristalina. A segunda formulação, LIGWP, excluía a lignina e consistia em 71% de celulose microcristalina, mantendo as mesmas proporções para os outros componentes. Os comprimidos foram produzidos por compressão uma matriz de 6 mm de diâmetro a uma carga constante de 400 kg e uma velocidade de 180 mm/min. Após a preparação, parâmetros de qualidade foram avaliados. Estes incluíram o peso de 20 comprimidos, dureza, espessura e consistência do diâmetro. A uniformidade das doses unitárias foi avaliada usando o método de variação de peso. Testes de friabilidade foram realizados para avaliar a resistência mecânica, e

testes de desintegração foram conduzidos usando um aparelho de desintegração com água a 37 °C.

A cinética de dissolução também foi examinada para determinar o perfil de liberação de praziquantel dos comprimidos. Os testes foram conduzidos em tanques de dissolução contendo 0,1 mol/L de HCl mantidos a $37 \pm 0,5$ °C. Os comprimidos ($n = 12$) foram colocados nos recipientes de dissolução com agitação a 50 rpm. Alíquotas foram coletadas em intervalos de 5 min durante um período de 120 min, filtradas e analisadas usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) sob condições descritas por Eason et al. (2022).

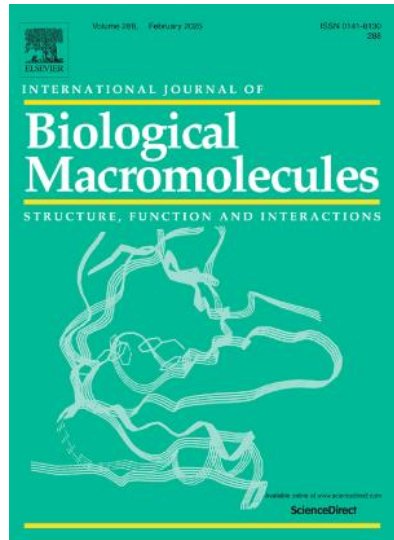
4.12. Análise estatística

Os dados foram analisados usando análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Para avaliar a relação entre a concentração de lignina e a atividade antioxidante, foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Nos casos em que os dados não apresentavam distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's para comparações múltiplas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram conduzidas usando o software GraphPad Prism 5, com um nível de significância definido em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

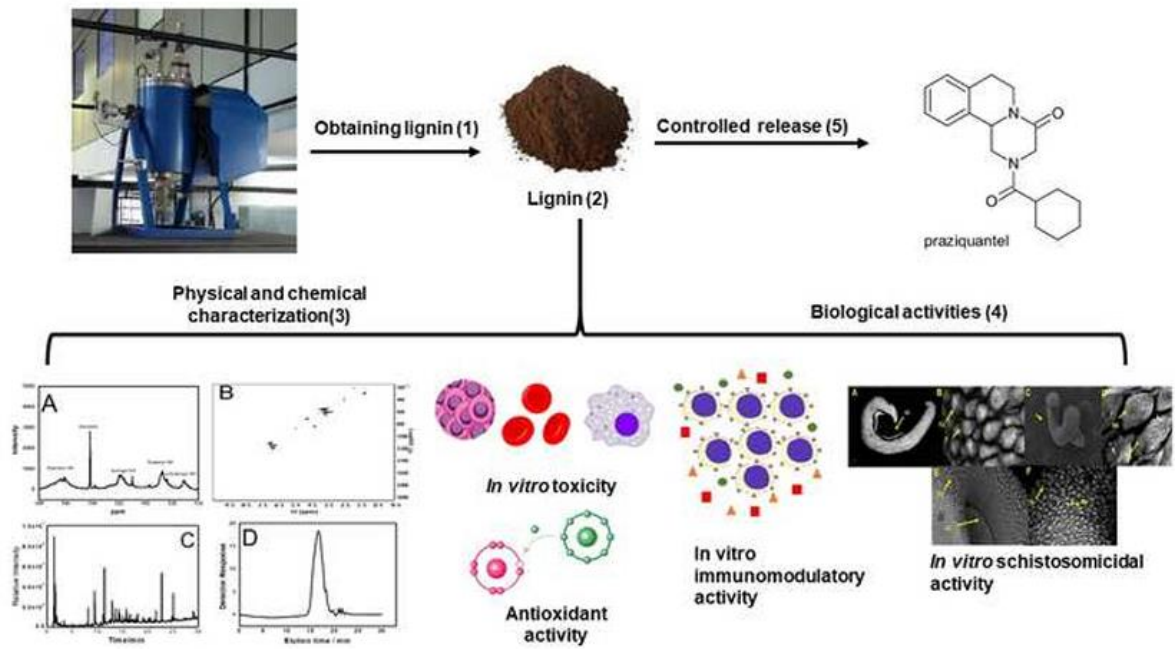
Os resultados e discussão serão apresentado em forma de artigo que foi submetido ao International Journal of Biological Macromolecules

Impact Factor: 7.7



ARTIGO
GRAPHICAL ABSTRACT

Alkaline lignin from *Clarisia racemosa* wood: antioxidant, immunomodulatory, and schistosomicidal activities, and its use as an excipient in praziquantel release.



1 Abstract

2 Lignins are versatile macromolecules with a wide range of applications across
3 various industrial sectors. In this groundbreaking study, alkaline lignin was successfully
4 isolated and characterized from the wood of *Clarisia racemosa*, a tree of significant
5 economic value in the Amazon timber industry. Lignin extraction was performed through
6 acid extraction followed by delignification. Characterization of the isolated lignin revealed its
7 GSH-type structure, along with thermal stability and low molecular weight. Subsequent
8 investigations focused on the lignin's biological properties. *In vitro* assays demonstrated its
9 potent antioxidant activity, effectively scavenging free radicals. Lignin also exhibited low
10 toxicity and notable immunomodulatory properties, promoting the proliferation and
11 activation of immune cells. Furthermore, its *in vitro* schistosomicidal activity against
12 *Schistosoma mansoni* was confirmed, with scanning electron microscopy revealing significant
13 effects on the parasite. Finally, the study verified that lignin from *Clarisia racemosa* is a
14 promising excipient for the controlled release of praziquantel, highlighting its potential in
15 the formulation of ecologically and economically sustainable tablets. This research contributes
16 to the innovative utilization of lignin in the development of environmentally friendly and cost-
17 effective pharmaceutical products.

18
19 **Keywords:** lignin, biomaterial, *Schistosoma mansoni*

20 21 1. Introduction

22 Lignin is an amorphous and complex macromolecule found in lignocellulosic
23 biomass. Structurally, lignins are composed of three monolignols: p-coumaryl alcohol,
24 coniferyl alcohol, and sinapyl alcohol. These monolignols give rise to three primary units,
25 known as syringyl (S), guaiacyl (G), and p-hydroxyphenyl (H) groups (Ariyanta et al., 2023;
26 Lu and Gu, 2023). These units are interconnected by carbon-oxygen (ether) bonds— β -
27 O-4, α -O-4, and 4-O-5—and carbon-carbon bonds— β -5, β - β , β -1, and 5-5 (Ariyanta et
28 al., 2023; Lu and Gu, 2023). The presence of polar groups in the lignin structure establishes
29 strong intramolecular and intermolecular hydrogen bonds along its chain (Ariyanta et al.,

2023; Lu and Gu, 2023). Furthermore, lignin is considered the largest natural source of phenolics.

Lignins are routinely obtained by the pulp and paper industries during the pulping process and constitute a significant component of black liquor. More than 1.3 billion tons of black liquor are generated annually, primarily used for energy production (Pola et al., 2022). However, various studies have highlighted promising applications for lignins. Their phenolic structure imparts diverse biological activities, including antioxidant, immunomodulatory, antiparasitic, antimicrobial, and antitumor properties. Moreover, lignins exhibit low toxicity (Araújo et al., 2022; Cruz Filho et al., 2023). In biomedical and pharmaceutical applications, lignins serve as raw materials for high-value products such as films, membranes, hydrogels, nanotubes, nanoparticles, sun protection lotions, and excipients for tablets (Dominguez-Robles et al., 2020; Ullah et al., 2022).

The use of lignin as a biomaterial represents a sustainable approach to utilizing this abundant macromolecule. Lignins are biodegradable, biocompatible, and exhibit excellent adhesive properties (Dominguez-Robles et al., 2020). These characteristics have spurred scientific interest in their use in drug delivery systems and as pharmaceutical excipients (Mukheja et al., 2023). The literature contains numerous studies on lignin's use as an excipient in tablet formulations. Notable examples include tablets containing acetylsalicylic acid (Pishnamazi et al., 2019), ibuprofen (Gil-Chávez et al., 2021), benznidazole (Cruz Filho et al., 2023), and oxacillin and fluconazole (Silva et al., 2023). The lignins evaluated in these studies demonstrated improved drug release rates compared to formulations using only polysaccharides.

Despite these promising applications, extracting lignin remains a challenge due to the complexity of the process and lignin's poor solubility in solvents (Mukheja et al., 2023). Furthermore, the diverse sources and extraction processes result in

55 different types of lignins. Consequently, continued research is necessary to explore various
56 lignin types and their potential applications (Dominguez-Robles et al., 2020; Ullah et al.,
57 2022). The Amazon Forest has emerged as an attractive region for discovering new lignin
58 sources. Among the tree species in this region, *Clarisia racemosa* stands out. This tree
59 is significant in the timber industry, serving as a raw material for furniture, musical
60 instruments, boats, and other products. Additionally, its extracts have demonstrated
61 pharmaceutical potential (Nerys et al., 2022), making *Clarisia racemosa* a promising source
62 of lignin.

63 This study focuses on isolating and characterizing alkaline lignin from
64 *Clarisia racemosa*, evaluating its biological activities, and using it as an excipient in
65 the production of tablets containing praziquantel, a drug for treating schistosomiasis.
66 Schistosomiasis, caused by *Schistosoma mansoni*, is a neglected tropical disease affecting
67 nearly 240 million people worldwide (Vásconez-González et al., 2023). This work
68 contributes to the pharmaceutical industry by demonstrating the potential of lignin in
69 manufacturing sustainable tablets for treating schistosomiasis.

70 **2. Materials and Methods**

71 2.1. Plant: *Clarisia racemosa*

72 The raw material used in this research was sourced from Mil Madeiras Preciosas, a division
73 of the Swiss group Precious Woods. More information about the organization can be found on
74 their website: <http://preciouswoods.com.br/>. The material collection was conducted in a region
75 located within the municipality of Itacoatiara, Manaus, Amazonas, Brazil. The specific
76 geographic coordinates of the collection site are 03°08'31"S latitude and 58°26'33"W longitude.
77 The wood sample used in this study was officially registered in SisGen (National System of
78 Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge) under the designation AAF588D.

79 The wood underwent a drying process using a Tecnal oven (model TE-393/1) at 105 °C
80 until it reached a constant weight, which required 72 h. Following this, the material was
81 ground using a blade mill (FRITSCH – Pulverisette 14) and sieved to obtain a grain size of
82 0.150 mm. A detailed chemical composition analysis of the wood, including its cellulose,
83 hemicellulose, lignin, extractives, and ash content, was conducted at the Laboratory of
84 Chemistry and Therapeutic Innovation at the Federal University of Pernambuco, Brazil. The
85 results of this analysis were subsequently published by Nerys et al. (2022).

86

87 **2.2. Obtaining Lignin**

88 The extractive-free wood (obtained by extraction in a Soxhlet apparatus using
89 a toluene:ethanol (38:62 v/v) system as the solvent for 8 h) underwent three fractionation stages
90 to isolate lignin. The procedures were performed following the methodology described by
91 Cruz Filho et al. (2023).

92 The first stage involved treating the ground material with a 1% H₂SO₄
93 solution (H₂SO₄: water, v/v) at 190 °C for 20 min. The solid-to-liquid ratio was 1:10 (w/v).
94 This step (Step 1) targeted the removal of hemicellulose. The resulting solid material, referred
95 to as cellulignin, was dried at 105 °C and then subjected to an alkaline delignification process
96 in a 1.0% NaOH solution (NaOH:water, w/v).

97 This second step (Step 2) was carried out at 100 °C for 1 h, also using a solid-to-liquid
98 ratio of 1:10 (w/v). Both steps were conducted in a batch reactor with a working volume of 10
99 L (REGMED AU/E-20). The solid material was filtered and dried at 105 °C after each step. The
100 extraction yield was determined and calculated using Equation 1.

101

$$Y(\%) = \left(\frac{\text{Mass final (g)}}{\text{Massa inicial I(g)}} \right) * 100\% \quad (1)$$

102

103 The liquid fraction, containing lignin (extracted using 1.0% NaOH w/v in Step 2), was
104 acidified with H₂SO₄ to precipitate the lignin. The system was left undisturbed for 12 hours (Step
105 3). After this period, the precipitated lignin was filtered and dried at 70 °C. The yield was
106 calculated using Equation 2.

107

$$Y(\%) = \left(\frac{\text{Massa da lignina extraída}}{\text{Massa total de lignina nas folhas}} \right) * 100\% \quad (2)$$

108 These initial steps were designed to obtain a purer lignin, free from
109 carbohydrates and other biomolecules within its structure.

110 **2.3. Analysis of the chemical composition of solids obtained during the acid and base** 111 **treatment stage**

112 The composition analysis of the solids obtained in Steps 1 and 2 was conducted
113 following the protocol described by Nerys et al. (2022). Polysaccharide determination was
114 performed after acid hydrolysis, where 2 g of solid material was treated with 72% (v/v) H₂SO₄
115 at 45 °C for 7 min. A portion of the hydrolyzed sample was then filtered through a 0.22- μ m
116 membrane, and the concentrations of carbohydrates and organic acids were quantified using
117 high-performance liquid chromatography (HPLC).

118 Carbohydrate identification and quantification were conducted using a high-
119 performance liquid chromatograph (Agilent, 1100 series) equipped with an Aminex
120 HPX87H column (Bio-Rad). The analysis was carried out at 60 °C, with a mobile phase of 5
121 mM H₂SO₄, a flow rate of 0.6 mL/min, and detection by refractive index (RI). For the
122 identification and quantification of organic acids, the same liquid chromatograph model
123 (Agilent, 1100 series) was used, but with a C-18 reverse column (Agilent Technologies).
124 The mobile phase consisted of a 1:8 acetonitrile-water solution with 1% acetic acid, and

125 detection was performed by UV/Vis at 274 nm and a temperature of 25°C. Both methods
126 utilized a sample injection volume of 5 µL.

127 The solid residue retained on the filter paper was identified as the insoluble lignin
128 component. The total ash content was determined by igniting 2 g of solids at 800 °C for 2 h,
129 with the remaining material representing the ash content.

130

131 **2.4. Physical and chemical characterization of lignin from *Clarisia racemosa* wood**

132 The molecular composition of lignin was analyzed using a series of chemical and
133 physical procedures to provide detailed insights into its structure, following
134 methodologies previously established by Silva et al. (2021), Araújo et al. (2022), and Cruz Filho
135 et al. (2023). The elemental composition of carbon (C), hydrogen (H), and oxygen (O) in a 10
136 mg lignin sample was determined using a PerkinElmer 2400 Series II elemental analyzer.
137 Functional groups in lignin were identified through Fourier Transform Infrared
138 Spectroscopy (FTIR) with a 10 mg sample, while its phenolic characteristics were assessed
139 using a UV/Vis spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 650). Lignin was dissolved in a 1%
140 NaOH solution (NaOH: water, w/v) at concentrations ranging from 0.01–1.0 g/L at 30 °C.
141 Absorbance measurements were recorded at 280 nm to determine absorptivity, and a spectral
142 scan from 250–600 nm was conducted on a 0.02 g/L solution.

143 The carbon framework and hydrogen arrangement were analyzed using nuclear
144 magnetic resonance (NMR) techniques. For ³¹P NMR analysis, approximately 50 mg of lignin
145 was dissolved in a solution of deuterated pyridine and chloroform (1.6:1, v/v). To this mixture,
146 62.5 µL of a solution containing 11.4 mg/mL chromium (III) acetylacetonate and 125 µL of a
147 0.12 M solution of endo-N-hydroxy 5-norbornene-2,3 dicarboximide were added as internal
148 standards, followed by the addition of 125 µL of 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-
149 dioxaphospholane. For 2D NMR (HSQC), lignin was acetylated in a mixture of pyridine and

150 acetic anhydride (2:1, v/v) for 8 h at 50 °C. The pH was then adjusted to 3.0 using 3.0 M
151 HCl, and the solution was stirred for another 12 h at 30 °C. After evaporation under reduced
152 pressure and washing with ethanol, toluene, and chloroform, 20 mg of lignin was dissolved
153 in deuterated DMSO (1.0 mL) and analyzed using a Varian Unity Plus 300 MHz NMR
154 spectrometer.

155 The guaiacyl (G), syringyl (S), and p-hydroxyphenyl (H) units of lignin were
156 analyzed using a rapid pyrolysis analyzer connected to a GC/MS system (Agilent
157 Technologies 7890A/5975C). A 10 mg lignin sample was pyrolyzed at 550 °C with a heating
158 rate of 20 °C/sec. The components were identified using a Shimadzu GC/MS system (model
159 QP2010) equipped with a DB-35MS capillary column (5 m length, 0.20 mm diameter, 0.33
160 μm thickness). The helium flow rate was set at 1 mL/min, the injector temperature at 300 °C,
161 and the oven temperature was programmed as follows: 40 °C for 3 min, increased to 200 °C
162 at 4 °C/min and held for 1 min, followed by an increase to 280 °C at 20 °C/min and held for
163 1 min. Mass spectra were generated using electron ionization (EI) at an energy level of 70 eV,
164 and the mass-to-charge (m/z) range recorded was 50–650.

165 The molecular mass of lignin was determined through gel
166 permeation chromatography (GPC) using JASCO instrumentation. The system included an
167 LC-NetII/ADC interface, an RI-2031 Plus refractive index detector, and two Polar Gel-M
168 columns (Phenogel 5 μm 50Å and 1000Å, 4.6 mm \times 300 mm, Phenomenex).
169 Dimethylformamide with 0.1% lithium bromide was used as the eluent at a flow rate of 0.7
170 mL/min and a temperature of 40 °C. Calibration was performed using polystyrene standards
171 (Sigma-Aldrich) ranging from 266 to 70,000 g/mol. Thermal resistance was evaluated using
172 thermogravimetric analysis (TGA/DTG) and differential scanning calorimetry (DSC) on a
173 PerkinElmer STA 6000 apparatus. Approximately 20 mg of lignin was analyzed in an open

174 alumina capsule under a nitrogen gas flow of 20 mL/min, with temperature measurements
175 recorded between 35 °C and 600 °C at a heating rate of 10 °C/min.

176 The total phenolic content of lignin was quantified using the Folin-Ciocalteu
177 colorimetric method. Lignin was dissolved in 1% DMSO (DMSO: water, v/v) at
178 a concentration of 1000 µg/mL. A 2.5 mL portion of this solution was mixed with 0.5 mL of
179 diluted Folin-Ciocalteu reagent (1:10, v/v) and incubated for 5 min, followed by the addition
180 of 2 mL of 7.5% sodium carbonate. After a 2 h incubation at 25 °C, the absorbance at
181 760 nm was measured. Quantification was carried out using a calibration curve prepared with
182 gallic acid, and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of
183 lignin (GAE). All experiments were conducted in triplicate.

184

185 **2.5. *In vitro* antioxidant activity**

186 Antioxidant activity assays were performed to evaluate alkaline lignins, following the
187 methodologies described by Silva et al. (2021), Araújo et al. (2022), Cruz Filho et al. (2023),
188 and Silva et al. (2023). Lignin was dissolved in 1% DMSO (DMSO:water, v/v) at
189 concentrations ranging from 0.0 to 1000 µg/mL. The assays included radical scavenging
190 and ion reduction tests.

191 Radical scavenging activity was assessed using several methods. In the DPPH assay,
192 0.5 mL of lignin solution was mixed with 2.5 mL of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and
193 incubated for 45 min at 30 °C. The absorbance of the mixture was measured at 517 nm, with
194 ethanol serving as the blank. For the ABTS assay, 0.5 mL of lignin solution was combined
195 with 2.5 mL of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and incubated
196 for 5 min at 30 °C. The absorbance was measured at 734 nm, again using ethanol as the blank.

197 In the nitric oxide (NO) radical assay, 0.5 mL of sodium nitroprusside (20 mM SNP)
198 was mixed with 0.5 mL of lignin solution and incubated for 60 min. Afterward, 0.5 mL of a 2%

199 phosphoric acid solution and 0.5 mL of the Griess reagent were added, followed by a 10
200 min incubation, and the absorbance was measured at 562 nm. The hydroxyl radical assay
201 ($\text{OH}\cdot$) involved preparing a mixture containing $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.5 mM), H_2O_2 (6 mM), and
202 sodium salicylate (20 mM). The mixture was incubated at 37 °C for 1 h, and the absorbance was
203 measured at 515 nm, with water serving as the blank. Ion reduction tests were also conducted.
204 The Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method involved combining 0.5 mL of lignin
205 solution, 0.1 mL of distilled water, and 2.6 mL of FRAP reagent. The mixture was incubated at
206 37 °C for 30 min, and the absorbance was measured at 595 nm, using the FRAP reagent as the
207 blank. For the iron ferricyanide method, a mixture of 2.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH
208 6.6), 2.5 mL of potassium ferricyanide, and 2.5 mL of trichloroacetic acid was prepared and
209 centrifuged at 3000 rpm for 30 min. Then, 2.5 mL of the supernatant was mixed with 2.5 mL of
210 distilled water and 0.5 mL of ferric chloride, and the absorbance was measured at 700 nm.

211 The phosphomolybdenum complex reduction test used a reagent solution
212 containing 28 mM sodium phosphate, 4.0 mM ammonium molybdate, and 0.6 M sulfuric acid.
213 A 3.0 mL aliquot of this reagent was mixed with 0.3 μL of lignin solution and incubated
214 at 95 °C for 90 min. The copper ion reduction method (CUPRAC) involved mixing 0.5 mL
215 of lignin solution with 0.5 mL of 0.01 M $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mL of 0.0075 M ethanolic
216 neocuproine, and 0.5 mL of 1 M ammonium acetate buffer (pH 7). The mixture was
217 incubated at 30 °C for 30 min, and absorbance was measured at 450 nm, with a blank
218 containing only the reagents and water.

219 All experiments were conducted in triplicate, and absorbance measurements were taken
220 using a UV/VIS spectrophotometer (Hewlett-Packard, model 8453). Ascorbic acid and
221 butylated hydroxytoluene (BHT) were used as standards to calculate the IC_{50} , representing
222 the concentration at which 50% of radicals or reducing ions were captured.

223

224 **2.6. Cytotoxicity in mammalian cells**

225 Cell viability following exposure to lignin was evaluated using the
226 MTT colorimetric assay, which assesses mitochondrial activity by measuring the reduction
227 of MTT to formazan crystals. The procedures were conducted following methodologies
228 outlined by Silva et al. (2021), Araújo et al. (2022), Cruz Filho et al. (2023), and Silva et al.
229 (2023). Lignin was first dissolved in a 1% DMSO (DMSO: water, v/v) solution at
230 concentrations ranging from 3.9 to 1000 µg/mL. J774.A1 macrophages, V79 fibroblasts,
231 Vero, and HepG2 cells were seeded into 96-well plates at a density of 1×10^5 cells per well and
232 exposed to varying concentrations of lignin for 48 h under controlled conditions (37 °C,
233 95% humidity, and 5% CO₂). Control wells contained only cultured cells without lignin
234 treatment.

235 Following the incubation period, the medium was carefully removed, and 100 µL
236 of MTT solution (0.5 mg/mL) were added to each well. The plates were incubated for an
237 additional hour under the same conditions. After this, the supernatant was removed, and 100
238 µL of DMSO were added to solubilize the formazan crystals. Absorbance was measured
239 at 550 nm using a Thermo Scientific microplate spectrophotometer. Hemolytic activity was
240 also assessed using a 1% mouse erythrocyte suspension. A total of 1.1 mL of the
241 erythrocyte suspension was mixed with 0.4 mL of lignin at varying concentrations. The
242 control groups included a culture medium with 1% DMSO as the negative control and
243 Triton X-100 as the positive control. After 45 min of incubation at 30 °C, the samples
244 were centrifuged, and the absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. All
245 experiments were performed in triplicate to ensure reliability.

246

247 **2.7. *In vitro* immunomodulatory activity**

248 *In vitro* immunomodulatory activity assays were conducted with adaptations
249 based on the protocols described by Cruz Filho et al. (2019), Santos et al. (2020), and Araújo
250 et al. (2022). Lignin was dissolved in a 1% DMSO (DMSO:water, v/v) solution at
251 concentrations ranging from 3.9 to 1000 µg/mL. Balb/c mouse cells (10⁶ cells per well) were
252 exposed to these varying concentrations of lignin for 24 and 48 h in a controlled incubator
253 at 37 °C, with 95% humidity and 5% CO₂. A FACS Calibur platform was used to analyze the
254 cells via flow cytometry.

255 Cytotoxic effects of lignin were assessed using propidium iodide and annexin V as
256 markers. Cell proliferation was evaluated using CFSE staining. The cytokine profile of lignin-
257 stimulated cells was measured using a mouse cytometric bead array (CBA) kit, which
258 quantified interleukins such as IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α, and IFN-γ. Nitric oxide
259 (NO) levels in the culture supernatant were determined using the Griess method. An
260 analytical curve of sodium nitrite (3.12–400 µM) was used to quantify NO, and absorbance
261 was measured at 595 nm with a microplate spectrophotometer (Multiskan FC, Thermo
262 Scientific®).

263 Oxidative stress parameters, associated with cell activation, were also evaluated.
264 These included measurements of cytosolic and mitochondrial reactive oxygen species
265 (ROS), transmembrane potential, and cytosolic Ca²⁺ concentrations. Flow cytometry
266 techniques were employed for these analyses using dihydroethidium (DHE), MitoSox Red,
267 MitoStatus, and Fluo-3AM dyes. Immunophenotyping assays were performed to identify
268 specific cell populations using antibodies targeting anti-CD4-FITC and anti-CD8-PE for
269 lymphocytes, anti-CD16-PE for natural killer cells, and anti-CD16/32-PercyP for
270 monocytes.

271 All experiments were conducted in quintuplicate to ensure the reliability and
272 reproducibility of the results.

273

274 **2.8. *In vitro* schistosomicidal activity**275 **2.8.1. *Ethics Committee, animals, and infection***

276 Nineteen Swiss Webster mice, with an average weight of 28 ± 2 g, were
277 percutaneously infected with approximately 120 cercariae of *Schistosoma mansoni* (BH
278 strain) following the method described by Olivier and Stirewalt (1952). The mice were
279 sourced and housed in a vivarium maintained at a temperature of 20 ± 2 °C with a 12 h
280 light/dark cycle. They were fed a LabDiet/Purina diet (São Paulo, SP) and provided with
281 unlimited access to water. All procedures in this study adhered to the ethical guidelines
282 established by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Biosciences Center
283 at UFPE, under protocol number 0060/2019 CEUA/UFPE.

284

285 **2.8.2. *Worm recovery and in vitro schistosomicidal evaluation of lignin against adult***
286 ***worms of Schistosoma mansoni***

287 Forty-five days post-infection, the mice were euthanized via cervical dislocation.
288 Worms were collected using aseptic techniques by perfusing the portal system and
289 mesenteric veins with sterile saline solution (0.9% NaCl, w/v), following the method
290 established by Smithers and Terry (1965). Intact pairs of worms were carefully transferred to
291 RPMI 1640 medium containing 20 mM HEPES, 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL
292 streptomycin, and 10% fetal bovine serum. The worms were washed four times in this
293 medium to ensure cleanliness.

294 The worms were then distributed into 24-well culture plates, with each well
295 containing 2 mL of medium. The plates were incubated at 37 °C in a humidified
296 environment with 5% CO₂. Lignin, diluted in 1% DMSO (DMSO:water, v/v), was added to
297 the culture medium to achieve final concentrations of 500, 250, and 125 µg/mL. Control

298 groups included two negative controls: Control 1, consisting of RPMI 1640 medium alone,
299 and Control 2, consisting of RPMI 1640 medium supplemented with 1% DMSO.
300 Additionally, a positive control group was treated with a 10 μ M Praziquantel (PZQ) solution.

301 Two independent experiments were conducted in quadruplicate to ensure the
302 reliability of the results.

303

304 ***2.8.3. Evaluation of motility and mortality of adult worms***

305 An inverted microscope (Leica Microsystems, DM IL Wetzlar, Germany) was used
306 to evaluate the motility and viability of worm pairs. Observations were made initially at 3, 6, 12,
307 and 24 h after treatment and subsequently at 24 h intervals for five consecutive days (24, 48,
308 72, 96, and 120 h). Worm motility and survival were assessed based on the criteria established
309 by Cruz Filho et al. (2023), using a viability scale ranging from 3 to 0: Score 3: Worms in the
310 negative control group display typical characteristics, including active movements, peristalsis
311 of internal organs, and adherent suckers. Score 2: Worms exhibit reduced body movements,
312 including peristalsis of internal organs, but retain active suckers. Score 1: Worms show limited
313 movement in extremities (anterior and/or posterior regions) without internal peristalsis and have
314 non-adherent suckers. Score 0: Worms show complete absence of movement and tegument
315 integrity, with or without color changes. Treatment efficacy was determined when worms
316 displayed a motility score of 0, with no observable movement for at least two minutes.

317 In the positive control group treated with 10 μ M Praziquantel (PZQ), 100% of the
318 worms reached a motility score of 0 within 3 hours of incubation. In contrast, negative
319 control groups incubated in supplemented RPMI 1640 medium (Control 1) or RPMI 1640
320 medium alone maintained typical movements (Score 3), characterized by active motility,
321 internal peristalsis, and adherent suckers. These worms also remained attached to the
322 surface of the Petri dish and demonstrated no deviations from normal behavior.

323 Consequently, worms in Control 2 were designated as the negative motility control group. The
324 experiments were performed in triplicate, and the effects of lignin were further analyzed
325 using scanning electron microscopy to investigate structural changes caused by the treatment.

326

327 **2.9. Preliminary characterization of *Clarisia racemosa* lignin tablets and**

328 **Praziquantel release study**

329 Cruz-Filho et al. (2023) and Silva et al. (2023) conducted a study on tablet
330 formulation using lignin as an excipient, introducing some adjustments to their prior work.
331 The study involved two types of tablet formulations. The first formulation, referred to as
332 LIGCP, contained 1.0% magnesium stearate, 3.0% croscarmellose sodium, 5.0%
333 praziquantel, 20% lignin, 20% lactose, and 51% microcrystalline cellulose. The second
334 formulation, LIGWP, excluded lignin and consisted of 71% microcrystalline cellulose while
335 maintaining the same proportions for the other components. The tablets were compressed
336 into a 6 mm diameter matrix at a constant load of 400 kg and a speed of 180mm/min.

337 Following preparation, several quality parameters were evaluated. These included the
338 weight of 20 tablets, hardness, thickness, and diameter consistency. The uniformity of unit
339 doses was assessed using the weight variation method. Friability tests were performed to
340 evaluate mechanical resistance, and disintegration tests were conducted using a
341 disintegration apparatus with water at 37 °C.

342 Dissolution kinetics were also examined to determine the release profile of
343 praziquantel from the tablets. The tests were conducted in dissolution tanks containing 0.1
344 mol/L HCl maintained at 37 ± 0.5 °C. Tablets (n = 12) were placed in the dissolution vats with
345 agitation at 50 rpm. Aliquots were collected at 5 min intervals over a 120 min period, filtered,
346 and analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) under conditions
347 described by Eason et al. (2022).

348

349 **2.10. Statistical analysis**

350 Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by
351 Tukey's post-hoc test. Results are presented as mean \pm standard deviation. Statistical
352 analyses were conducted using the GraphPad Prism 5 software, with a significance level set
353 at $p < 0.05$.

354

355 **3. Results and discussion**

356 **3.1. Wood composition analysis, yield determination, and lignin elemental analysis of** 357 ***Clarisia racemosa***

358 Table 1 presents the chemical composition of *Clarisia racemosa* wood before
359 and after treatment with sulfuric acid and sodium hydroxide, respectively.

360

361 [Please insert Table 1]

362

363 The chemical composition of *Clarisia racemosa* wood, including its primary
364 constituents such as cellulose, hemicellulose, and lignin, is consistent with findings reported
365 by other researchers. Wood generally consists of cellulose (40.58%–50.81%), hemicellulose
366 (16.56%–24.1%), lignin (25%–34.72%), extractives (3.82%–16.01%), and ash (0.3%–1.67%).
367 These results align with studies conducted by Corrêa (1990), Frazão (1990), Santana and Okino
368 (2007), Rivera Inga and Uceda Castillo (2016), and Nerys et al. (2022). Based on these
369 composition results, wood fractionation was performed to isolate lignin through two main
370 steps.

371 The first step, acid precipitation, involved treating the wood sample with 1% sulfuric
372 acid to remove polysaccharides and other soluble components, resulting in a solid mixture of

373 cellulose and lignin, referred to as cellulignin (Cruz-Filho et al., 2023). The second step,
374 alkaline delignification, used a 1% sodium hydroxide solution to separate cellulose (in solid
375 form) from lignin (in liquid form) (Silva et al., 2023). These steps aimed to obtain a purer lignin,
376 free of sugars and other constituents (Cruz-Filho et al., 2023; Silva et al., 2023).

377 The lignin yield after acid precipitation was 80.98%, which is consistent with the
378 range reported by other authors who used similar methods. Silva et al. (2023) and Cruz Filho
379 et al. (2023) reported yields ranging from 60.2% to 89.8%. Elemental analysis of the isolated
380 lignin revealed the following composition: carbon (C), $62.34 \pm 0.1\%$; oxygen (O), $31.77 \pm 0.5\%$;
381 and hydrogen (H), $5.89 \pm 0.2\%$. No nitrogen (N) or sulfur (S) was detected. These results
382 show notable differences compared to lignins from other sources. For example, Cruz-Filho et
383 al. (2023) analyzed lignins from *Protium puncticulatum* and *Scleronema micranthum* branches
384 and leaves, reporting carbon contents of 58.14%–61.46%, oxygen contents of 31.03%–
385 35.14%, hydrogen contents of 6.20%–7.32%, and nitrogen contents of 0.12%–0.52%.
386 Similarly, Silva et al. (2023) studied lignin from *C. ferrea* and found carbon at $68.97 \pm 0.1\%$,
387 oxygen at $26.06 \pm 0.4\%$, hydrogen at $4.11 \pm 0.02\%$, and nitrogen at $0.08 \pm 0.0\%$.

388

389 **3.2. Physical and chemical characterization of lignin obtained from *Clarisia racemosa*** 390 **wood**

391 The lignin obtained was subjected to physical and chemical characterization using a
392 range of advanced techniques, including Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR),
393 V/Vis spectroscopy, ^{31}P NMR, 2D HSQC NMR, pyrolysis coupled with gas chromatography-
394 mass spectrometry (GC/MS), gel permeation chromatography (GPC), and thermal analysis
395 techniques such as thermogravimetric analysis (TGA/DTG) and differential scanning
396 calorimetry (DSC). The FTIR spectra are presented in Figure 1A and 1B, while the UV/Vis
397 spectrum is shown in Figure 1C.

398

399

[Please insert Figure 1]

400

401 Figures 1A and 1B show the FTIR spectra of the lignin in the region from 4000 to 400
402 cm^{-1} . The bands observed were previously identified by Araújo et al. (2022), Cruz Filho et al.
403 (2023), and Silva et al. (2023) while evaluating alkaline lignins. In Figure 1A, the broad band at
404 3438 cm^{-1} is attributed to the moisture content of the lignin and the high concentration of
405 hydroxyl groups in its structure. The bands at 2939 cm^{-1} and 2845 cm^{-1} correspond to the
406 asymmetric and symmetric stretching vibrations of the C-H bond, with the former representing
407 methyl-group vibrations (CH_3) and the latter corresponding to methylene-group vibrations
408 (CH_2).

409 In Figure 1B, an absorption band at 1696 cm^{-1} indicates the presence of ketone and
410 ester groups (carbonyl groups). The absorption band at 1594 cm^{-1} is associated with
411 aromatic-skeleton vibrations influenced by C=O stretching. At 1507 cm^{-1} and 1459 cm^{-1} ,
412 vibrations of the aromatic skeleton and asymmetrical deformations of C-H in CH_3 and CH_2
413 groups, respectively, are observed. A band at 1418 cm^{-1} corresponds to the aromatic skeleton
414 vibrations combined with C-H in-plane deformation. The band at 1327 cm^{-1} is attributed to C-
415 O stretching in syringyl (S) rings, condensed syringyl (S) and guaiacyl (G) units, or the
416 combination of CH_2 angular deformation and O-H deformation. The band at 1268 cm^{-1}
417 represents guaiacyl (G) rings and C=O stretching in aromatic and vinyl ethers.

418 Further, the bands at 1170 cm^{-1} and 1124 cm^{-1} indicate the presence of C=O in
419 conjugated esters, which are typical in HGS lignins. The band at 1170 cm^{-1} corresponds to the
420 expansion-contraction of the aromatic ring, while the band at 1124 cm^{-1} is associated
421 with the C=O stretching of the guaiacyl ring (G). Finally, the bands at 1029 cm^{-1} , 916 cm^{-1} ,
422 and 835 cm^{-1} are attributed to C-H deformation in guaiacyl rings (G), C- O deformation in

423 primary alcohols, symmetrical C-O-C stretching, vinyl bonds, and out-of-plane C-H
424 deformation in p-hydroxyphenyl (H) rings. These bands confirm that the lignin is of the GSH
425 type.

426 Figures 1C and 1D present the UV/Vis absorption spectrum from 200 to 700 nm and the
427 reference line used to calculate the extinction coefficient. Analysis of Figure 1C shows a
428 maximum absorption wavelength at 281 nm, indicative of non-condensed phenolic groups
429 in the macromolecular structure. This absorption is associated with the $\pi \rightarrow \pi^*$ electronic
430 transition within the aromatic ring of guaiacyl (G) units. Additionally, a weak band between
431 320 and 400 nm corresponds to conjugated phenolic structures, particularly those containing -
432 CH=CHCOOH functional groups. These findings are consistent with the results of Araújo et
433 al. (2022), Cruz Filho et al. (2023), and Silva et al. (2023), who noted similar absorption
434 characteristics for alkaline lignins, primarily due to their aromatic nature and strong
435 absorption in the ultraviolet region around 280 nm. These results suggest that *Clarisia*
436 *racemosa* lignin contains a higher proportion of guaiacyl (G) units.

437 Figure 1D illustrates the relationship between concentration and absorbance, used to
438 determine the extinction coefficient (absorptivity). For lignin in this study, the
439 absorptivity was calculated as 14.36 L/g/cm. Literature values for alkaline lignins vary
440 significantly. Araújo et al. (2022) reported values of 18.66 L/g/cm and 12.27 L/g/cm for lignins
441 from the branches and leaves of *Buchenavia viridiflora*, respectively. Cruz Filho et al. (2023)
442 obtained values of 18.36 L/g/cm and 10.99 L/g/cm for the branches and leaves of *Protium*
443 *puncticulatum*, and 19.66 L/g/cm and 15.26 L/g/cm for *Scleronema micranthum*. Silva et al.
444 (2023) reported a value of 10.45 ± 0.2 L/g/cm for *C. ferrea* lignin. These differences are
445 primarily attributed to the lignin's source and the substituents present on the aromatic rings,
446 as higher levels of substituted rings typically result in increased absorptivity at 280 nm.

447 Figure 2 displays further characterization results, including the ^{31}P nuclear magnetic resonance
448 (Figure 2A) and pyrolysis coupled with GC/MS (Figure 2B), which provide additional insights
449 into the structural and compositional properties of *Clarisia racemosa* lignin.

450 [Please insert Figure 2]

451

452 Figure 2A presents the ^{31}P NMR spectrum, which is a rapid and effective method for
453 quantifying and distinguishing phenolic and aliphatic hydroxyl groups in lignin by
454 identifying the corresponding phosphorylated structures. The regions in the spectrum were
455 previously identified by Mun et al. (2022) and Araneda et al. (2022) during their evaluations
456 of various lignins. The spectrum revealed six distinct peaks: the first peak (150.0–145.4 ppm)
457 corresponds to aliphatic OH groups; the second peak (141.6–140.4 ppm) is assigned to C5-
458 substituted OH groups; the region from 144.5–142.17 ppm represents syringyl OH groups;
459 peaks in the ranges 140.17–138.79 ppm and 138.4–137.1 ppm are attributed to guaiacyl OH
460 and p-hydroxyphenyl OH groups, respectively; and the final peak (136.0–133.6 ppm)
461 corresponds to COOH groups. The concentrations of these groups, expressed in mmol/g, were
462 as follows: aliphatic OH (1.39), C5-substituted OH (0.13), syringyl OH (0.13), guaiacyl OH
463 (0.52), p-hydroxyphenyl OH (0.14), and COOH (0.06).

464 Supplementary Figure 1S and Table 1S display the 2D HSQC NMR spectrum and the
465 main signals of the analyzed lignin. The 2D HSQC NMR technique provides enhanced
466 structural characterization by offering detailed information on aromatic units and the linkages
467 between monomeric units. The spectrum revealed distinct regions: the aromatic region ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$
468 140–105/8.0–5.5 ppm), the oxygenated aliphatic region ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 105–50/5.5–2.5 ppm), and the
469 aliphatic region ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 30–10/1.0–0.5 ppm). The signals in each region were previously
470 identified by Araújo et al. (2022), Cruz Filho et al. (2023), and Silva et al. (2023) during their
471 analyses of alkaline lignins.

472 In the aromatic region, signals were assigned to guaiacyl (G), syringyl (S), and p-
473 hydroxyphenyl (H) units, as well as to fragments of p-coumarate (PCE) and ferulic acid (FA).
474 The following $\delta C/\delta H$ (ppm) correlations were identified: 111.4/6.81 (C2-H2 and C5-H5 in G
475 units); 118.1/6.75 (C6-H6 in G units); and 83.9/4.31 (C β -H β in β -O-4 substructures linked
476 to G units). Syringyl units showed a correlation at 85.8/4.11 (C β -H β in β -O-4 substructures
477 linked to S units). p-Hydroxyphenyl units presented a correlation at 125.1/6.88 (C2,6-H2,6 in
478 H units). Signals at 115.3/6.92 (C3.5-H3.5 in p-coumarate) were associated with ferulic acid.

479 In the oxygenated aliphatic region, methoxy groups (-OCH₃) and signals
480 corresponding to (C α -H α) in β -aryl ether acetylated structures and (C β -H β) in β -O-4'
481 substructures were identified at $\delta C/\delta H$ 59.9/3.54 and 72.3/4.71 ppm, respectively.
482 Additionally, a signal at 39.51/2.50 ppm was attributed to the solvent DMSO. In the aliphatic
483 region (10–30/0.5–1.0 ppm), signals corresponding to CH in saturated aliphatic chains were
484 observed. These results confirm that the lignin obtained is of the GSH type.

485 The proportion of guaiacyl, syringyl, and p-hydroxyphenyl groups was determined
486 from the respective areas of each unit in the GSH lignin. The results were as follows: guaiacyl
487 (65.41%), syringyl (14.25%), and p-hydroxyphenyl (20.34%), indicating a higher proportion
488 of guaiacyl units, consistent with the findings from ³¹P NMR. Another widely used technique
489 for confirming lignin unit proportions is pyrolysis coupled with gas chromatography and
490 mass spectrometry (GC/MS). During pyrolysis, lignin is broken down into aromatic
491 compounds at high temperatures in an inert atmosphere, allowing the identification of
492 guaiacyl, syringyl, and p-hydroxyphenyl units. This process preserves the inherent structural
493 patterns of lignin (Terrell et al., 2020; Leng et al., 2022).

494 Figure 2B presents the pyrogram of alkaline lignin extracted from *Clarisia racemosa*. The
495 signals obtained from the pyrogram were identified and summarized in Table 2, providing
496 further insights into the structural composition of the lignin.

497

498

[Please insert Table 2]

499

500 The results presented in Table 2 confirm that the lignin from *Clarisia racemosa* is of the
501 GSH type, with a higher guaiacyl (G) unit content, corroborating the findings from
502 spectroscopic analyses (FTIR, ³¹P NMR, and 2D HSQC NMR). The chemical
503 composition of the lignin was as follows: non-GSH aromatic structures (10.1%), catechol
504 (5.19%), p-hydroxyphenyl (H) units (12.45%), guaiacyl (G) units (63.14%), and syringyl (S)
505 units (9.17%).

506 The literature provides similar characterizations of alkaline lignins using Py-GC/MS.
507 Silva et al. (2021) evaluated lignin from *Morinda citrifolia* and reported aromatic contents of
508 8.67%, catechol 4.45%, guaiacyl 61.98%, syringyl 14.24%, and p-hydroxyphenyl 10.66%.
509 Araújo et al. (2022) studied lignins from the branches and leaves of *Buchenavia viridiflora*, with
510 the branches yielding aromatic contents of 5.81%, catechol 14.10%, guaiacyl 60.91%,
511 syringyl 10.74%, and p-hydroxyphenyl 8.44%, while the leaves had aromatic contents of
512 7.96%, catechol 11.78%, guaiacyl 56.56%, syringyl 14.02%, and p-hydroxyphenyl 9.68%. Cruz
513 Filho et al. (2023) analyzed lignins from the branches and leaves of *Protium puncticulatum*
514 and reported aromatic contents of 3.3% and 5.6%, catechol 18.32% and 19.59%, p-
515 hydroxyphenyl 10.95% and 4.34%, syringyl 14.54% and 16.79%, and guaiacyl 52.87% and
516 53.68%, respectively. For *Scleronema micranthum*, aromatic contents were 13.1% and 2.7%,
517 catechol 7.98% and 6.22%, p-hydroxyphenyl 18.62% and 11.92%, syringyl 18.27% and
518 13.77%, and guaiacyl 42.01% and 65.40%, respectively. Silva et al. (2023) evaluated lignin
519 from *Caesalpinia ferrea* and found aromatic contents of 8.67%, catechol 4.45%, p-
520 hydroxyphenyl 10.66%, syringyl 14.24%, and guaiacyl 61.98%.

521 The molecular weight of lignin from *Clarisia racemosa* was determined using gel
522 permeation chromatography (GPC), which assesses molecular mass distribution,
523 including weight-average molar mass (Mw), number-average molar mass (Mn), and
524 polydispersity index (Mw/Mn). The molecular weight parameters for *Clarisia racemosa* lignin
525 were Mw = 3301 Da, Mn = 2200 Da, and Mw/Mn = 1.5. These results indicate that the lignin
526 has a low molecular weight (below 4000 Da) and a low polydispersity index, suggesting a
527 high degree of fragment homogeneity. These findings are consistent with prior studies by
528 Araújo et al. (2022), Cruz Filho et al. (2023), and Silva et al. (2023).

529 In the literature, molecular weight distributions for alkaline lignins vary depending on
530 the source material. Araújo et al. (2022) reported Mw = 3945.10 Da and 984.77 Da, Mn =
531 2000.92 Da and 691.50 Da, and Mw/Mn = 2.0 and 1.4 for lignins from the branches and leaves
532 of *Buchenavia viridiflora*, respectively. Cruz Filho et al. (2023) observed Mw = 2019.24 Da and
533 965.59 Da, Mn = 1945.40 Da and 578.03 Da, and Mw/Mn = 1.0 and 1.7 for the branches and
534 leaves of *Protium punctulatum*, respectively. For *Scleronema micranthum*, Mw = 4000 Da
535 and 901.53 Da, Mn = 3089.11 Da and 498.30 Da, and Mw/Mn = 1.3 and 1.8 were reported.
536 Silva et al. (2023) found Mw = 984.4 ± 0.4 Da, Mn = 691.7 ± 0.1 Da, and Mw/Mn = 1.42
537 for lignin from *C. ferrea*. These differences highlight the impact of the source material on
538 lignin properties. The thermal stability of *Clarisia racemosa* lignin was
539 evaluated using thermogravimetric analysis (TGA), derivative thermogravimetry
540 (DTG), and differential scanning calorimetry (DSC). The thermogravimetric curves (TGA)
541 shown in Figure 3A depict the percentage of mass loss as a function of temperature. Figure
542 3B presents the DTG curve, which highlights the rate of mass change over time. The DSC
543 curve in Figure 3C shows changes in enthalpy as a function of temperature. These
544 techniques, widely employed in other studies (Mudoj and Sinha, 2023; Naydenova et al., 2023),
545 provide valuable insights into the thermal properties of lignin.

[Please insert Figure 3]

546

547

548 The thermogravimetric curve (TGA) in Figure 3A shows two main stages of thermal
549 degradation. The initial stage, occurring around 100 °C, is primarily associated with moisture
550 loss. During this phase, lignin undergoes complete dehydration, and the cleavage of alpha
551 and beta aryl-alkyl-ether bonds leads to a weight reduction of approximately $8.7 \pm 0.3\%$.
552 Above 300 °C, the aliphatic chains connected to aromatic rings begin to separate, resulting in the
553 breakdown of carbon-carbon bonds within the lignin structural units and a mass loss of
554 approximately $67.8 \pm 0.5\%$. When the temperature exceeds 400 °C, lignin combustion is fully
555 completed, leaving an inorganic residue with a remaining mass of approximately $23.5 \pm 0.1\%$.

556

557 The differential thermogravimetric (DTG) curve, shown in Figure 3B, represents the first
558 derivative of the TGA curve and highlights the rate of thermal degradation. Peaks in the
559 temperature range of 35–600 °C indicate varying degradation rates, with the highest rate observed
560 at 356 °C. This peak corresponds to the breaking of interunit bonds, leading to the loss of
561 monomeric phenols and carbohydrates and the degradation of aromatic rings.

561

562 The DSC curve in Figure 3C displays an endothermic peak in the temperature range of 0–
563 100 °C, which is likely caused by the evaporation of adsorbed water in the sample. Additionally,
564 an exothermic peak is observed between 300 and 450 °C, corresponding to the thermal degradation
565 of lignin. A similar thermal profile has been reported in studies by Arruda et al. (2021), Silva et
566 al. (2021), Araújo et al. (2022), Cruz Filho et al. (2023), and Silva et al. (2023) during the
567 evaluation of various alkaline lignins.

567

568 3.3. Content of total phenolic groups and *in vitro* antioxidant activity

569

570 Lignins have been widely recognized for their potential as powerful antioxidant agents,
a property attributed to their phenolic macromolecular structure, as observed by Li et al. (2023).

571 The phenolic groups in lignin can compete for active sites and receptors within cellular
572 structures and influence the expression of genes encoding proteins involved in cellular
573 defense against oxidative and degenerative processes, as noted by Liu et al. (2019) and Olszowy
574 (2019). These phenolic groups have the ability to donate hydrogen atoms to free radicals,
575 chelate pro-oxidant metals, activate critical antioxidant enzymes such as superoxide dismutase,
576 catalase, and glutathione peroxidase, and perform various other antioxidant functions, as
577 explained by Liu et al. (2019) and Olszowy (2019). However, certain groups present in lignin,
578 such as conjugated carbonyl and aliphatic hydroxyl groups, may hinder or reduce its
579 antioxidant activity, as suggested by Li et al. (2023) and Silva et al. (2023). The lignin isolated
580 from *Clarisia racemosa* exhibited a phenolic content of 274.3 mg GAE/g. The *in vitro*
581 antioxidant activity results are summarized in Table 3.

582

583

[Please insert Table 3]

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

The results demonstrate that *Clarisia racemosa* lignin exhibited antioxidant capacity in various assays, including DPPH, ABTS, nitric oxide, and hydroxyl radical scavenging tests. Notably, the lignin performed exceptionally well in the ABTS assay, which is particularly suited for evaluating molecules with both hydrophobic and hydrophilic characteristics, as highlighted by Cano et al. (2023). However, the lignin did not display ion reduction capabilities, as evidenced by its performance in the FRAP, iron ion reducing power, phosphomolybdate, and CUPRAC assays. These variations in antioxidant performance are linked to the phenolic structure of lignin and the specific mechanisms assessed in each assay.

Numerous studies have explored the relationship between phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of alkaline lignins. Research by Cruz Filho et al. (2019), Silva et al. (2021), Melo et al. (2020), Santos et al. (2020), Arruda et al. (2021), Araújo et al. (2022), Cruz Filho et al. (2023), and Silva et al. (2023) reported phenolic contents ranging from 34.4 to 465.90 mg

596 GAE/g. IC₅₀ values for these studies ranged from 0.0 to 844.56 µg/mL for the DPPH assay
597 and from 1.4 to 484.1 µg/mL for the ABTS assay. These studies also consistently showed
598 low activity in NO and OH radical scavenging assays and in assays evaluating
599 phosphomolybdenum complex and iron ion reduction. Collectively, these findings
600 underscore lignin's potential as a promising *in vitro* antioxidant agent, particularly for its
601 radical scavenging properties.

602

603 **3.4. Evaluation of *in vitro* immunomodulatory activity**

604 The *in vitro* immunomodulatory experiments on mouse splenocytes assessed cell
605 viability and proliferation, cytokine and nitric oxide levels, immunophenotyping, and
606 oxidative stress. Splenocytes were treated with lignin at concentrations ranging from 3.9 to 1000
607 µg/mL for 24 or 48 h, with detailed results provided in Figures S2 to S9 of the supplemental
608 material.

609 Lignin did not exhibit cytotoxic effects on splenocytes, with cell viability
610 exceeding 95% in both propidium iodide (necrosis measurement) and annexin V
611 (apoptosis measurement) assays. Cell viability was maintained at 7.81 µg/mL after 24 and 48 h.
612 Furthermore, lignin significantly increased ($p < 0.05$) immune cell proliferation at all
613 concentrations evaluated in this study, demonstrating a mitogenic effect. These results are
614 presented in Figures S2 and S3.

615 These results align with findings by Cruz Filho et al. (2019), who evaluated alkaline
616 lignins from *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia cochenillifera*. Similar outcomes were reported
617 by Melo et al. (2020) for alkaline lignin derived from *Caesalpinia pulcherrima* and by
618 Araújo et al. (2022) for lignins extracted from branches and leaves of *Buchenavia viridiflora*.
619 The low cytotoxicity of lignin was further confirmed through MTT assays on mammalian
620 cell lines, including V79 fibroblasts, Vero cells, J774 macrophages, and HepG2 cells.

621 At the tested concentrations, lignin did not exhibit 50% growth inhibition (IC₅₀) in any
622 assay and was classified as a non-hemolytic agent, with hemolysis values below 5%. These
623 observations are consistent with findings by Araújo et al. (2022), Cruz-Filho et al. (2023), and
624 Silva et al. (2023), who also confirmed the low cytotoxicity of various alkaline lignins.

625 The study further evaluated cytokine production (Figures S4 and S5), focusing on seven
626 cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , and IFN- γ) associated with the Th1, Th2,
627 and Th17 immune response pathways. Lignin significantly increased ($p < 0.05$) the production
628 of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10, indicative of a Th2 immune response. It
629 also elevated IL-6 levels, which possess both pro-inflammatory and anti-inflammatory
630 properties. In contrast, the levels of IL-2, IL-17, TNF- α , and IFN- γ remained relatively
631 stable, suggesting no significant impact on their production. Confirmation of the anti-
632 inflammatory profile promoted by lignin is related to a significant decrease in nitric oxide
633 ($p < 0.05$).

634 The immunomodulatory effects of lignins are thought to be closely linked to their
635 chemical composition, although the exact mechanisms remain incompletely understood.
636 Phenolic groups in the macromolecular structure are believed to interact with immune cell
637 surface receptors, leading to various immune effects, as suggested by Arruda et al. (2021).
638 The anti-inflammatory properties of lignin were further supported by a decrease in nitric oxide
639 production in lignin-treated cells. Similar results were reported by Araújo et al. (2022), who
640 demonstrated that alkaline lignins from *Buchenavia viridiflora* stimulated the production
641 of IL-4, IL-10, and IL-6, consistent with a Th2 immune response profile. Melo et al.
642 (2020) found that lignin from *Caesalpinia pulcherrima* increased IL-4 and IL-10 levels more
643 than IL-2 and IFN- γ , suggesting a predominant Th2 response and an anti-inflammatory cytokine
644 profile.

645 Lignin was also found to increase oxidative stress parameters (Figures S6 and S7),
646 including the production of reactive oxygen species (ROS) in both the cytosol and
647 mitochondria, elevated cytosolic calcium levels, and altered mitochondrial membrane
648 potential. These findings indicate the activation of immune cells, as the significant increase
649 ($p < 0.05$) in oxidative stress did not lead to cell death. Similar results have been observed in
650 studies by Cruz Filho et al. (2019), Santos et al. (2020), Melo et al. (2020), and Araújo et al.
651 (2022), who evaluated various alkaline lignins.

652 Immunophenotyping assays (Figures S6 and S7) revealed that lignin increased the
653 population of CD8⁺ lymphocytes, which are essential for eliminating infectious and
654 neoplastic cells. However, no significant changes were observed in the populations of CD4⁺
655 T cells, CD16⁺ cells, or CD16⁺ monocytes. These findings are consistent with those reported
656 by Santos et al. (2020), who studied lignin from *Conocarpus erectus* and highlighted its
657 capacity to stimulate CD8⁺ lymphocyte growth. Overall, the results indicate that lignin
658 derived from *Clarisia racemosa* possesses significant potential as an *in vitro*
659 immunomodulatory agent.

660

661 3.5. *In vitro* schistosomicidal activity

662 The results of *in vitro* schistosomicidal activity promoted by lignin are presented in Table

663 4.

664 [Please insert Table 4]

665

666 Lignin affected the mating behavior of adult *Schistosoma mansoni* worms during
667 the incubation period, leading to the separation of all mated pairs into individual male and female
668 worms within 24 h. A dose of 500 $\mu\text{g/mL}$ significantly impacted the motor activity of both male
669 and female parasites within the first 24 h. The findings showed a 50% reduction in overall

670 body movement (score 2), with minimal localized movement (score 1) and increasing
671 immobility. Over time, motility further declined, with slight movements observed in only 65%
672 of body parts, eventually resulting in complete paralysis (score 0) after 120 hours. The motility
673 score decreased from 15% to 0%, with reduced activity leading to a loss of natural
674 movement and ultimately resulting in death. At lower concentrations, no significant motility
675 loss was observed, indicating that male and female worms were unaffected by the treatment.

676 Scanning electron microscopy (SEM) of adult worms provided additional
677 evidence regarding the effects of lignin on the ultrastructure of the *Schistosoma mansoni*
678 tegument (Figure 4).

679

680 [Please insert Figure 4]

681

682 Figures 4A and 4B display the surface characteristics of adult male parasites from the
683 negative control group after 24 h. These parasites remained alive, exhibiting unique parallel
684 folds, elongated bodies with a clearly defined gynecophoric canal (Figure 4A), and tubercles
685 adorned with projections and spicules (Figure 4B). In contrast, worms treated with
686 praziquantel (PZQ) at a concentration of 10 μ M all died within 24 h. SEM images of PZQ-
687 treated parasites revealed significant damage to their topographic surfaces, including
688 contorted or helical body shapes (Figure 4C), ulcerations caused by burst blisters, loss of
689 tubercles and spicules, and extensive material loss from bubble formation (Figure 4D).

690 In comparison, the damage observed in male worms treated with 500 μ g/mL lignin from
691 *Clarisia racemosa* was less severe. SEM images revealed minor damage near the gynecophoric
692 canal (Figure 4E) and a few blisters (BU) without major damage to the tegument (Figure
693 4F). These findings suggest that lignin has limited schistosomicidal activity *in vitro*.

694 While lignin demonstrated an ability to disrupt parasite motility and induce some
695 morphological changes, its effects were significantly less potent than those of
696 praziquantel. The limited damage to the tegument and the incomplete schistosomicidal activity
697 highlight the need for further investigation into lignin's potential as a complementary
698 or alternative treatment against *Schistosoma mansoni*.

699

700 **3.6. Preliminary evaluation of *Clarisia racemosa* lignin as an excipient for Praziquantel** 701 **release**

702 Lignin has emerged as a promising and sustainable raw material for tablet
703 production, as highlighted by Pishnamazi et al. (2019). This potential is attributed to the
704 abundance of phenolic and hydroxyl groups in lignin, which facilitate the distribution of various
705 drugs. Additionally, lignin is biodegradable and exhibits low toxicity, as noted by Mukheja et
706 al. (2023). Table 5 presents the preliminary characterization of two tablet formulations: one
707 without lignin (LIGWP) and one with lignin (LIGCP), both containing praziquantel as the active
708 ingredient.

709

710 [Please insert Table 5]

711

712 The characteristics of tablets made from lignin are influenced by the formulation and
713 the specific structure of the lignin used. Various studies have examined lignin-based tablets
714 with different active ingredients, reporting a range of tablet properties. For instance,
715 Pishnamazi et al. (2019) evaluated lignin-based tablets containing acetylsalicylic
716 acid and reported hardness values ranging from 3.9 kgf/cm² to 7.9 kgf/cm². Similarly, Gil-Chávez
717 et al. (2021) investigated Aquasolv lignin-based tablets containing ibuprofen and observed
718 variations in tablet thickness, diameter, mass, and disintegration time. Cruz-Filho et al.

719 (2023) assessed alkaline lignin-based tablets containing benznidazole and found
720 differences in tablet hardness and disintegration times. Silva et al. (2023) evaluated alkaline
721 lignin-based tablets containing oxacillin (LIGCO) and fluconazole (LIGCF), reporting
722 variations in hardness, friability, and disintegration time. Following the tablet characterization,
723 dissolution studies were performed, revealing that tablets containing lignin as an excipient
724 exhibited longer release times compared to those without lignin (Figure 5).

725

726 [Please insert Figure 5]

727

728 These findings align with those of Pishnamazi et al. (2019), who suggested that lignin
729 enhances drug solubility due to its disordered macromolecular structure and the higher Gibbs
730 free energy of its amorphous phase in the dissolution medium. Similar results have been
731 reported by Gil-Chávez et al. (2021), Cruz-Filho et al. (2023), and Silva et al. (2023), further
732 supporting lignin's potential as a valuable excipient in tablet formulations.

733

734 4. Conclusion

735 This study characterized the alkaline lignin from *Clarisia racemosa* wood
736 (GSH type), which is predominantly composed of G units (65.41%). With 274.3 mg GAE/g of
737 phenols, it demonstrated moderate in vitro antioxidant activity, including the ability to
738 capture free radicals (DPPH, ABTS, NO, and OH), but showed low effectiveness in reducing
739 metal ions. In cytotoxicity assays, it exhibited low cytotoxicity across different mammalian
740 strains (viability >95% and absence of hemolysis). These findings indicate that the lignin is
741 safe for use at the concentrations evaluated. Immunomodulatory activity assays showed cell
742 proliferation, and it was found that the lignin could modulate anti-inflammatory cytokines
743 (IL-4, IL-10), with a Th2 profile and a reduction in nitric oxide. In oxidative stress assays, a

744 significant increase in reactive oxygen species (ROS) was observed, along with altered
745 mitochondrial potential, which activated cells without compromising their viability.
746 Immunophenotyping revealed a significant increase in the population of CD8⁺ lymphocytes.
747 Regarding schistosomicidal activity, the lignin reduced parasite motility until immobilization
748 at high concentrations (500 µg/mL), with mild damage to the tegument, although it was
749 less effective than praziquantel. As a pharmaceutical excipient, it proved to be a promising
750 biomaterial, capable of promoting the controlled release of praziquantel in tablets. These results
751 highlight *Clarisia racemosa* lignin as a safe and bioactive biomaterial with therapeutic
752 potential, owing to its versatility in various biological activities.

753

754 **Declaration of competing interest**

755 The authors declare that they have no known competing financial interests or
756 personal relationships that could potentially influence the work reported in this article.

757 **Acknowledgements**

758 This study was funded by the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do
759 Estado de Pernambuco - FACEPE (Process APQ-0498-4.03/19), FACEPE (Process APQ-1181-
760 4.03/22), and a researcher fixation grant - FACEPE (Process BFP-0038-04.03/21). This study
761 was partially funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education
762 Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 and the National Council for Scientific and
763 Technological Development - CNPq (Process 306865/2020-3). We would like to thank Mil
764 Madeiras Preciosas, a subsidiary of the Swiss group Precious Woods
765 (<http://preciouswoods.com.br/>), for providing samples of *Clarisia racemosa*.

766

767

768 **References**

- 769 1. Araneda J.F., Burton I.W., Paleologou M., Riegel S.D., Leclerc M.C., 2022. Analysis
770 of lignins using ³¹P benchtop NMR spectroscopy: quantitative assessment of substructures
771 and comparison to high-field NMR. *Can. J. Chem.* 100 (11) 799-808,
772 <https://doi.org/10.1139/cjc-2022-0041>.
- 773 2. Araújo D.M.F., Cruz Filho I.J., Santos T., Pereira D.T.M., Marques D.S.C., Lima A.
774 C. A., Aquino T.M., Rocha G.J. M., Lima M. C. A., Nogueira F., 2022. Biological activities
775 and physicochemical characterization of alkaline lignins obtained from branches and
776 leaves of *Buchenavia viridiflora* with potential pharmaceutical and biomedical
777 applications. *Int. J. Biol. Macromol.*, 219 224-245,
778 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.225>.
- 779 3. Ariyanta H.A., Sari F.P., Sohail A., et al. 2023. Current roles of lignin for
780 the agroindustry: applications, challenges, and opportunities. *Int. J. Biol. Macromol.* 240,
781 124523 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124523>.
- 782 4. Arruda M.D.M., Alves S. P. L., Cruz Filho I.J., Sousa G.F., Souza Silva G.A.,
783 Santos D.K.D.N., Lima M. C. A., Rocha G.J. M., Souza I.A., Melo C.M.L., 2021.
784 Characterization of a lignin from *Crataeva tapia* leaves and potential applications in
785 medicinal and cosmetic formulations *Int. J. Biol. Macromol.* 180. 286-298,
786 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.077>.
- 787 5. Cano A., Maestre A.B., Hernández-Ruiz J., Arnao M.B., 2023. ABTS/TAC
788 methodology: Main milestones and recent applications *Processes.* 11. 185,
789 <https://doi.org/10.3390/pr11010185>.
- 790 6. Corrêa A.D.A., 1990. Pastas químicas soda-antraquinona de algumas essências nativas
791 da Amazônia Brasileira, comparadas com polpas Soda-AQ de espécies papeleiras clássicas
792 introduzidas na região. *Acta Amazonica*, 20 211-237.

- 793 7. Cruz Filho I.J., et al., 2023. *In vitro* evaluation of alkaline lignins as antiparasitic
794 agents and their use as an excipient in the release of benznidazole. Int. J. Biol.
795 Macromol. 123339, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123339>.
- 796 8. Cruz Filho I.J., Silva Barros B.R., Souza Aguiar L.M., Carvalho Navarro C.D., Ruas
797 J.S., Barros De Lorena V.M., Rocha G.J. M., Vercesi A.E., Lagos C.M. M., Souto Maior A.M.,
798 2019. Lignins isolated from prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica*
799 (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes
800 activation, proliferation and cytokines production. Int. J. Biol. Macromol. 123 (1331- 1339
801 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.120>.
- 802 10. Dominguez-Robles J., Carcamo-Martinez A., Stewart S.A., Donnelly R.F., Larraneta E.,
803 Borrega M., 2020. Lignin for pharmaceutical and biomedical applications - could this
804 become a reality? Sustain. Chem. Pharm. 18 <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100320>.
- 805 11. Eason et al. 2022. Revisiting the Dissolution of Praziquantel in Biorelevant Media and
806 the Impact of Digestion of Milk on Drug Dissolution. Pharmaceutics 14, 2228,
807 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102228>.
- 808 12. Frazão F.J.L., 1990. Utilização de madeiras de espécies nativas e exóticas da Amazônia
809 visando a produção de celulose Kraft. Acta Amazonica. 20 257-270.
- 810 14. Gil-Chávez J., Padhi S.S.P., Leopold C.S., Smirnova I., 2021. Application of aquasolv
811 lignin in ibuprofen-loaded pharmaceutical formulations obtained via direct compression and
812 wet granulation. Int. J. Biol. Macromol. 174 229-239.
813 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.064>.
- 814 15. Leng, E., Guo, Y., Chen, J., Liu, S., Jiaqiang, E., Xue, Y., 2022. A comprehensive review on
815 lignin pyrolysis: Mechanism, modeling and the effects of inherent metals in biomass Fuel,
816 309 122102, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122102>.

- 817 16. Li et al., 2023. Recent advances in lignin antioxidant: Antioxidant mechanism, evaluation
818 methods, influence factors and various applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 125992.
819 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125992>
- 820 17. Liu K., Luo M., Wei S., 2019. The bioprotective effects of polyphenols on metabolic
821 syndrome against oxidative stress: Evidences and perspectives. *Oxidative Medicine and*
822 *Cellular Longevity*, 2019 1-16, <https://doi.org/10.1155/2019/6713194>
- 823 18. Lu X., Gu X., 2023. A review on lignin-based epoxy resins: lignin effects on their
824 synthesis and properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 229, 778-790,b
825 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.322>.
- 826 19. Melo C.M.L., Cruz Filho I.J., Sousa G.F., Souza Silva G.A., Santos D.K.D.N., Silva R.S.,
827 Sousa B.R., Lima Neto R.G., Lima M. C.A., G.J.M. Rocha., 2020. Lignin isolated from
828 *Caesalpinia pulcherrima* leaves has antioxidant, antifungal and immunostimulatory
829 activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 162 1725
830 1733<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.003>.
- 831 20. Mudoi M.P., Sinha S., 2023. Thermal degradation study of natural fibre through
832 thermogravimetric analysis. *Mater. Today: Proc.*
833 <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.05.362>
- 834 21. Mukheja Y., Kaur J., Pathania K., Sah S.P., Salunke D.B., Sangamwar A.T., Pawar
835 S.V.,2023. Recent advances in pharmaceutical and biotechnological applications of lignin-
836 based materials *Int. J. Biol. Macromol.* 241,
837 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124601>.
- 838 22. Mun et al., 2022. Characterization of kraft lignin prepared from mixed hardwoods by 2D
839 HMQC and 31P NMR analyses. *BioResources.* 1;17(4)6626,
840 <https://doi.org/10.15376/biores.17.4.6626-6637>.

- 841 23. Naydenova et al., 2023. Utilization Perspectives of Lignin Biochar from Industrial
842 Biomass Residue. *Molecules*. 28 4842. <https://doi.org/10.3390/molecules28124842>.
- 843 24. Nerys L.L., Jacob I.T.T., Silva A.R., Oliveira A.M., Rocha W.R.V., Pereira D.T.M, Lima
844 M.D.C.A., 2022. Photoprotective, biological activities and chemical composition of the non-
845 toxic hydroalcoholic extract of *Clarisia racemosa* with cosmetic and pharmaceutical
846 applications. *Ind Crops Prod.* 180 114762,
847 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114762>.
- 848 25. Olivier L., Stirewalt M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of
849 *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 38 19-23 <https://doi.org/10.2307/3274166>.
- 850 26. Olszowy M., 2019. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic
851 compounds from plants? *Plant Physiol. Biochem.* 144 135-143,
852 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>.
- 853 27. Pishnamazi M., Iqbal J., Shirazian S., Walker G.M., Collins M.N., 2019. Effect of lignin
854 on the release rate of acetylsalicylic acid tablets. *Int. J. Biol. Macromol.* 124 354-359
855 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.136>.
- 856 28. Pola L., Collado S., Oulego P., Díaz M., 2022. Kraft black liquor as a renewable source of
857 value-added chemicals. *Chem. Eng. J.* 448 137728,
858 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137728>.
- 859 29. Rivera Inga P., Uceda Castillo M., 2016. Características físico - químicas de la madera y
860 carbón de once especies forestales de la amazonia peruana. *Revista Forestal Del Perú*,
861 *14*(2). <https://doi.org/10.21704/rfp.v14i2.137>.
- 862 30. Santana M. A. E., Okino E. Y. A., 2007. Chemical composition of 36 Brazilian Amazon
863 Forest wood species. Santos D.K.D. N. et al., 2020. Immunostimulatory and antioxidant

- 864 activities of a lignin isolated from *Conocarpus erectus* leaves. Int. J. Biol. Macromol.
865 150. 169-177, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.052>.
- 866 31. Silva et al., 2023. *In vitro* evaluation of antioxidant, cytotoxic, trypanocidal and
867 antimicrobial activities of lignin obtained from *Caesalpinia ferrea* leaves and its use as an
868 excipient in the release of oxacillin and fluconazole. Int. J. Biol. Macromol. 126225
869 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126225>.
- 870 32. Silva P.R., Lima M. C. A., Souza T.P., Sandes J.M., Lima A. C. A., Neto P.J.R., Santos
871 F.A.B., Alves L.C., Silva R.M.F., Rocha G.J. M., Cruz Filho I.J., 2021. Lignin from
872 *Morinda citrifolia* leaves: physical and chemical characterization, in vitro evaluation of
873 antioxidant, cytotoxic, antiparasitic and ultrastructural activities. Int. J. Biol. Macromol.
874 193 1799-1812 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.013>.
- 875 33. Smithers S.R., Terry R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of
876 *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. Parasitology, 55 695-700,
877 <https://doi.org/10.1017/S0031182000086248>.
- 878 34. Terrell, E., Dellon, L. D., Dufour, A., Bartolomei, E., Broadbelt, L. J., Garcia-Perez, M.,
879 2020. A Review on Lignin Liquefaction: Advanced Characterization of Structure and
880 Microkinetic Modeling. Ind Eng Chem Res. 59 (2) 526-555,
881 <https://10.1021/acs.iecr.9b0574410.1021/acs.iecr.9b05744.s001>.
- 882 35. Ullah et al., 2022. Recent advances in biological activities of lignin and emerging
883 biomedical applications: a short review. Int. J. Biol. Macromol. 208 819-832,
884 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.182>.

885 36. Vásconez-González et al., 2023. An 11-year epidemiological analysis of schistosomiasis in
886 Ecuador: Investigating a non-endemic, neglected, and challenging-to-identify parasitic disease.
887 Food Waterborne Parasitol. e00196. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2023.e00196>.

888

889

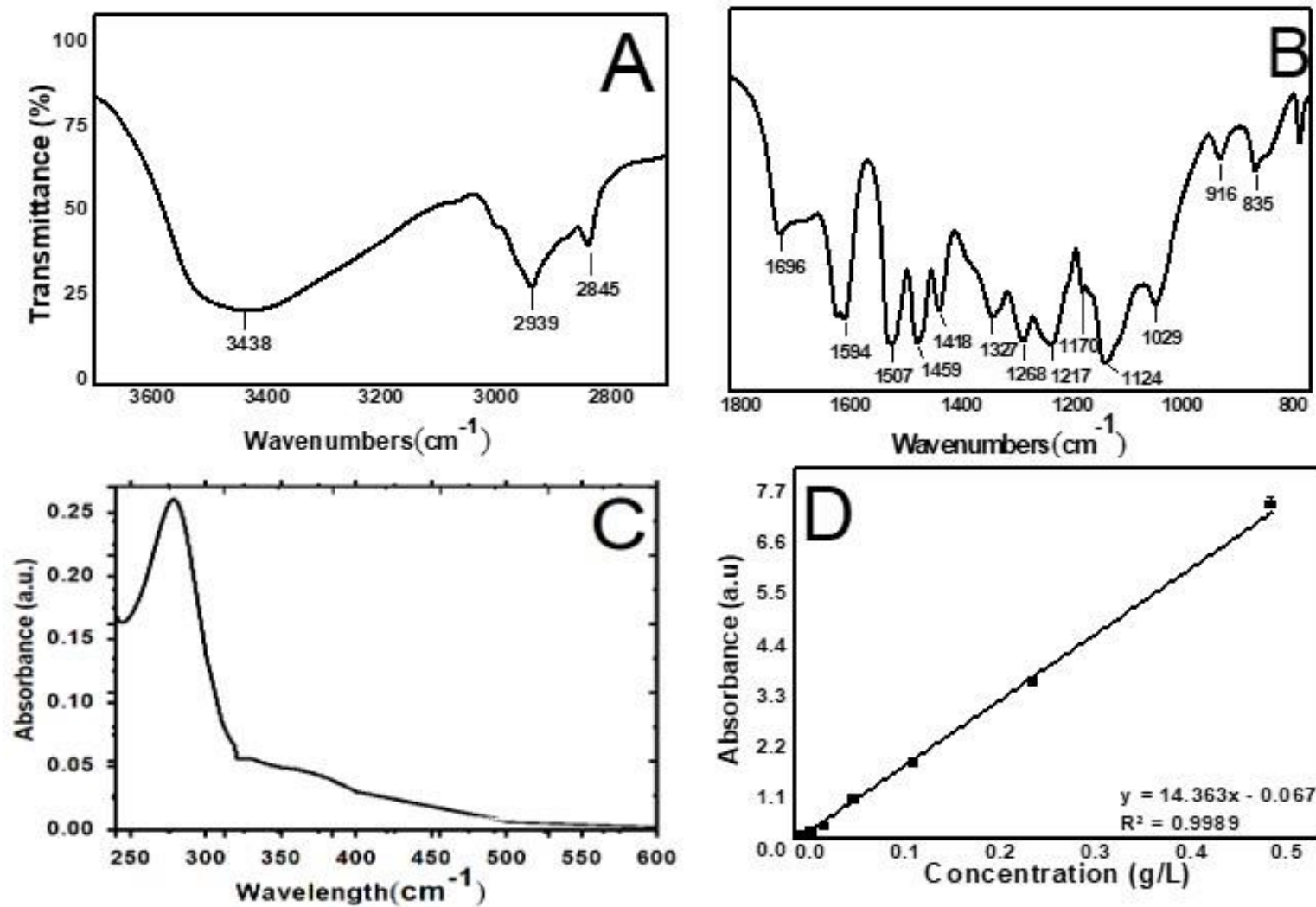
890

891

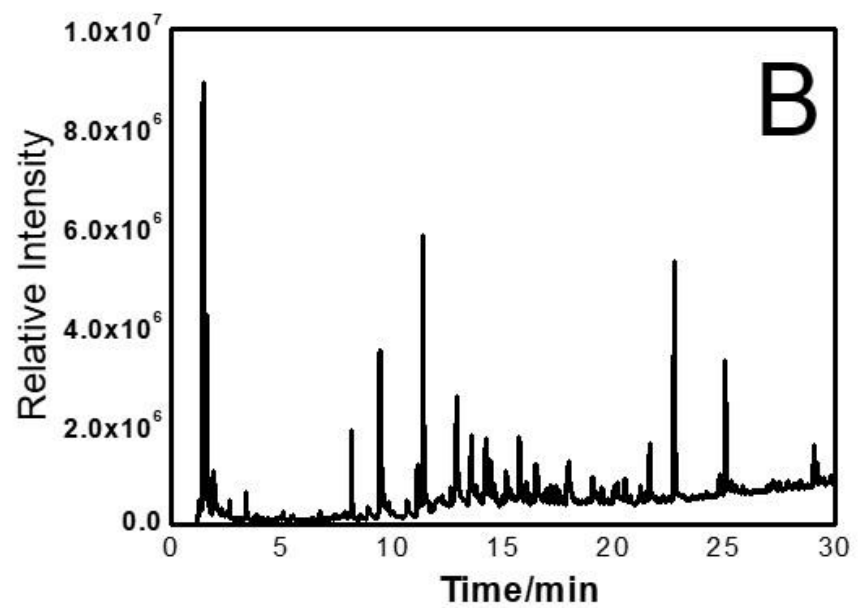
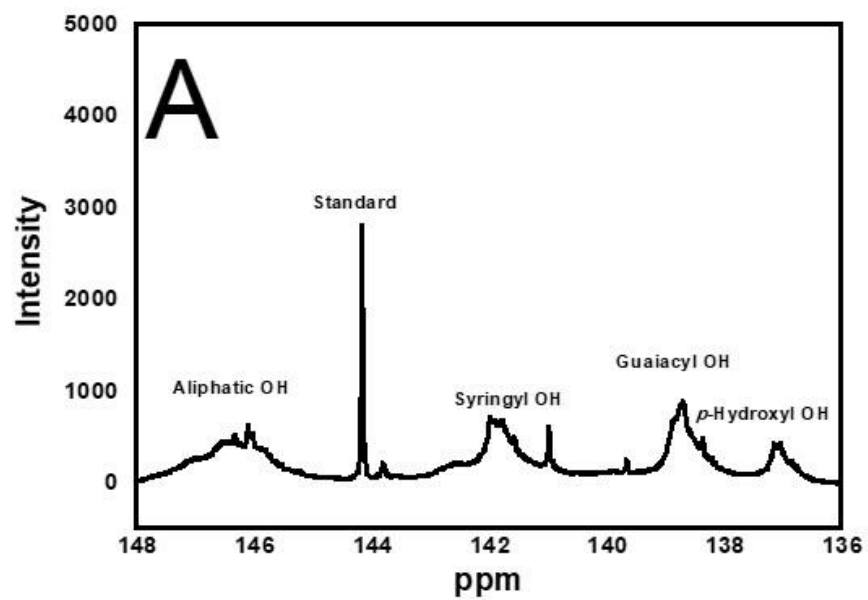
892

893

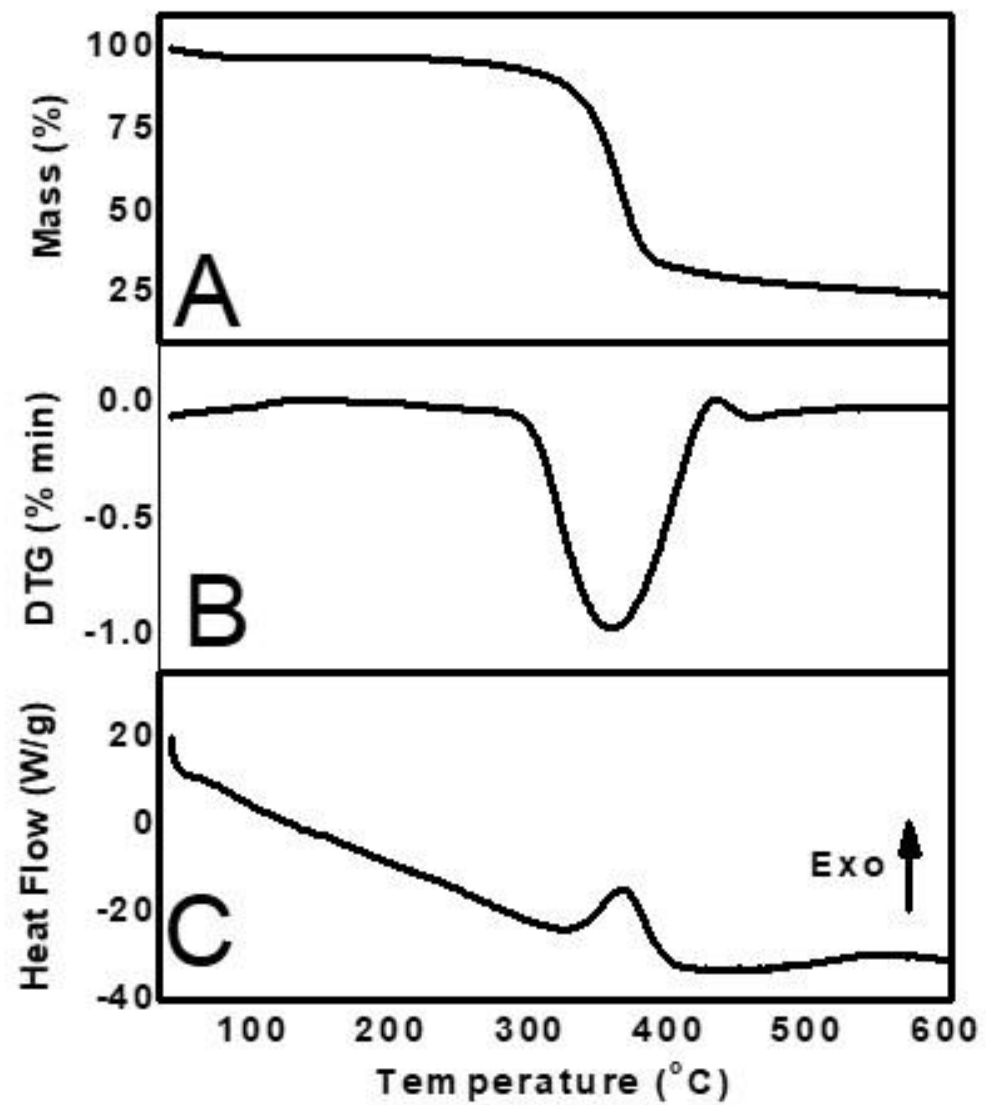
[Click here to access/download;Figure;figure 1 lignin lucas \(1\).jpg](#)



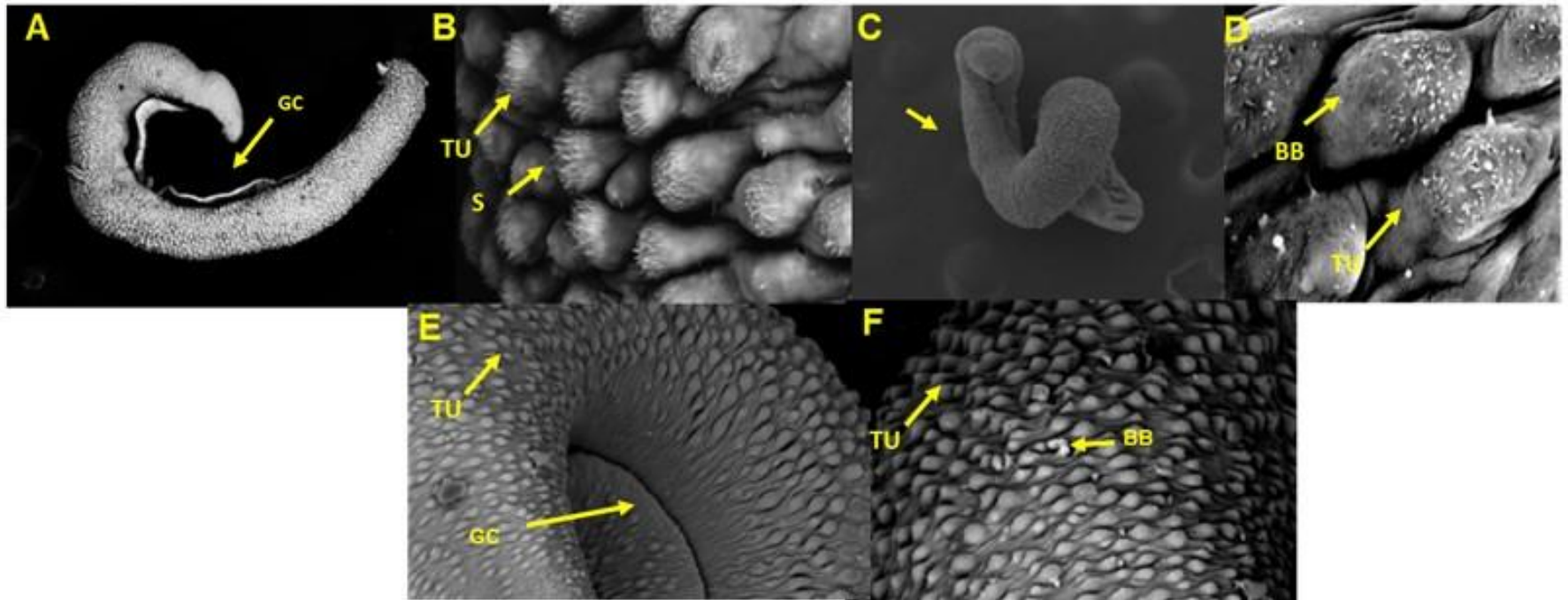
[Click here to access/download;Figure;figure 2 lignin lucas \(1\).jpg](#)



[Click here to access/download;Figure;figure 3 lignin lucas \(1\).jpg](#)



[Click here to access/download;Figure;Figure 4 lignin racemosal.tif](#)



[Click here to access/download;Figure;Figure 5 lignin racemosal.tif](#)

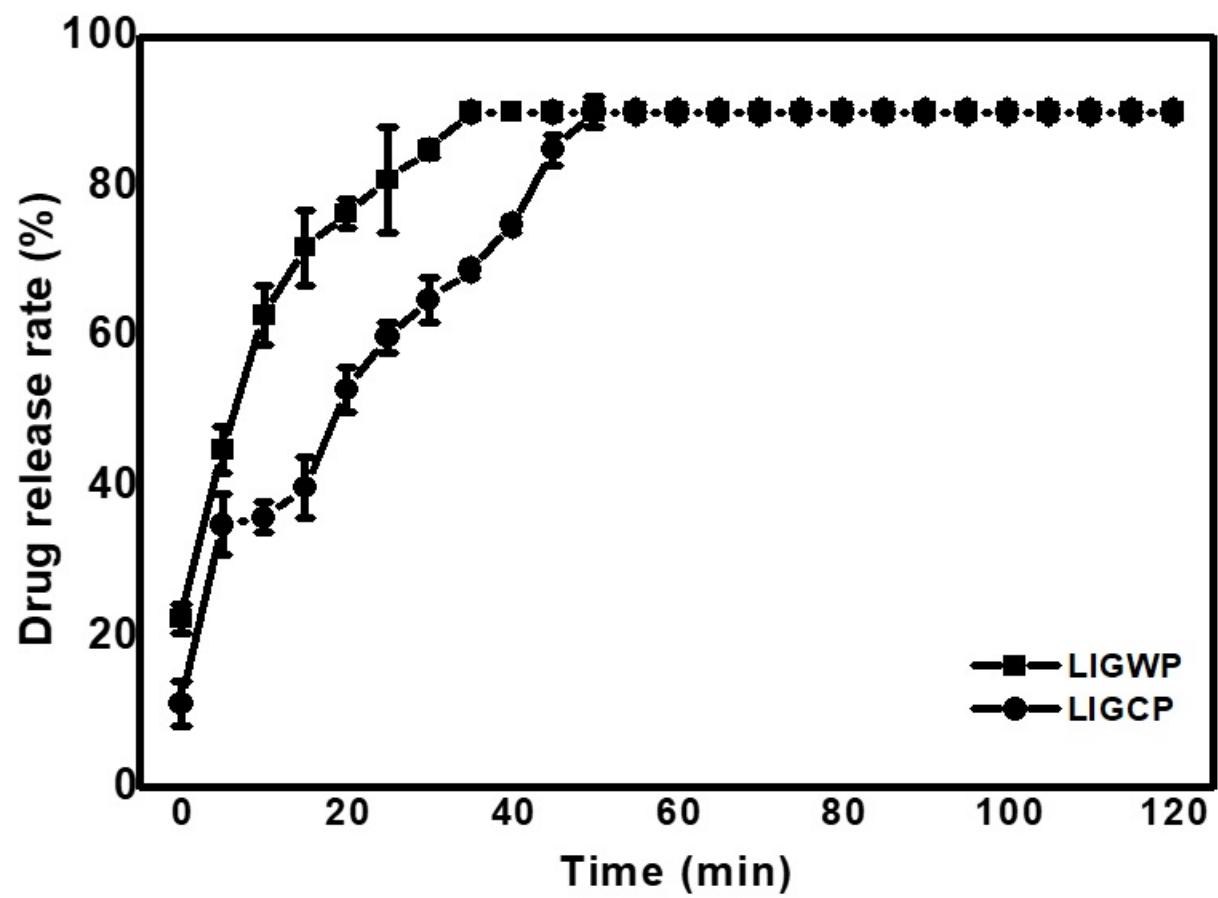


figure [Click here to access/download;Figure;lista fig 08012024; lignina c racemosa.docx](#)

Figure 1. FTIR (A and B), UV/Vis (C), and straight line for determining the extinction coefficient (D) for *Clarisia racemosa* lignin.

Figure 2. ^{31}P NMR (A) and pyrogram (B) for *Clarisia racemosa* lignin.

Figure 3. Thermal analysis TGA (A), DTG (B), and DSC (C), respectively.

Figure 4. (A-B) SEM images of adult male *S. mansoni* worms not subjected to treatment (RPMI medium + DMSO) after 24h of observation. (A) Gynecophoric canal (GC) of male worms showing no abnormalities. (B) Tubercles (TU) with spicules (S). (C-D) SEM images of adult male *S. mansoni* worms treated with praziquantel (10 μM) after 24h of observation. (C) Worm showing a contorted body (arrow). (D) Severe damage to the tegument, with the appearance of burst blisters (BU) with loss of spicules. (E-F) SEM images of adult male *S. mansoni* worms treated with lignin (500 $\mu\text{g/mL}$) after 24h of observation. (E) Preservation of the gynecophoric canal (GC) and slight muscle contraction, tubercles (TU) (F) appearance of few bubbles (BU) without causing serious damage to the tegument.

Figure 5. Praziquantel release profile from tablets with and without lignin over a period of 120 min.

Table 1. Results of analysis of the composition of untreated and treated *Clarisia racemosa* wood.

Constituents	Wood constituents without (%) *	Acid treatment H₂SO₄1% (%)	Corrected by treatment yield H₂SO₄ 1% (%)	Alkaline delignification NaOH 1% (%)	Alkaline delignification 1% NaOH (%) Corrected by 1% NaOH delignification yield (%)
Extraction yield (%)	-	-	66.7 ± 1.8	-	57.8 ± 0.5
Cellulose	40.11 ± 0.13	55.39 ± 0.3	36.95	90.3 ± 0.9	34.81
Hemicelulose	18.34 ± 0.0	2.25 ± 0.2	1.50	1.01 ± 0.0	0.39
Lignina	29.40 ± 0.21	41.30 ± 0.7	27.54	8.23 ± 0.4	3.17
Extractives	10.78 ± 0.10	-	-	-	-
Ashes	0.79 ± 0.01	0.38 ± 0.0	0.25	0.30 ± 0.01	0.12

Mean ± Deviation. * Chemical composition published by Albuquerque Nerys et al. [12]. Stone memory: acid treatment ($55.39 \times 0.667 = 36.95\%$); Delignification ($90.3 \times 0.667 \times 0.578 = 34.81\%$).

Table 2. Relative peak area distribution of the main products for *Clarisia racemosa* lignin in Py-GC/MS.

RT/min	Product compounds	Formula	Molar mass(g/mol)	Origin	Area	Relative Percentage (%)
2.31	Benzene	C ₆ H ₆	78.11	Aromatic	1.44	1.71
3.33	Toluene	C ₇ H ₈	92.14	Aromatic	4.82	5.73
5.1	Xylene	C ₈ H ₁₀	106.16	Aromatic	2.24	2.66
7.3	Phenol	C ₆ H ₆ O	94.11	H	2.2	2.62
9.1	4-methylphenol	C ₇ H ₈ O	108.14	H	3.04	3.62
9.7	Guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	124.14	G	13.76	16.37
10.8	4-ethylphenol	C ₈ H ₁₀ O	122.16	H	5.22	6.21
11.5	4-methylguaiacol	C ₈ H ₁₀ O ₂	138.16	G	11.12	13.23
11.68	catechol	C ₆ H ₆ O ₂	110.1	Catechol	0.9	1.07
12.72	3-methoxycatechol	C ₇ H ₈ O ₃	140.14	Catechol	3.46	4.12
13.11	4-ethylguaiacol	C ₉ H ₁₂ O ₂	152.19	G	9.42	11.21
13.49	4-vinylguaiacol	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.17	G	9.34	11.11
14.21	Syringe	C ₈ H ₁₀ O ₃	154.16	S	2.97	3.53
14.38	4-propylguaiacol	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166.22	G	3.85	4.58
15.9	4-(1-propenyl)-guaiacol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.20	G	2.09	2.49
16.39	Acetovanilone	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.17	G	2.71	3.23
17.11	3-acetylguaiacol	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180.20	G	0.77	0.92
18.12	4-(2-propenyl)-syringol	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194.23	S	2.77	3.30
19.01	Syringaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₄	182.17	S	1.13	1.35
19.89	4-ethanoylsyringol	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	196.20	S	0.80	0.96

G: guaiacyl units; H: *p*-hydroxyphenyl units; S: syringyl units

Table 3. Results of *in vitro* antioxidant activity promoted by lignin in a study against different assays.

Antioxidant assays	Lignin <i>C. racemosa</i>	Ascorbic acid	BHT
	IC₅₀ (µg/mL)	IC₅₀ (µg/mL)	IC₅₀ (µg/mL)
DPPH	798.0 ± 2.1	7.79 ± 0.01	18.99 ± 0.1
ABTS	345.7 ± 1.0	13.94 ± 0.8	5.31 ± 0.9
Nitric oxide (NO•)	995.6 ± 1.6	503.9 ± 1.3	67.93 ± 1.2
Hydroxyl radical (HO•)	987.2 ± 1.6	1.58 ± 0.01	2.54 ± 0.1
FRAP (iron ion reduction)	>1000	85.32 ± 0.02	7.12 ± 0.01
Iron ion reducing power	>1000	26.52 ± 0.9	9.30 ± 0.1
Phosphomolybdate	>1000	5.45 ± 0.1	8.90 ± 0.01
CUPRAC	>100	12.97 ± 0.21	9.03 ± 0.02

Table 4. Motility scores of *Schistosoma mansoni* adult worms incubated with Lignin.

<i>Grups</i>	24 h				48 h				72 h				96 h				120 h			
	Motility Score (%)																			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
<i>Control</i>	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
<i>PZQ</i> 10µM	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-
Lignin																				
500 µg/mL	-	50	50	-	-	75	25	-	5	70	35	-	10	50	40	-	15	60	35	-
250 µg/mL	-	20	80	-	-	20	80	-	-	87	13	-	-	87	13	-	-	80	20	-
125 µg/mL	-	5	95	-	-	10	90	-	-	10	90	-	-	10	90	-	-	10	90	-

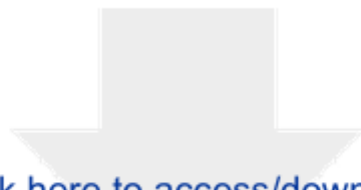
Table 5. Characterization parameters for tablets with and without lignin as excipient respectively.

Parameters	LIGWP	LIGCP
Average weight (mg)	500 ± 0.5	500 ± 0.1
Hardness (kgf/cm ⁻²)	4.5 ± 0.9	5.3 ± 0.4
Thickness (mm)	3.85 ± 0.01	3.99± 0.03
Diameter (mm)	10.09 ± 0.03	10.11± 0.1
Uniformity (%)	99.6 ± 0.49	99.5 ± 0.34
Friability (%)	0.18 ± 0.0	0.93± 0.02
Disintegration time (min)	36.0 ± 0.1	40.1 ± 0.41

Mean ± Standard deviation

LIGWP: lignin-free tablet with praziquantel;

LIGCO: lignin tablet containing Praziquantel



Click here to access/download
Supplementary Material
material suplementar lignina08012025.docx



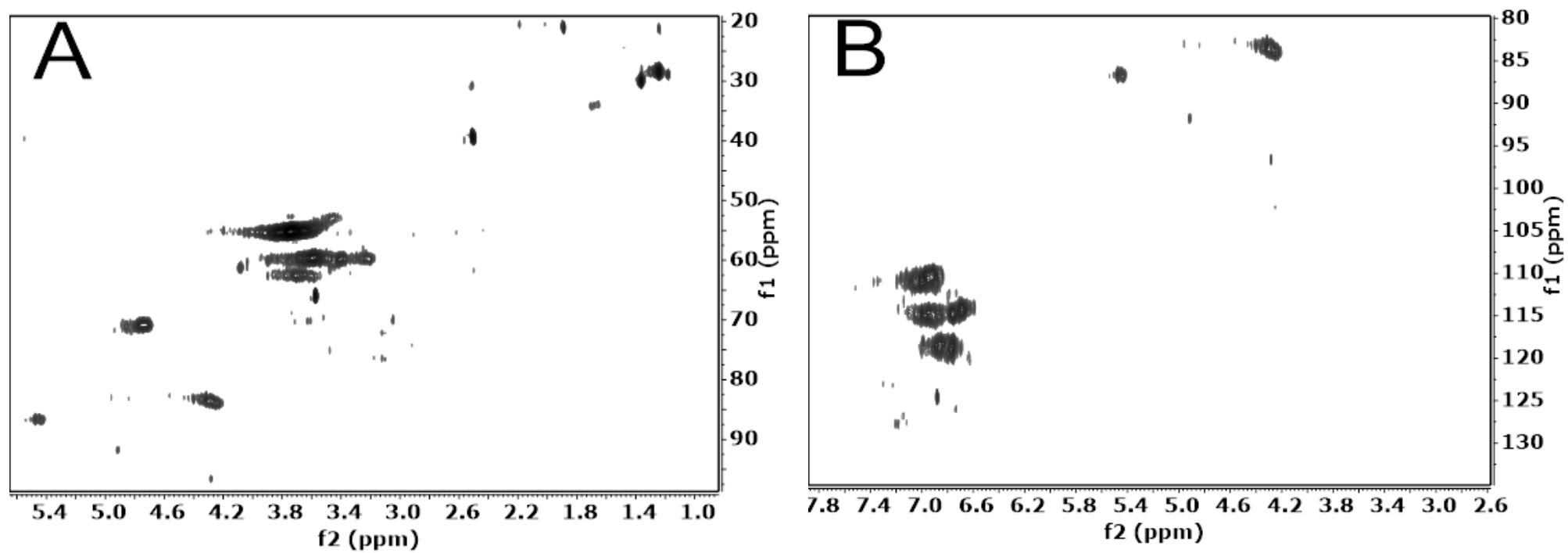


Figure S1. 2D-HSQC spectrum of *Clarisia racemosa* lignin.

Table S1. Substructure assignment signals from the 2D-HSQC spectrum of *Clarisia racemosa* lignin.

Labels	δ_C/δ_H	Assignment
Lignin structure		
DMSO	39.51/2.50	Dimethyl sulfoxide.
-OCH ₃ (OMe)	59.9/3.54	C-H in methoxyls.
A α (G)	72.3/4.71	C α -H α in β -aryl ether acetylated.
A β (G)	83.9/4.31	C β -H β in β -O-4 substructures linked to a G unit.
A β (S)	86.0/4.11	C β -H β in β -O-4 substructures linked to a S unit (A).
G ₂	111.4/6.81	C ₂ -H ₂ in guaiacyl units (G)
G ₅	114.4/6.73	C ₅ -H ₅ in guaiacyl units (G)
PCE _{3,5}	115.5/6.76	C _{3,5} -H _{3,5} in <i>p</i> -coumarate
G ₆	118.0/6.75	C ₆ -H ₆ in guaiacyl units (G)
H _{2,6}	125.3/6.88	C _{2,6} -H _{2,6} in <i>p</i> -hydroxyphenyl units (H)

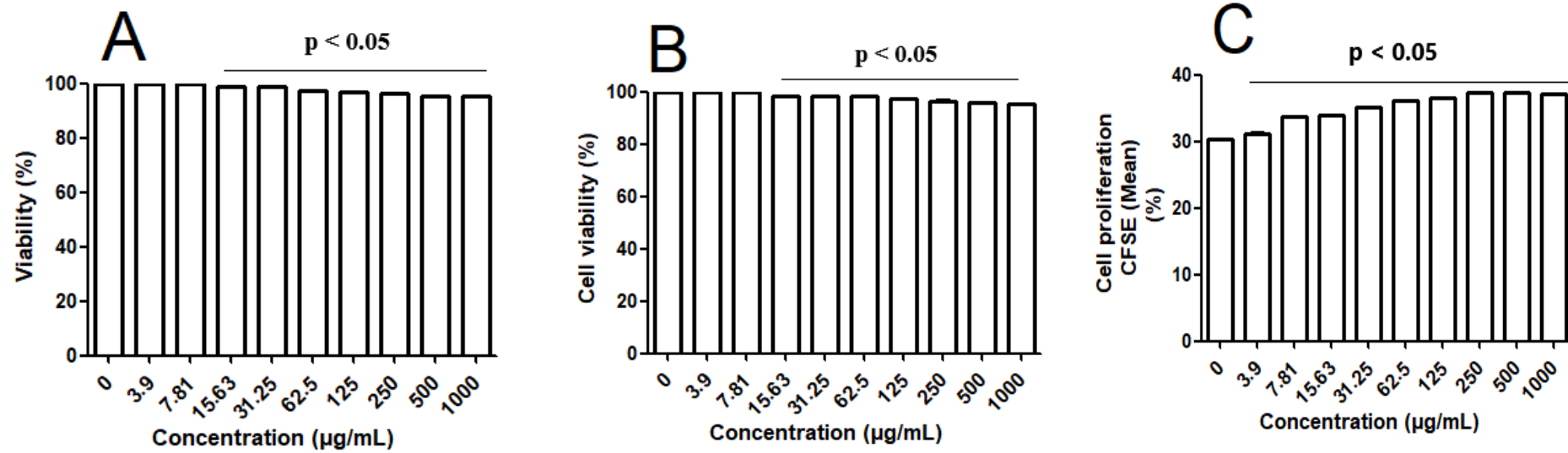


Figure S2. Evaluation of cell death induced by lignin using propidium iodide (A) and annexin V (B), as well as the analysis of the proliferation index of mouse splenocytes by CFSE staining (C) after 24 h, respectively. The horizontal bars represent the mean of experiments performed in quintuplicate. The results are presented as mean \pm standard deviation.

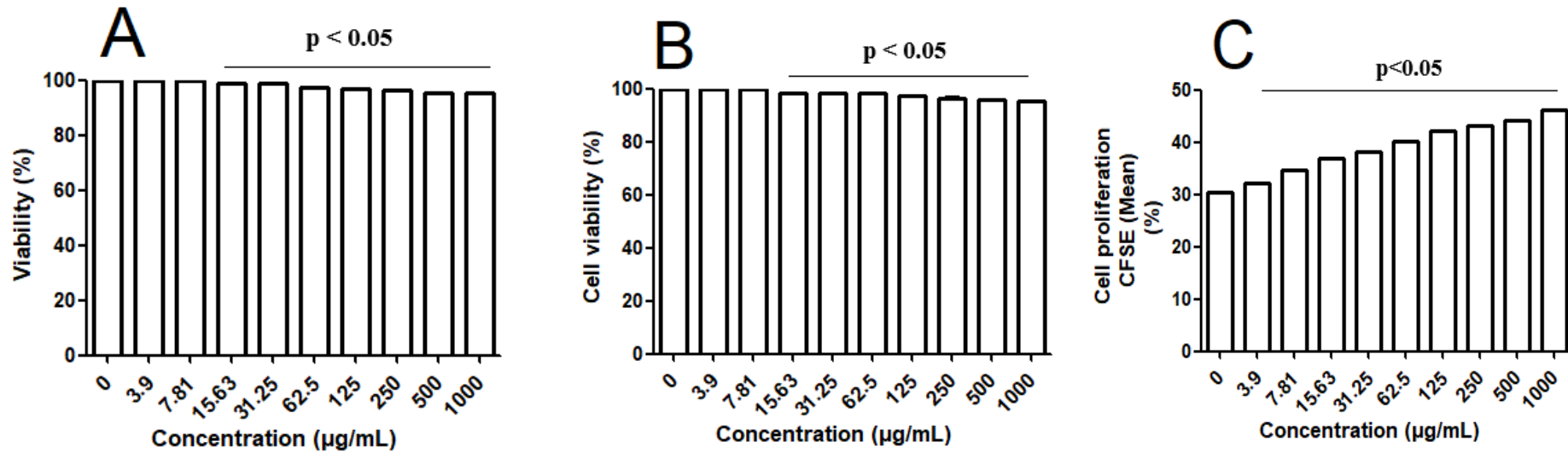


Figure S3. Evaluation of cell death induced by lignin using propidium iodide (A) and annexin V (B), as well as the analysis of the proliferation index of mouse splenocytes by CFSE staining (C) after 48 h, respectively. The horizontal bars represent the mean of experiments performed in quintuplicate. The results are presented as mean \pm standard deviation.

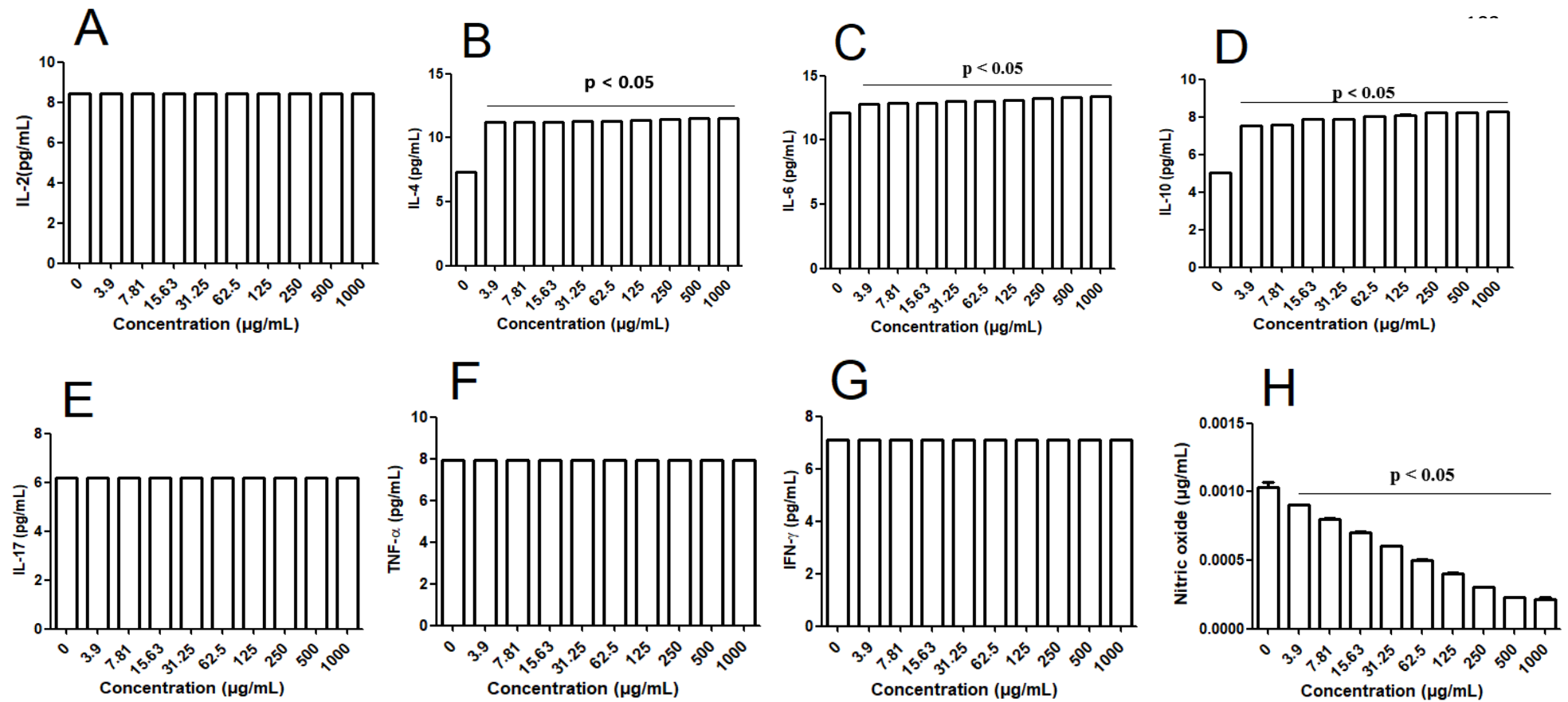


Figure S4. Concentrations of IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-17 (E), TNF- α (F), IFN- γ (G), and nitric oxide (H) for cells induced by lignin for 24 h, respectively. The horizontal bars represent the mean of experiments performed in quintuplicate. Results are presented as mean \pm standard deviation.

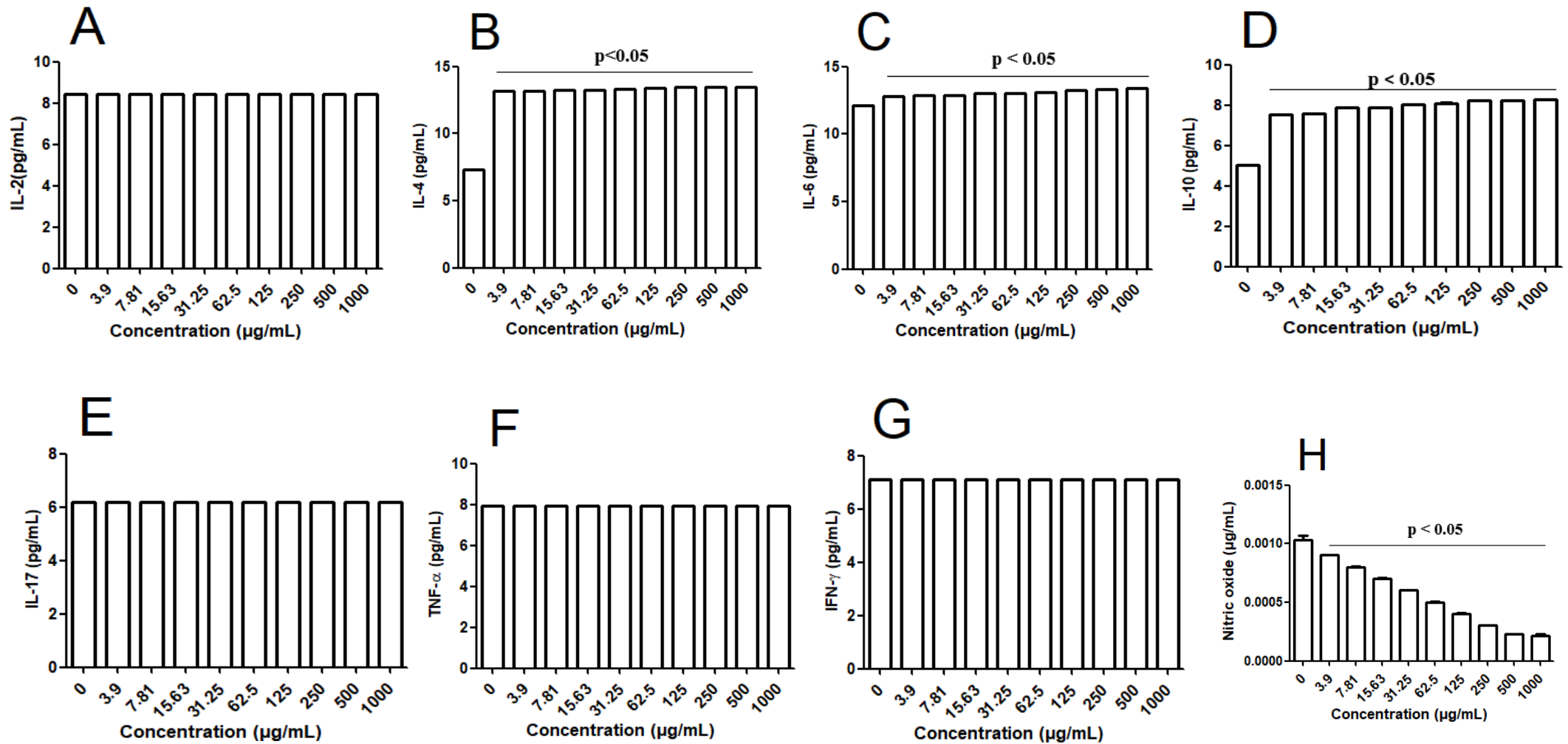


Figure S5. Concentrations of IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-17 (E), TNF- α (F), IFN- γ (G), and nitric oxide (H) for cells induced by lignin for 48 h, respectively. The horizontal bars represent the mean of experiments performed in quintuplicate. Results are presented as mean \pm standard deviation.

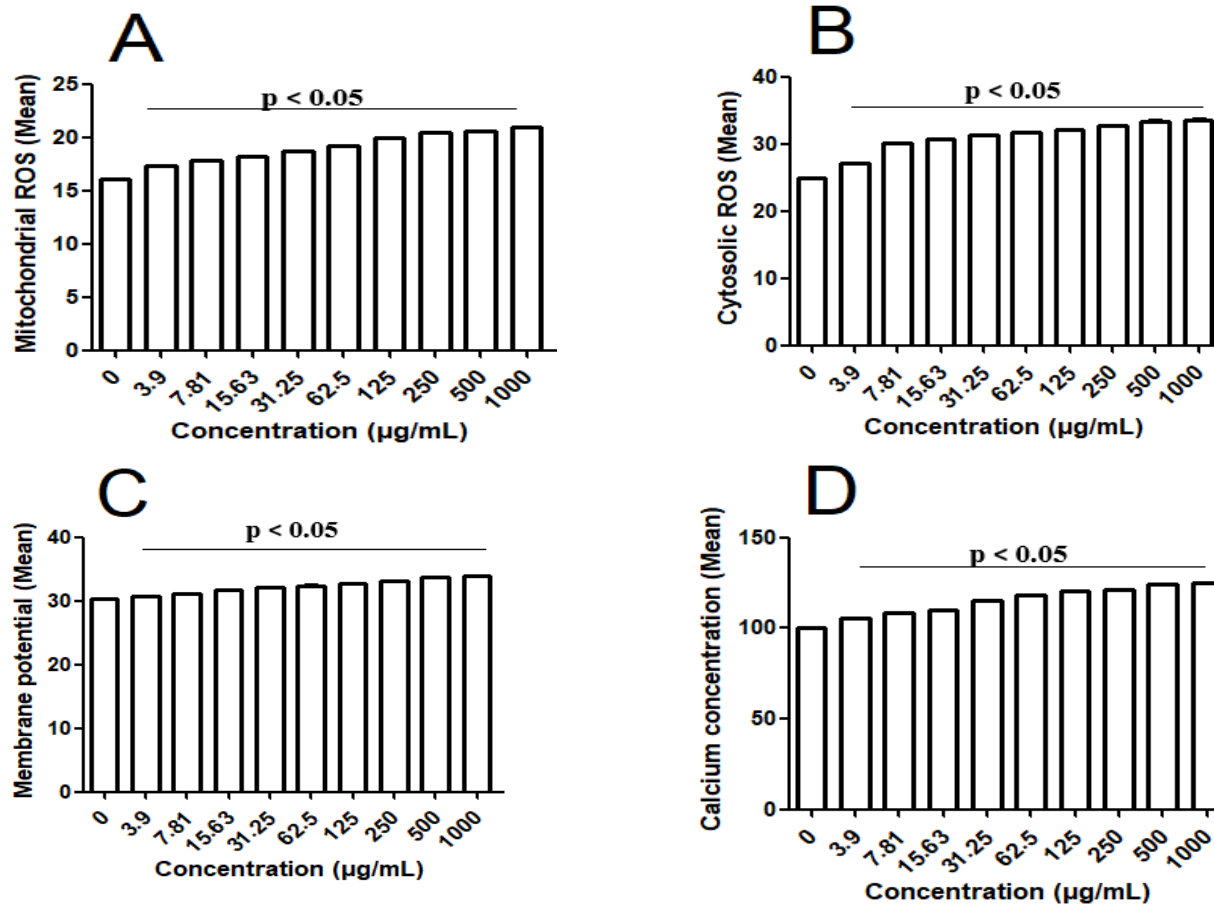


Figure S6. Measurement of oxidative stress induced by lignin in mouse splenocyte cultures after 24 h of assay. Mitochondrial (A) and cytosolic (B) ROS levels, mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$ (C), and cytosolic calcium concentration (D) were evaluated. The horizontal bars represent the mean of experiments performed in quintuplicate. Results are expressed as mean \pm standard deviation.

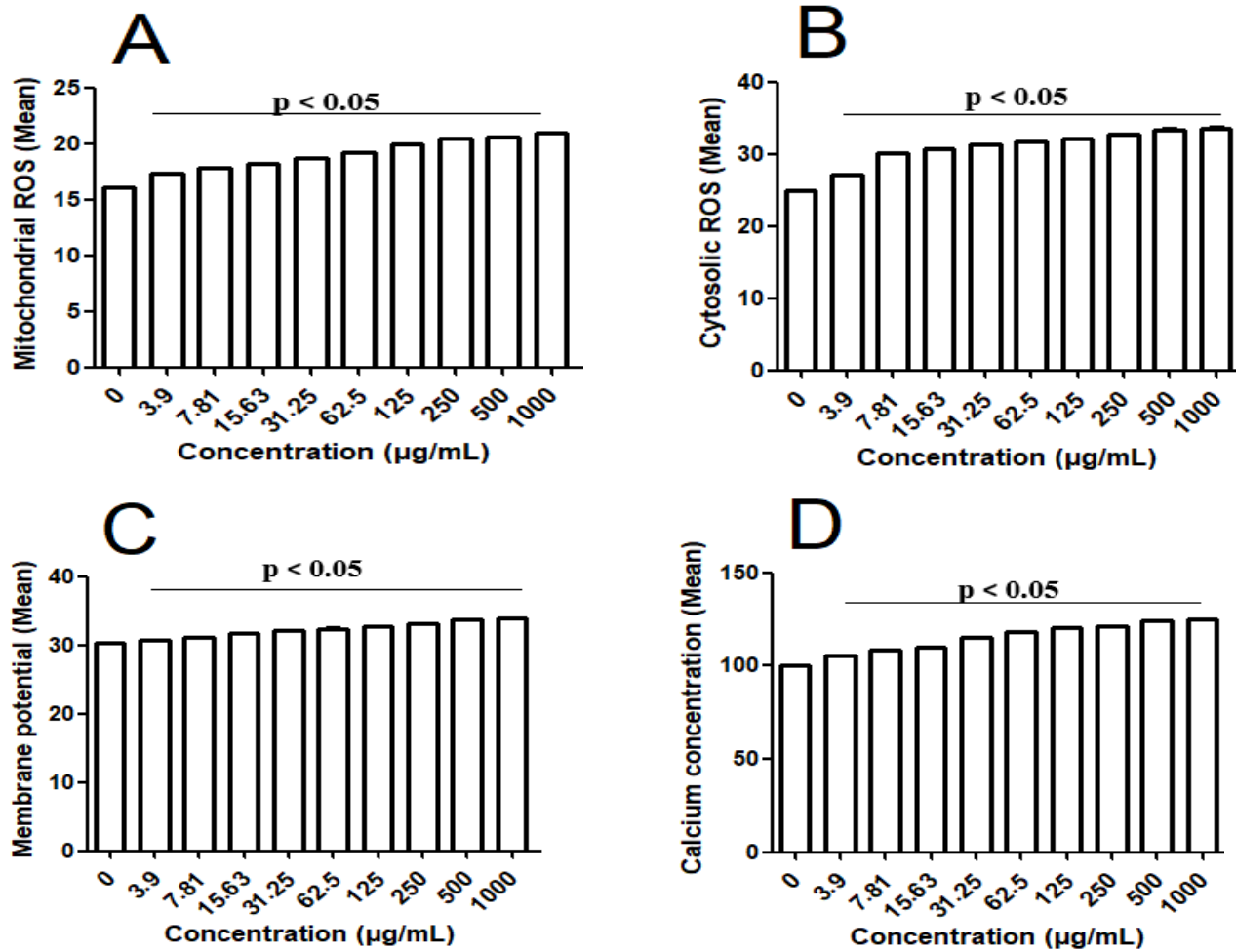
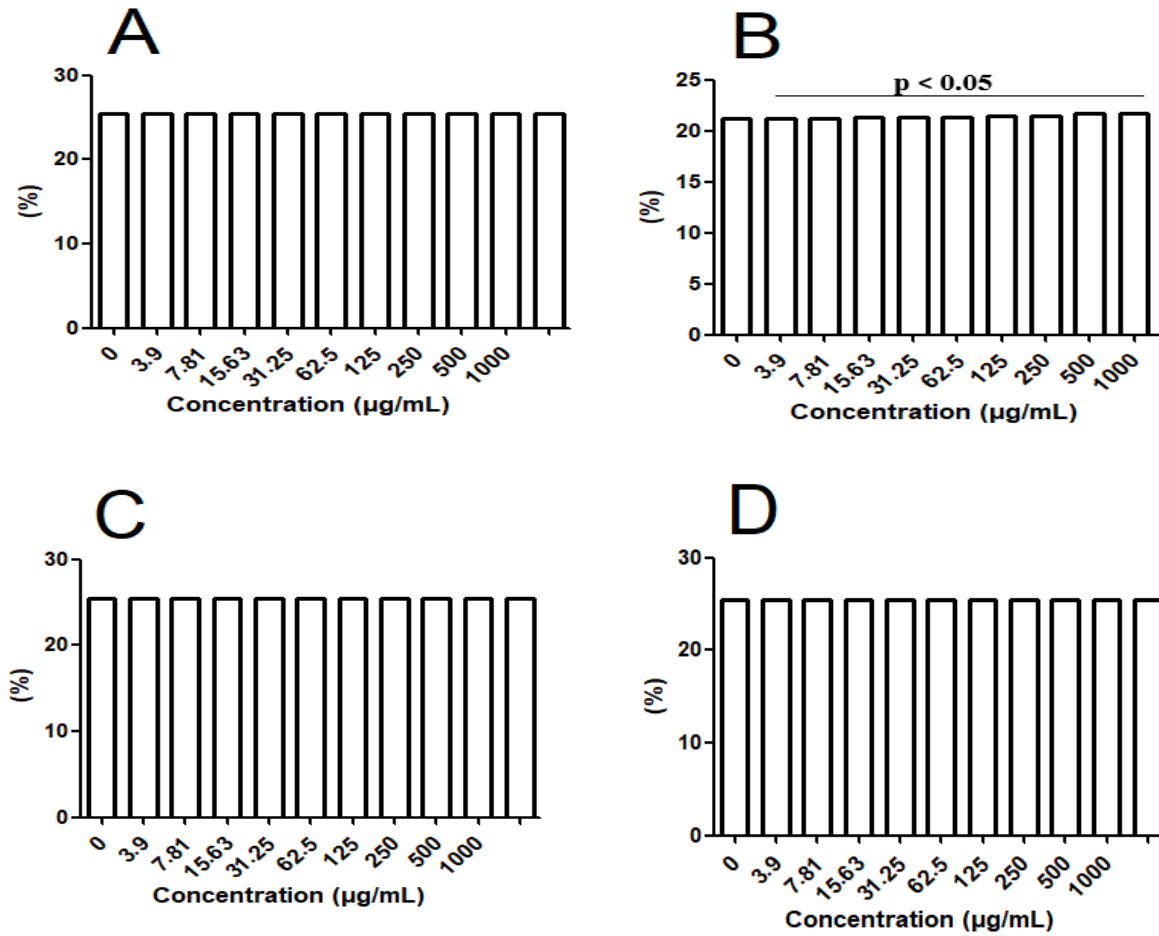


Figure S7. Measurement of oxidative stress induced by lignin in mouse splenocyte cultures after 48 h of assay. Mitochondrial (A) and cytosolic (B) ROS levels, mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$ (C), and cytosolic calcium concentration (D) were evaluated. The horizontal bars represent the mean of experiments performed in quintuplicate. Results are expressed as mean \pm standard deviation.



S8. Immunophenotyping of CD4⁺ T lymphocytes (A), CD8⁺ T lymphocytes (B), CD16⁺ lymphocytes (C), and CD16⁺ monocytes (D) in cultures treated with lignin for 24 h, respectively. The horizontal bars represent the mean of experiments performed in quintuplicate. Results are presented as mean \pm standard deviation.

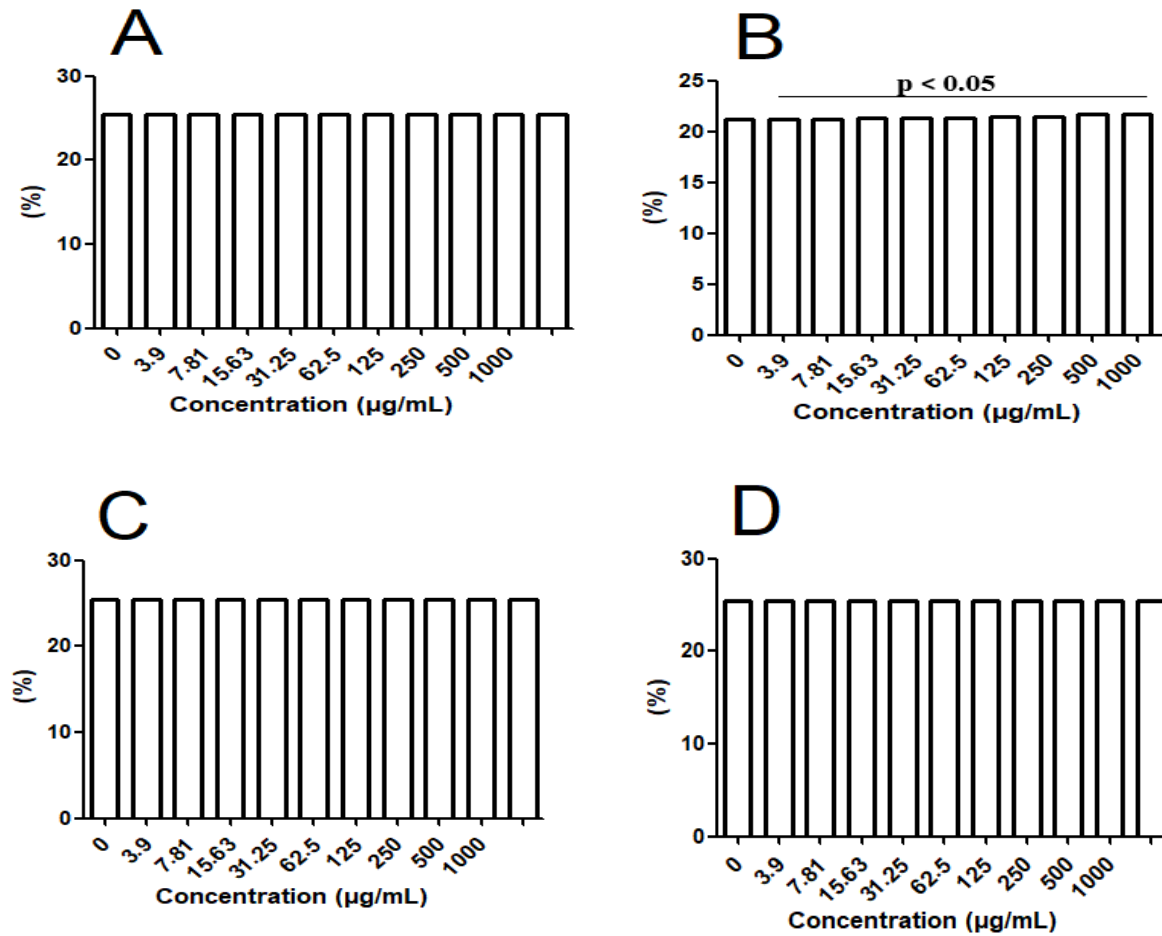


Figure S9. Immunophenotyping of CD4+ T lymphocytes (A), CD8+ T lymphocytes (B), CD16+ lymphocytes (C), and CD16+ monocytes (D) in cultures treated with lignin for 48 h, respectively. The horizontal bars represent the mean of experiments performed in quintuplicate. Results are presented as mean \pm standard deviation.

6. CONCLUSÃO DA DISSERTAÇÃO

- De acordo com os resultados de caracterização físico-química e fitoquímica a lignina é do tipo GSH, indicativo de grupos fenólicos não condensados na estrutura macromolecular. Estruturas fenólicas conjugadas, particularmente aquelas contendo grupos funcionais -CH=CHCOOH. A lignina contém maior proporção de unidades guaiacil (G) (65,41%), seguidas de siringil (14,25%) e p-hidroxifenil (20,34%) e exibiu conteúdo fenólico de 274,3 mg GAE/g.
- A lignina de *C. racemosa* exibiu capacidade antioxidante nos ensaios de DPPH, ABTS, óxido nítrico e testes de eliminação de radicais hidroxila; com destaque para ensaio ABTS, mas mostrou baixa eficácia na redução de íons metálicos.
- Sobre esplenocitos, a lignina não apresentou efeitos citotóxicos com viabilidade maior que 95% nos ensaios para necrose e apoptose, além de ter aumentado a proliferação celular em todas as concentrações. Ademais, a lignina apresentou baixa citotoxicidade sobre fibroblastos V79, células Vero, macrófagos J774 e células HepG2.
- A lignina foi classificada como um agente não hemolítico, com valores de hemólise abaixo de 5%.
- A lignina aumentou a produção de IL-4 e IL-10 e reduziu o NO, indicativo de uma resposta imune anti-inflamatória Th2. A lignina estimulou parâmetros de estresse oxidativo com ROS citosólico e mitocondrial, elevou os níveis de cálcio citosólico e o potencial da membrana mitocondrial. Além, disto lignina aumentou a população de linfócitos CD8+, sem alterar a populações de células T CD4+, células CD16+ ou monócitos CD16+.
- A lignina causou o desacasalamento de vermes *Schistosoma mansoni* adultos e paralisia de machos e fêmeas, seguido por mortalidade (500 µg/mL) de 65% após 120h e alterações tegumentares.
- Comprimidos de lignina com PZQ apresentaram melhora nos parâmetros incluindo a dureza e maior percental na friabilidade e no tempo de desintegração.

REFERENCIAS DA DISSERTAÇÃO

1. AGNES, K. N. K.; BOEFF, D. D.; DE OLIVEIRA CARVALHO, L.; KONRATH, E. L. Ethnobotanical knowledge on native Brazilian medicinal plants traditionally used as anthelmintic agents – A review. *Experimental Parasitology*, 108531, 2023.
2. AGUSTIANY, E. A. et al. Recent developments in lignin modification and its application in lignin-based green composites: a review. *Polymer Composites*, v. 43, p. 4848–4865, 2022.
3. ALBUQUERQUE NERYS, L. L. et al. Photoprotective, biological activities and chemical composition of the non-toxic hydroalcoholic extract of *Clarisia racemosa* with cosmetic and pharmaceutical applications. *Industrial Crops and Products*, v. 180, p. 114762, 2022.
4. AMIEVA, E.; POLA, L.; COLLADO, S.; OULEGO, P.; CALVO, P. Á.; DÍAZ, M. Understanding the relationship between acid precipitation and lignin odor in Kraft Black liquor. *Cleaner Chemical Engineering*, v. 11, 100143, 2025.
5. ANTONELLI, A. et al. Geological and climatic influences on mountain biodiversity. *Nature Geoscience*, v. 11, n. 10, p. 718-725, 2018.
6. ANTUNES, C.; ARBO, M. D.; KONRATH, E. L. Hepatoprotective native plants documented in Brazilian traditional medicine literature: Current knowledge and prospects. *Chemistry & Biodiversity*, v. 19, n. 6, e202100933, 2022.
7. ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP – APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, p. 1–20, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/boj.v12385>
8. ARIYANTA, H. A. et al. Current roles of lignin for the agroindustry: Applications, challenges, and opportunities. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 240, p. 124523, 2023.
9. ARRUDA, M. D. M. et al. Characterization of a lignin from *Crataeva tapia* leaves and potential applications in medicinal and cosmetic formulations. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 180, p. 286-298, 2021.
10. ARAÚJO, D. M. F. et al. Biological activities and physicochemical characterization of alkaline lignins obtained from branches and leaves of *Buchena viavidiflora* with potential pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 219, p. 224-245, 2022.
11. ASNER, G. P. et al. Spectroscopy of canopy chemicals in humid tropical forests. *Remote Sensing of Environment*, v. 115, n. 12, p. 3587-3598, 2011.
12. ASNER, G. P. et al. Functional and biological diversity of foliar spectra in tree canopies throughout the Andes to Amazon region. *New Phytologist*, v. 204, n. 1, p. 127-139, 2014.
13. ASNER, G. P. et al. Quantifying forest canopy traits: Imaging spectroscopy versus field survey. *Remote Sensing of Environment*, v. 158, p. 15-27, 2015.
14. AZADFAR, M.; GAO, A. H.; BULE, M. V.; CHEN, S. Structural characterization of lignin: a potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 75, p. 58-66, 2015.
15. AZEVEDO, M. M. B. et al. *Croton cajucara* essential oil nanoemulsion and its antifungal activities. *Processes*, v. 9, n. 11, p. 1872, 2021.

16. CANTERAL, K. F. F.; DIAS, Y. N.; FERNANDES, A. R. Biochars from agro-industrial residues of the Amazon: an ecological alternative to enhance the use of phosphorus in agriculture. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 25, n. 4, p. 1119-1132, 2023.
17. CHIO, C.; SAIN, M.; QIN, W. Lignin utilization: a review of lignin depolymerization from various aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 107, p. 232–249, 2019.
18. CHUDNOFF, M. *Tropical timbers of the world*. Madison, USA: United States Forest Products Laboratory, Forest Service and United States Department of Agriculture, 1979. 831 p.
19. CHURA, S. S. D. et al. Red sacaca essential oil-loaded nanostructured lipid carriers optimized by factorial design: cytotoxicity and cellular reactive oxygen species levels. *Frontiers in Pharmacology*, v. 14, 1176629, 2023. DOI: 10.3389/fphar.2023.1176629.
20. COSTA, M. P. da et al. A review of the biologic activities of trans-dehydrocrotonin, a natural product obtained from *Croton cajucara*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 275-286, 2007.
21. CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.
22. DAÏNOU, K.; MAHY, G.; DUMINIL, J. et al. Speciation slowing down in widespread and long-living tree taxa: insights from the tropical timber tree genus *Milicia* (Moraceae). *Heredity*, v. 113, p. 74–85, 2014.
23. DA CRUZ FILHO, I. J. et al. Lignins isolated from prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 123, p. 1331-1339, 2019.
24. DA CRUZ FILHO, I. J. et al. Evaluation of the hydroalcoholic extract of *Clarisia racemosa* as an antiparasitic agent: an in vitro approach. *3 Biotech*, v. 13, n. 12, p. 391, 2023.
25. DA CRUZ FILHO, I. J. et al. Alkaline lignins from *Morinda citrifolia* leaves are potential immunomodulatory, antitumor, and antimicrobial agents. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 95, e20221026, 2023.
26. DA SILVA LIMA, L. et al. Biological potential of alkaline lignins: A brief review. *Scientific Electronic Archives*, v. 17, n. 4, 2024.
27. DE FREITAS, F. et al. Native accumulator plants with a differential mercury phytoremediation potential in a region in Southern Amazon. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 31, n. 54, p. 63120-63135, 2024.
28. DE QUEIROZ, J. C. E.; LEITE, J. R. S.; VASCONCELOS, A. G. Prospecting plant extracts and bioactive molecules with antimicrobial activity in Brazilian biomes: a review. *Antibiotics*, v. 12, n. 3, p. 427, 2023.
29. DIZHBITE, T.; TELYSHVA, G.; JURKJANE, V.; VIESTURS, U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins – natural antioxidants. *Bioresource Technology*, v. 95, n. 3, p. 309-317, 2004.
30. FERNANDES, A. D. S. et al. In vitro chemopreventive and cytotoxic effects of Amazon mosses *Leucobryum martianum* (Hornsch.) and *Leucobryum laevifolium* (Broth) extracts. *Mutagenesis*, v. 39, n. 1, p. 56-68, 2024.
31. FIGUEIREDO, P. et al. Properties and chemical modifications of lignin: towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*, v. 93, p. 233-269, 2018.

32. FINE, P. V. A. et al. Exploring the links between secondary metabolites and leaf spectral reflectance in a diverse genus of Amazonian trees. *Ecosphere*, v. 12, n. 2, e03362, 2021.
33. FUNAOKA, M.; MATSUBARA, M.; SEKI, N.; FUKATSU, S. Conversion of native lignin to a highly phenolic functional polymer and its separation from lignocellulosics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 46, p. 545–552, 1995.
34. GIL-CHÁVEZ, J. et al. Application of aquasolv lignin in ibuprofen-loaded pharmaceutical formulations obtained via direct compression and wet granulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 174, p. 229-239, 2021.
35. HATAKEYAMA, H.; HATAKEYAMA, T. Lignin structure, properties, and applications. In: *Biopolymers*. Springer, 2009. p. 1–63.
36. HU, J.; ZHANG, Q.; LEE, D.-J. Kraft lignin biorefinery: a perspective. *Bioresource Technology*, v. 247, p. 1181-1183, 2018.
37. HUANG, M. et al. Recovery of Kraft lignin from industrial black liquor for a sustainable production of value-added light aromatics by the tandem catalytic pyrolysis. *Journal of Cleaner Production*, 2024. Artigo 141388.
38. INGA, P. R.; CASTILLO, M. U. Características físico-químicas de la madera y carbón de once especies forestales de la Amazonia Peruana. *Revista Forestal del Perú*, v. 14, n. 2, 2016.
39. KAI, D. et al. Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chemistry*, v. 18, n. 5, p. 1175-1200, 2016.
40. JOLY, B. *Botânica – Introdução a Taxonomia Vegetal*. 12. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1998. 777 p.
41. JÚNIOR, L. C. et al. Resistência da madeira tropical ao cupim de madeira seca das Índias Ocidentais *Cryptotermes brevis*: Se os cupins não conseguem mastigar. *Ciência do Manejo de Pragas*, v. 74, n. 4, p. 914-924, 2018.
42. LANJOUW, J.; ROSSBERG, G. Studies in Moraceae III. Additional notes on the genus *Clarisia* Ruiz et Pavon emend. Lanj. *Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais*, v. XXXIII, p. 716-718, 1936.
43. LI, C.; ZHAO, X.; WANG, A.; HUBER, G. W.; ZHANG, T. Catalytic transformation of lignin for the production of chemicals and fuels. *Chemical Reviews*, v. 115, p. 11559–11624, 2015.
44. LIMA, L. M.; PEDROZA, L. S.; OSÓRIO, M. I. C.; SOUZA, J. C.; NUNEZ, C. V. Phytotoxicity of plant extracts of *Vismia japurensis* cultivated in vivo and in vitro. *Brazilian Journal of Biology*, v. 82, e235475, 2021.
45. LIU, R. et al. Micro e nanomateriais baseados em lignina e seus compósitos em aplicações biomédicas. *ChemSusChem*, v. 13, n. 17, p. 4266–4283, 2020.
46. LU, X.; GU, X. A review on lignin-based epoxy resins: lignin effects on their synthesis and properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 229, p. 778–790, 2023.
47. MALHI, Y. et al. Climate change, deforestation, and the fate of the Amazon. *Science*, v. 319, n. 5860, p. 169–172, 2008.
48. MARTINS, R. M. G. et al. Impact on cholinesterase-inhibition and in silico investigations of sesquiterpenoids from Amazonian *Siparuna guianensis* Aubl. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 252, p. 119511, 2021.

49. MAUÉS, L. A. L. et al. Flavonoids from the Amazon plant *Brosimum acutifolium* induce C6 glioma cell line apoptosis by disrupting mitochondrial membrane potential and reducing AKT phosphorylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 113, 108728, 2019.
50. MELO, L. T. G. Estudo químico e avaliação citotóxica de extratos e frações de *Clarisia racemosa* (Moraceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2015. 14 p.
51. NAIR, N.; YADAV, S.; BIHAREE, A.; PRATHAP, V. M.; MAJEED, J. Updated Ethnobotanical Notes, Phytochemistry and Phytopharmacology of Plants Belonging to the Genus *Morus* (Family: Moraceae). *Phytomedicine Plus*, v. 2, 100120, 2021.
52. PANTOJA, K. R. P. et al. Bioactive phenolic compounds and biological activities of mururé bark (*Brosimum acutifolium*), a natural antioxidant. 2023.
53. PIRES DE SOUZA JÚNIOR, P. R. et al. Antimicrobial activity of Amazon medicinal plants. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, v. 45, 2023.
54. PISHNAMAZI, M. et al. Effect of lignin on the release rate of acetylsalicylic acid tablets. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 124, p. 354–359, 2019.
55. POLA, L.; COLLADO, S.; OULEGO, P.; DÍAZ, M. Kraft black liquor as a renewable source of value-added chemicals. *Chemical Engineering Journal*, v. 448, 2022.
56. REIS, J. S. et al. Combustion properties of potential Amazon biomass waste for use as fuel. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 138, p. 3535–3539, 2019.
57. RICHARDS, L. A. et al. Phytochemical diversity drives plant–insect community diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 35, p. 10973–10978, 2015.
58. RICHARDS, L. A. et al. Phytochemical diversity and synergistic effects on herbivores. *Phytochemistry Reviews*, v. 15, p. 1153–1166, 2016.
59. RIDHO, M. R. et al. Lignin as green filler in polymer composites: development methods, characteristics, and potential applications. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2022.
60. SALAZAR, M. A. R. et al. Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 138, p. 36–45, 2018.
61. SANTANA, R. C. et al. In vitro leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of *Protium* (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 259, p. 112981, 2020.
62. SANTOS, B. A.; CAMARGO, J. L. C.; FERRAZ, I. D. K. Guariúba, *Clarisia racemosa* Ruiz e Pav. Moraceae. *Manual de sementes da Amazônia*, fascículo 7, INPA, Manaus-AM, Brasil, 2008.
63. SANTOS, H. P. D. Estudo dos componentes químicos de três madeiras amazônicas espécies. *IV Congresso de Iniciação Científica do INPA – CONIC*, 2015.
64. SANTOS, D. K. D. et al. Immunostimulatory and antioxidant activities of a lignin isolated from *Conocarpus erectus* leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 150, p. 169–177, 2020.
65. SCHOENHERR, S.; EBRAHIMI, M.; CZERMAK, P. Processos de degradação de lignina e purificação de produtos valiosos. *Lignina - Tendências e Aplicações*, 2018.

66. SILVA, P. R. et al. Lignin from *Morinda citrifolia* leaves: Physical and chemical characterization, in vitro evaluation of antioxidant, cytotoxic, antiparasitic and ultrastructural activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 193, p. 1799-1812, 2021.
67. SILVA-SOUZA, K. J. P.; SOUZA, A. F. Woody plant subregions of the Amazon forest. *Journal of Ecology*, v. 108, n. 6, p. 2321-2335, 2020.
68. SLUITER, J. B. et al. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 16, p. 9043-9053, 2010.
69. SOUZA DE MELO; DA SILVA ABREU. Avaliação da atividade antimicrobiana das espécies *Brosimum rubescens*, *Clarisia racemosa*, *Dipteryx odorata*. Apresentação de Trabalho/Congresso, 2014.
70. SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.
71. STRAITS RESEARCH. Lignin Products Market Size, Share & Analysis 2031. 2022. Disponível em: <https://straitsresearch.com/report/lignin-products-market>. Acesso em: 09 fev. 2025.
72. SUGIARTO, S.; LEOW, Y.; TAN, C. L.; WANG, G.; KAI, D. How far is Lignin from being a biomedical material? *Bioactive Materials*, v. 8, p. 71-94, 2022.
73. SUN, R.-C. Lignin source and structural characterization. *ChemSusChem*, v. 13, n. 17, p. 4385-4393, 2020.
74. TAVARES, C. F. F.; ALMEIDA, C. D. M.; SILVA, P. A. J. et al. Thermal treatment of açai (*Euterpe oleracea*) fiber for composite reinforcement. *Polímeros*, v. 30, n. 1, p. 327-345, 2020.
75. TER STEEGE, H. et al. Hyperdominance in the Amazonian tree flora. *Science*, v. 342, n. 6156, 1243092, 2013.
76. TIEPPO, M. et al. *Croton cajucara* Benth. Leaf Extract Scavenges the Stable Free Radical DPPH and Protects Against Oxidative Stress Induced by Paraquat. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, p. 161-165, 2006.
77. TORRES, B. et al. Carbon Stock Assessment in Silvopastoral Systems along an Elevational Gradient: A Study from Cattle Producers in the Sumaco Biosphere Reserve, Ecuadorian Amazon. *Sustainability*, v. 15, n. 1, 449, 2023.
78. TORTORA, M. et al. Ultrasound driven assembly of lignin into microcapsules for storage and delivery of hydrophobic molecules. *Biomacromolecules*, v. 15, n. 5, p. 1634-1643, 2014.
79. VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? *Química Nova*, v. 28, p. 519-528, 2005.
80. VISHTAL, A. G.; KRASLAWSKI, A. Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources*, v. 6, p. 3547-3568, 2011.
81. YANG, B. et al. Significantly enhancing enzymatic saccharification of poplar waste through the effective removal of lignin and hemicellulose by 1-butanol-Na₃PO₄-water treatment. *Industrial Crops and Products*, v. 222, 119890, 2024.
82. YE, K.; LIU, Y.; WU, S.; ZHUANG, J. A review for lignin valorization: challenges and perspectives in catalytic hydrogenolysis. *Industrial Crops and Products*, v. 172, 114008, 2021.

ANEXO I

International Journal of Biological Macromolecules
Alkaline lignin from *Clarisia racemosa* wood: antioxidant, immunomodulatory, and schistosomicidal activities, and its use as an excipient in praziquantel release.
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IJBIMAC-D-23-19336R4
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Carbohydrates, Natural Polyacids and Lignins
Keywords:	lignin, biomaterial, <i>Schistosoma mansoni</i>
Corresponding Author:	Iranildo Filho Federal University of Pernambuco BRAZIL
First Author:	Lucas Andrade Oliveira Cavalcante Oliveira Cavalcante
Order of Authors:	Lucas Andrade Oliveira Cavalcante Oliveira Cavalcante Josué Filipe de Oliveira Moraes Miranda Maria Gabriela Cavalcanti Silva Maria Julha Felix Pereira Agrinaldo Jacinto do Nascimento Junior Diego Santa Clara Marques Ila Maranhão de Oliveira Rafael Trindade Maia Maria Carmo Alves de Lima André de Lima Aires Iranildo Filho
Abstract:	Lignins are versatile macromolecules with numerous applications in various industrial sectors. In this groundbreaking study, an alkaline lignin was isolated and characterized from the wood of <i>Clarisia racemosa</i> , a tree found in the economically valuable Amazon Forest, known for its timber industry. Initially, lignin extraction was performed using an acid extraction followed by delignification. The obtained lignin was characterized using various techniques, and it was verified that its structure is of the GSH type. Additionally, it was found to have thermal stability and a low molecular weight. Then, various <i>in vitro</i> biological activities were performed. Lignin exhibited antioxidant activity in assays, effectively scavenging free radicals. Furthermore, it demonstrated low toxicity and immunomodulatory properties, promoting the proliferation and activation of immune cells. Regarding the <i>in vitro</i> schistosomicidal activity, it is capable of inhibiting the <i>Schistosoma mansoni</i> parasite, a fact confirmed by scanning electron microscopy. Finally, it has been verified that the lignin of <i>Clarisia racemosa</i> is a promising excipient for the release of the drug praziquantel. This study contributes to the utilization of lignin in the production of sustainable tablets.
Suggested Reviewers:	Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior franciscojbmendonca@yahoo.com.br Thiago Mendonça de aquino thiago.aquino@iqb.ufal.br fatima Nogueira FNogueira@ihmt.unl.pt
Opposed Reviewers:	
Response to Reviewers:	