

Ensaio farmacológico das atividades anti-inflamatória, citotóxica e toxicidade aguda da
Copaifera luetzelburgii, Harms.

***Pharmacological assay of anti-inflammatory, cytotoxic and acute toxicity of Copaifera
luetzelburgii*, Harms.**

Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura¹, Cirley Pinheiro Ferreira^{1,2}, Sidney Gonçalves de Lima,
Francilene Vieira da Silva³, Francilene Vieira da Silva⁴, Ana Karolinne da Silva Brito²,
Esmeralda Maria Lustosa Barros^{1,2}, Daniel Dias Rufino Arcanjo^{1,2}, Maria do Carmo Carvalho
e Martins^{1,2}, Rozeverter Moreno Fernandes⁵, Rita de Cássia Meneses Oliveira⁴

¹ Departamento de Biofísica e Fisiologia, Núcleo de Estudos em Fisiologia Aplicada à Performance e Saúde,
Universidade Federal do Piauí

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Nordeste (RENORBIO)

³ Laboratório de Geoquímica Orgânica, Universidade Federal do Piauí

⁴ Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí

⁵ Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí

Resumo:

A *Copaifera luetzelburgii* é uma espécie de copaíba encontrada no nordeste do Brasil, especificamente em regiões quentes e secas de solo arenoso. Estudos sobre essa árvore limitam-se à análise do óleo resina, ignorando outras partes da planta. No presente estudo investigou-se o efeito anti-inflamatório, citotóxico e a toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas (FCL-EtOH) e das cascas (CCI-EtOH) da *Copaifera luetzelburgii*. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa de espectrofotometria de massa (CG-EM). A toxicidade aguda foi analisada pelas doses letais em *Artemia salina* e atividade hemolítica. Para atividade anti-inflamatória os animais foram submetidos aos testes de edema de orelha induzido por óleo de crôton, edema de pata induzido por carragenina e edema de pata induzido por dextrana. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e comparados utilizando teste *t* de Student e ANOVA, seguido do teste de Tukey, estabelecendo como nível de significância $p < 0,05$. O extrato etanólico das cascas não mostraram toxicidade significativa em *Artemia salina*, com ausência de mortalidade. O CCI-EtOH apresentou um percentual de hemólise de aproximadamente 25%, sugerindo baixa citotoxicidade. Nos testes histopatológicos, foram observadas alterações hepáticas como infiltrado inflamatório periportal em doses mais altas. A atividade anti-inflamatória foi confirmada em modelos de edema, com inibição significativa do inchaço nas doses testadas. Os extratos etanólicos de *Copaifera luetzelburgii* apresentaram baixa toxicidade em camundongos e atividade anti-inflamatória significativa. Mais estudos são necessários para determinar os possíveis mecanismos de ação dos extratos estudados.

Palavras-chave: *Copaifera luetzelburgii*; Citotoxicidade; Atividade anti-inflamatória.

Abstract:

Copaifera luetzelburgii is a species of copaiba found in northeastern Brazil, specifically in hot and dry regions with sandy soil. Studies on this tree have been limited to the analysis of the resin oil, disregarding other parts of the plant. In the present study, the anti-inflammatory, cytotoxic, and acute toxicity effects of the ethanolic extract of the leaves (FCL-EtOH) and bark (CCI-EtOH) of *Copaifera luetzelburgii* were investigated. The extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Acute toxicity was assessed through lethal doses in *Artemia salina* and hemolytic activity. For anti-inflammatory activity, animals were subjected to croton oil-

induced ear edema, carrageenan-induced paw edema, and dextran-induced paw edema tests. Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) and compared using Student's *t* test and ANOVA followed by Tukey's test, with a significance level set at $p < 0.05$. The ethanolic bark extract showed no significant toxicity in *Artemia salina*, with no mortality observed. CCl-EtOH exhibited a hemolysis percentage of approximately 25%, suggesting low cytotoxicity. In histopathological tests, hepatic alterations such as periportal inflammatory infiltrate were observed at higher doses. Anti-inflammatory activity was confirmed in edema models, with significant inhibition of swelling at the tested doses. The ethanolic extracts of *Copaifera luetzelburgii* demonstrated low toxicity in mice and significant anti-inflammatory activity. Further studies are needed to determine the possible mechanisms of action of the studied extracts.

Keywords: *Copaifera luetzelburgii*; Cytotoxicity; Anti-inflammatory activity.

1. Introdução

As árvores popularmente chamadas de copaíba, pertencentes ao gênero *Copaifera*, família *Fabaceae* e subfamília *Caesalpinoideae*, são nativas de regiões tropicais da América Latina e também da África Ocidental (DA SILVA; AGUIAR; BOMFIM, 2023; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Na América Latina são encontradas espécies que habitam regiões que se estendem desde o México até ao norte da Argentina (VIRIATO *et al.*, 2009). No Brasil, mais precisamente nas regiões amazônicas, é possível encontrar uma ampla diversidade de espécies, com um total de 16 delas identificadas especificamente no território brasileiro (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A *Copaifera luetzelburgii* é uma espécie de copaíba encontrada do Brasil, especificamente na região nordeste de clima quente e seco de solo arenoso (COSTA; QUEIROZ, 2010), que pode atingir aproximadamente 1,5 m de altura e que tem preferência por ambientes abertos, podendo atingir um porte arbóreo de 5-8 m de altura em formações florestais (DO SANTOS *et al.*, 2015). Esta espécie não teve seus constituintes químicos estudados e a maioria dos trabalhos realizados com o gênero *Copaifera* se restringem ao estudo do óleo resina (CARDINELLI *et al.*, 2023; DIEFENBACH *et al.*, 2018; DO CARMO SILVA *et al.*, 2020; HAWWAL *et al.*, 2021), sendo poucos aqueles que avaliaram o óleo essencial bem como os constituintes dos extratos provenientes de outras partes da planta.

Um estudo de revisão com análise cienciométrica realizado por Frazão *et al.* (2023) descreveu uma grande variedade de estudos sobre atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* desenvolvidas ao longo dos anos, sendo a espécie *Copaifera reticulata* a mais investigada. Dentre as propriedades atribuídas às copaíbas, destacam-se a ação antimicrobiana (SOUZA *et al.*, 2011); antinociceptiva, gastroprotetora e antiinflamatória (DA SILVA *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2019); antioxidante, citotóxica (SANTOS *et al.*, 2022); hepatoprotetor (PEREIRA *et al.*, 2018); antiviral (GAMA *et al.*, 2018), o que as torna um grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (FERNANDES *et al.*, 2023).

Entretanto, o uso do óleo-resina, que constitui grande parte dos estudos relacionados a

essas espécies (FRAZÃO *et al.* 2023), tem sua obtenção dependente do extrativismo, o que representa um desafio ambiental (NASCIMENTO *et al.*, 2023). Estudos que relatam o uso do óleo-resina de *Copaifera*, tais como a *C. langsdorffii*, também descrevem dificuldade de obtenção desses óleos a partir de várias espécies do gênero (BARRETO JÚNIOR *et al.*, 2005; WAUWE; GOOSSENS, 1989). Medeiros e Vieira (2008) destacam que embora seja possível extrair o óleo-resina de forma controlada, alguns fatores como o diâmetro da árvore podem limitar seu rendimento.

Além disso, é importante destacar que o óleo também contém substâncias de propriedades irritantes que podem resultar em efeitos colaterais, como lesões renais e inflamações no trato urinário (BRITO *et al.*, 2005), distúrbios gastrointestinais (PIO CORRÊA, 1984), e sensibilidade cutânea (VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, 2002), quando consumido de forma indiscriminada ou mesmo em doses excessivas.

Neste sentido, o estudo de outras partes da planta tem despertado o interesse, uma vez que seu uso também é amplamente utilizado na medicina popular (RIOS, MARY NAVES DA SILVA; PASTORE JÚNIOR, 2011). Estudo de Reis *et al.* (2024) identificaram a presença dos compostos químicos sesquiterpenos e o ácido caurenóico a partir de folhas de *C. langsdorffii*, o que sugere que outras partes da planta como cascas e folhas podem constituir uma potencial fonte de novas aplicações farmacológicas.

Embora o uso das espécies de *Copaifera* seja difundido para fins medicinais, existem poucos estudos sobre os efeitos tóxicos, por via tópica e oral (CARDINELLI *et al.*, 2023). Analisar a toxicidade de uma planta ou produtos bioativos é fundamental para o estabelecimento de um regime de doses nas pesquisas envolvendo toxicidade subaguda e crônica, pois pode fornecer subsídios sobre o modo de ação tóxica da planta ou produtos bioativos advindos dela (BARDAJÍ *et al.*, 2016; PAVAN *et al.*, 2018).

O estudo de substâncias com ação antiinflamatórias também apresenta importância clínica dado que as doenças inflamatórias apresentam altas taxas de prevalência e mortalidade (ZHAI *et al.* 2024) Além disso uma grande variedade de outras doenças que incluem as autoimunes, cardiovasculares, diabetes e câncer apresentam mecanismos inflamatórios como parte de sua fisiopatologia (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2024).

Nesse sentido, torna-se necessário investigar as características fitoquímicas e o potencial farmacológico da espécie *Copaifera luetzelburgii* encontrada em nossa região, uma vez que nos levantamentos bibliográficos realizados não há relatos de estudos dessa atividade na referida espécie. No presente estudo investigou-se o efeito antiinflamatório, citotóxico e toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas e das cascas da *Copaifera luetzelburgii* (CCl- EtOH).

2. Materiais e Métodos

2.1 Material vegetal

As folhas e as cascas de *Copaifera luetzelburgii* Harms. foram coletadas no município de São Miguel do Tapuio, estado do Piauí, Brasil, na latitude 5°30'14" S e longitude 41°19'22" W. A exsicata da espécie foi identificada e depositada no acervo do Herbário Graziela Barroso (nº 26.235) da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

2.2 Obtenção do extrato

O processo de extração do material vegetal foi realizado no Departamento de Química da UFPI em aparelho do tipo Clevenger. As folhas e as cascas do caule foram separadas, trituradas, extraídas por maceração a frio, filtradas após 24 h da extração e concentrada no rota-evaporador a 40°C.

A obtenção do extrato etanólico das folhas e das cascas do caule ocorreram separadamente por meio de processo de hidrodestilação durante 3 horas, em processo contínuo. A seguir, realizou-se secagem em estufa de circulação de ar forçada durante 72 h à temperatura máxima de 45°C (± 1), e trituração em moinho tipo Willis, seguida de quatro extrações de maceração a frio em intervalos de 24h. As amostras foram filtradas com papel filtro convencional e o extrato concentrado por evaporação dos solventes em rota-evaporador à aproximadamente 40 °C.

2.3 Análise POR CG/EM

As amostras do óleo das folhas e da casca do caule de copaíba foram analisadas pelo espectrômetro de massa Shimadzu GC-17A/MS, com ionização por impacto eletrônico (70 eV). A separação foi obtida com coluna DB-5HT (30 m x 0,25 mm), espessura do filme interno de 0,10 μ m e hélio como gás carreador a 1,7 mL/min. A temperatura do injetor foi 270 °C, do detector 290 °C e da coluna 60 °C (1 min) – 180 °C (1 min) em 4 °C/min, 180-270 °C em 10 °C/min, por 10 min. A interpretação e identificação dos espectros de massa foram realizados por comparação com o banco de dados de espectro de massa Willey 229 do equipamento CG/EM.

2.4 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (180 - 220 g) e camundongos Swiss albinos (25 – 35 g), machos e fêmeas. Para determinação do número de animais (n) para ser usados no protocolo de atividade antiinflamatória utilizou-se o cálculo estatístico que ajuda a estimar o n ideal, com

aplicação da seguinte fórmula: $N = 1 + [2C \cdot (s/d)^2]$, onde C é dependente dos valores escolhidos para força ou poder do teste ($1 - \beta$; chance de encontrar uma diferença existente) e nível de significância (α ; a chance de considerar dois grupos diferentes quando eles não são); s é o desvio padrão aceitável de acordo com a projeção do pesquisador e d é diferença esperada esperada entre grupos. Considerando $s=0,10$ mL, $d=0,15$ mL, $\alpha=0,05$ (bicaudal), poder=80%, e $C=7,84$, tem-se $n= 8$ animais por grupo.

Os animais foram acondicionados em grupo de dez, sendo cinco por gaiola plástica, separados por sexo, em ambiente climatizado ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), recebendo água e ração *ad libitum*, com condições controladas do claro/escuro de 12 em 12 horas, provenientes dos biotérios do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) e do Departamento de Morfofisiologia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Parecer Nº 004/08 e 026/09).

2.5 Determinação da toxicidade aguda em camundongos

A toxicidade aguda foi realizada conforme o método de Miller e Tainter (1944). Foram utilizados camundongos ($n = 80$), divididos em grupos de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas). Os animais foram tratados conforme os grupos: Controle 1 (C1, tratado com 10 mL/kg de solução fisiológica 0,9%, via oral, $n = 10$) e Controle 2 (C2, tratado com 10 mL/kg de solução fisiológica 0,9%, via intraperitoneal, $n = 10$); Tratamento 1 (T1, tratado com 5 g/kg de extrato de folhas por via oral, $n = 10$) e tratamentos com administração do extrato das cascas nas doses de 2000 mg/kg (T2, $n = 10$), 1000 mg/kg (T3, $n = 10$), 500 mg/kg (T4, $n = 10$), 250 mg/kg (T5, $n = 10$) e 125 mg/kg (T6, $n = 10$), respectivamente, por via intraperitoneal (1% de DMSO adicionado ao extrato).

A mortalidade foi avaliada aos 30, 60, 120, 360 min e a cada 24 h após o tratamento até o 14º dia. Durante o experimento, foi observada a presença ou ausência de 22 sinais, conforme protocolo empregado por Carlini (1972). Após o óbito dos animais, durante o experimento e no 14º dia após o tratamento, foram coletados os principais órgãos (fígado, rins, coração e pulmão). Os animais sobreviventes foram eutanasiados sob efeito anestésico para coleta dos órgãos. Os órgãos coletados foram seccionados por incisão sagital, armazenados em solução de formol a 10% e posteriormente fixados com formalina tamponada. Após 24 h, os tecidos seccionados foram reprocessados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70° a 100°), seguida de diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais (LUNA, 1968). Em micrótomo, seccionaram-se os fragmentos

tissulares em espessura de 3,0 μm , com subsequente coloração por hematoxilina-eosina e tricrômico, para exame microscópico.

A determinação da DL50 foi feita através da interpolação semi-logarítmica, sendo postos no eixo das ordenadas os valores correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abscissas, as doses administradas de extrato etanólico da casca de *Copaifera luetzelburgii* (CCl-EtOH).

2.6 Ensaio de citotoxicidade com *Artemia*

A citotoxicidade foi testada em *Artemia salina*. Os ovos das larvas de camarão de água salgada foram mantidos em recipiente com água salgada artificial, à temperatura ambiente (25–30 °C) sob iluminação artificial. Vinte e quatro horas após a eclosão, 15 soluções padrão dos extratos etanólicos foram preparadas por dissolução de 50 mg de cada extrato e Tween-40, um tensoativo utilizado para solubilizar os extratos orgânicos em água. Dez larvas de *Artemia salina* foram transferidas para os tubos de ensaio contendo soluções salinas dos extratos etanólicos das folhas e cascas de *Copaifera luetzelburgii* Harms em cinco níveis de dosagem (Tabela 1). Os ensaios foram realizados em triplicata. Após 24 h, foi quantificada a taxa de mortalidade das larvas. A concentração letal média (CL50) foi determinada por regressão linear, em modelo Probit com 95% de confiança.

Tabela 1. Determinação das concentrações em ppm usados no teste de toxicidade em *Artemia salina* da *Copaifera luetzelburgii*

Extratos	Solução Padrão (ppm)	Concentrações (mg/Kg)
Etanólico da casca do caule (EECC)	2000	12,5
		25,0
		50,0
		100,0
		200,0
Etanólico da Folha (EEFC)	2000	12,5
		25,0
		50,0
		100,0
		200,0

Fonte: Autor (2024).

2.7 Teste de hemólise

O sangue de três ratos Wistar foi coletado e lavado duas vezes com solução salina (NaCl 0,9% + CaCl₂ 10 nM) por centrifugação a 5000 rpm/3 min. O pellet de eritrócitos foi ressuspenso em solução salina (0,5%) para preparo da suspensão eritrocitária. A atividade hemolítica foi avaliada em diferentes concentrações (3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) do extrato da casca de *Copaifera luetzelburgii* (CCl-EtOH). A montagem dos tubos foi feita em triplicata para todos os produtos testados nas concentrações desejadas, e o volume foi completado para 0,5 mL com solução salina. Para o controle positivo, foi adicionado 100 µL de Triton X-100 a 1% (100% de hemólise). A cada tubo foi adicionado 100 µL de suspensão de eritrócitos. As amostras foram incubadas por 60 min à temperatura ambiente (25–30 °C) sob agitação constante e centrifugadas a 5000 rpm por 3 min. A hemólise foi medida pela absorbância do sobrenadante a 540 nm.

2.8 Atividade antiinflamatória da *Copaifera*

2.8.1 Edema de orelha induzida por óleo de cróton em camundongo

O edema de orelha foi induzido através da aplicação de 10 µL de óleo de cróton (0,05%) na orelha direita de camundongos machos e fêmeas (n = 32), conforme método de Shiantarelli *et al.* (1982). Os animais foram previamente anestesiados com tiopental sódico (25 mg·kg⁻¹) e, após 1 h do tratamento, foram aplicados topicamente dexametasona (0,2 mL/orelha, n = 8), veículo (salina, NaCl 0,9%, n = 8) e extratos etanólicos da casca (CCl-EtOH) nas doses de 250 mg/kg (n = 8) e 500 mg/kg (n = 8). Na orelha esquerda foi aplicada somente acetona. Após 4 h, os animais foram eutanasiados, as orelhas seccionadas em discos circulares de 6,0 mm de diâmetro e pesadas (mg). A porcentagem de inibição do edema foi calculada comparando o aumento percentual médio do peso da orelha do grupo controle com o grupo tratado.

2.8.2 Edema de pata induzido por carragenina em ratos

O edema de orelha foi induzido através da aplicação de 10 µL de óleo de cróton (0,05%) na orelha direita de camundongos machos e fêmeas (n = 32), conforme método de Shiantarelli *et al.* (1982). Os animais foram previamente anestesiados com tiopental sódico (25 mg·kg⁻¹) e, após 1 h do tratamento, foram aplicados topicamente dexametasona (0,2 mL/orelha, n = 8), veículo (salina, NaCl 0,9%, n = 8) e extratos etanólicos da casca (CCl-EtOH) nas doses de 250 mg/kg (n = 8) e 500 mg/kg (n = 8). Na orelha esquerda foi aplicada somente acetona. Após 4 h, os animais foram eutanasiados, as orelhas seccionadas em discos circulares de 6,0 mm de

diâmetro e pesadas (mg). A porcentagem de inibição do edema foi calculada comparando o aumento percentual médio do peso da orelha do grupo controle com o grupo tratado.

2.8.3 Edema de pata induzida por dextrana

Grupos de 7 camundongos machos e fêmeas ($n = 32$) foram separados e tratados por via oral com veículo (solução salina 0,9%, $n = 8$), CCl-EtOH nas doses de 250 mg/kg ($n = 8$) e 500 mg/kg ($n = 8$) ou ciproheptadina (10 mg/kg, $n = 8$), uma hora antes da aplicação do agente inflamatório (100 μ g/pata de dextrana). O volume em mL da pata foi medido usando o método descrito por Winter *et al.* (1962), com adaptações, imediatamente após 1 h da injeção de dextrana. Os animais foram eutanasiados com superdose de tiopental sódico (150 mg) endovenosa, as patas foram retiradas e pesadas. A inibição do edema foi calculada pela diferença do peso (mg) da pata que recebeu o estímulo em relação à pata contralateral.

2.9 Análise estatística

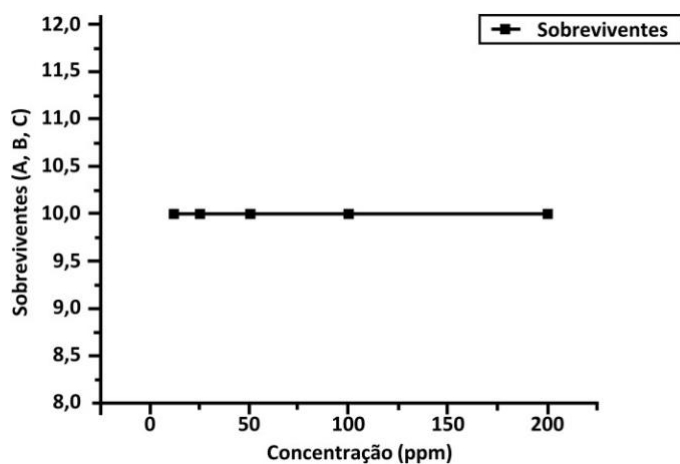
Os dados foram analisados estatisticamente por meio do programa SPSS 15.0 for Windows. Os resultados foram expressos em média $\pm$ e.p.m, e comparados através do teste *t* de Student. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de significância.

3. Resultados

3.1 Concentração letal mediana sobre artemia salina e citotoxicidade através de hemólise

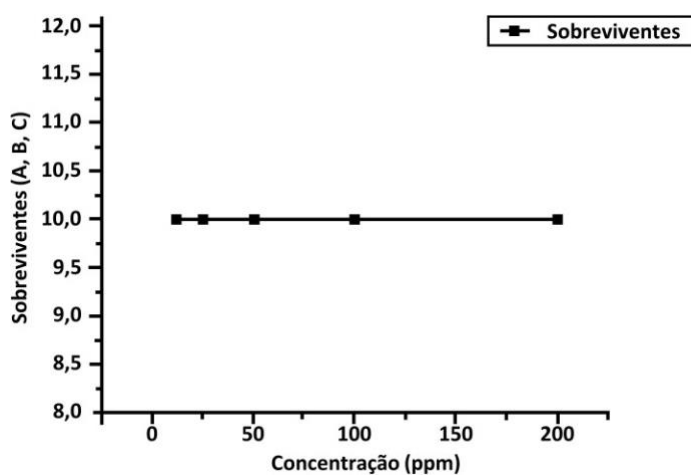
Ao observarmos as figuras 1 e 2, verificamos que os extratos etanólicos das folhas (FCl-EtOH) e das cascas (CCl-EtOH) foram incapazes de causar a mortalidade das larvas de *Artemia*, indicando uma ausência de toxicidade. Portanto, não foi possível determinar a CL₅₀.

Figura 1. N° de larvas de *Artemia salina* que sobreviveram a diferentes concentrações do FCl-EtOH (200 ppm) durante 24 horas de observação.



Fonte: Autores

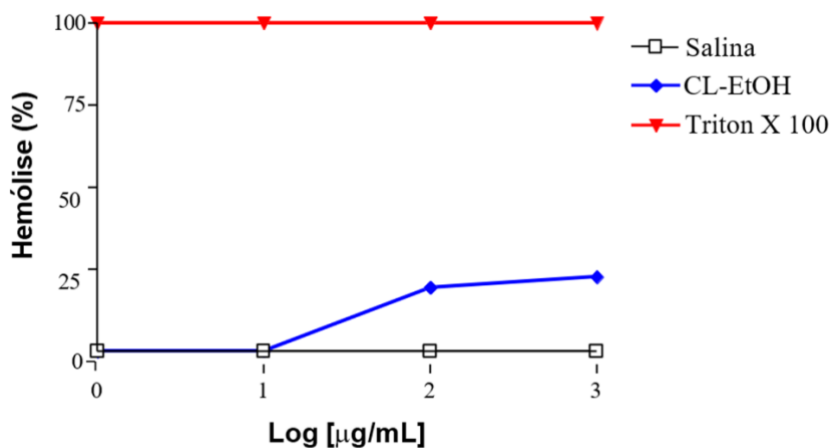
Figura 2. N° de larvas de *Artemia salina* que sobreviveram a diferentes concentrações do CCl-EtOH (200 ppm) durante 24 horas de observação.



Fonte: Autores.

Os resultados do teste citotoxicidade mostraram que o extrato etanólico das cascas de copaíba (CCl-EtOH) apresentou um percentual de hemólise em torno de 25%, demonstrando que não apresenta atividade toxica através da metodologia utilizada (figura 3).

Figura 3. Percentual de hemólise após a exposição ao CCl-EtOH (1160 µg/mL) em diferentes concentrações ocorrido no período de 24 horas de observação.



Fonte: Autores

3.2 Determinação da DL₅₀

Os animais que receberam o extrato etanólico da casca (CCl-EtOH) por via intraperitoneal nas doses de 125 mg, 250 mg, 500 mg, 1000 mg e 2000 mg apresentaram uma mortalidade variando de 20%, 40%, 70% e 90%, respectivamente, sendo que a DL₅₀ calculada para a via intraperitoneal foi de 311 mg/kg (Tabela 2). Foi demonstrado que a dose letal média foi de 311 mg/kg; se extrapolarmos esse valor para um homem de 70 kg, a dose tóxica seria de aproximadamente 2,8 g/kg, o que não é um percentual muito difícil de se alcançar.

O exame histopatológico dos animais tratados por via oral, na dose de 5 g, revelou uma leve infiltração inflamatória periportal no fígado, com predominância de mononucleares e eosinófilos. Por outro lado, no grupo controle submetido à mesma via de administração, não foram observadas alterações significativas. Já os animais que receberam administração intraperitoneal do extrato na dose de 2 g, 80% apresentaram um infiltrado periportal discreto a moderado no fígado, com predominância de células mononucleares distribuídas de forma focal e multifocal. Não foram identificadas alterações em outros órgãos, como baço, pulmão, coração e rim.

Tabela 2. Determinação da DL₅₀ do extrato etanólico da casca de *Copaifera luetzelburgii* (CCl-EtOH) em camundongo.

GRUPOS	DOSES mg/kg	Nº ANIMAIS/ÓBITOS
T1	2000	10/9
T2	1000	10/9
T3	500	10/7
T4	250	10/4
T5	125	10/2
CI	-	10/0

Limite de confiança para DL₅₀ ($\alpha = 0,05$)
DL₅₀média = 311 mg/kg
Limite superior DL₅₀ = 499 mg/kg
Limite inferior DL₅₀ = 157 mg/kg

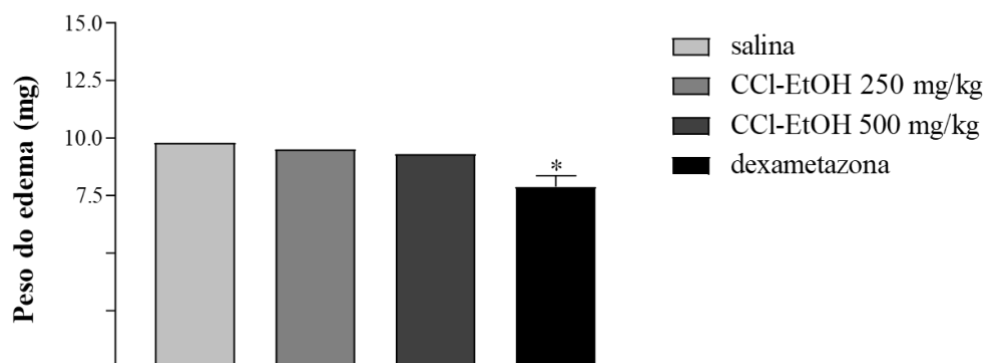
Fonte: Autor (2024).

No grupo de camundongos que recebeu por via intraperitoneal 1 g/kg de CCl-EtOH, observou-se que 70% apresentaram degeneração periportal discreta a moderada no fígado, sem alterações nos demais órgãos. Já no grupo cuja dose foi de 500 mg, constatou-se que os fígados de 40% dos animais apresentaram degeneração periportal de discreta a moderada. Em um deles, foi observada degeneração discreta centrolobular. Todos apresentaram infiltrado inflamatório periportal moderado, principalmente de eosinófilos.

Na dose de 250 mg/kg de CCl-EtOH, ocorreu uma infiltração focal ou periportal discreta a acentuada, constituída principalmente de eosinófilos. Em um deles, observou-se degeneração periportal difusa. No grupo que recebeu 125 mg/kg, 60% apresentaram infiltrado focal discreto com predominância de mononucleares.

Na avaliação do edema de orelha induzido por óleo de cróton, o extrato etanólico da casca de *C. luetzelburgii* (CCl-EtOH) não mostrou efeito anti-edematogênico significativo quando comparado ao grupo controle (Figura 4), em nenhuma das doses avaliadas.

Figura 4. Efeito do extrato etanólico da casca (CCI-EtOH) sobre o edema de orelha induzido por aplicação tópica do óleo.

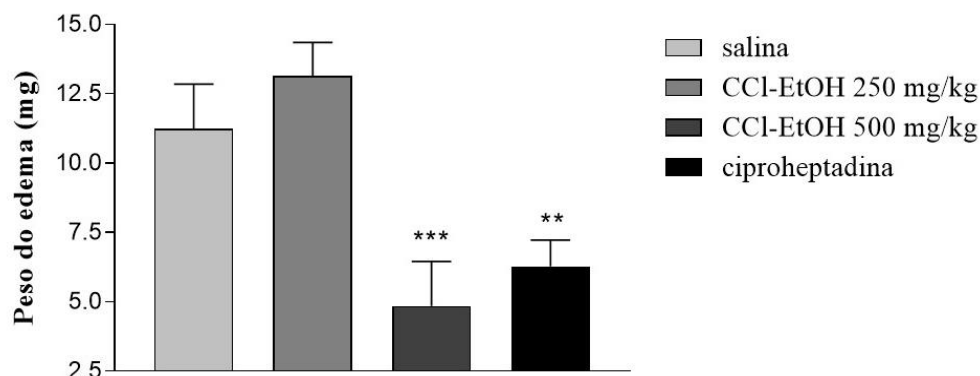


Legenda: Efeito do extrato etanólico da casca (CCI-EtOH) sobre o edema de orelha induzido por aplicação tópica do óleo decrôton (10µL, 0,05 %) em camundongos, 1 h após tratamento tópico com dexametazona (0,2 mg/orelha) e veículo em camundongo. ANOVA one-way seguida do teste de Tukey, * $p < 0,05$. Fonte: Autores.

No extrato etanólico da casca de *Copaifera luetzelburgii* (250 e 500 mg/kg), não foi observado efeito significativo do tempo (em horas), indicando que o efeito não é dose-dependente.

No modelo de edema de pata induzido por dextrana, o extrato CCI-EtOH mostrou atividade anti-inflamatória significativa apenas na maior das doses testadas (500 mg/kg), conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5. Efeito do extrato CCl-EtOH e ciproheptadina sobre o edema de pata induzido por dextrana em camungongos adultos.



Legenda: Efeito do extrato CCl-EtOH e ciproheptadina (10mg/kg) sobre o edema de pata induzido por dextrana (100 µg/pata) em camungongos adultos. ANOVAone-way seguida do teste de Tuckey, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Fonte: Autores.

4. Discussão

Nossos resultados com *C. luetzelburgii* mostraram que a avaliação da concentração letal média dos extratos etanólicos das folhas e cascas não resultou na mortalidade das larvas de *Artemia*, indicando ausência de toxicidade. Consequentemente, não foi possível determinar a CL50. Esses achados sugerem que *C. luetzelburgii* Harms apresenta baixo potencial de toxicidade. É importante destacar que os testes com *Artemia salina* são bioensaios preliminares de baixo custo, amplamente utilizados para avaliar a toxicidade geral de espécies vegetais com potencial biofarmacológico (ALVES LUSTOSA *et al.*, 2023; ARCANJO *et al.*, 2012).

O extrato etanólico das cascas da copaíba apresentou um baixo índice de hemólise no teste de citotoxicidade, indicando a ausência de atividade tóxica de acordo com a metodologia utilizada. Este resultado é semelhante aos testes em *Artemia salina* utilizando o mesmo tipo de extrato. Isso sugere que o extrato etanólico é seguro para uso em ambas as metodologias. Vale ressaltar que a ausência de toxicidade nos testes de letalidade em *Artemia salina* e citotoxicidade por hemólise indica que a planta pode ser tolerada pelo sistema biológico. No entanto, estudos mais abrangentes para avaliar a toxicidade dos extratos bioativos, por meio de outros modelos (*in vitro* e *in vivo*), são necessários.

No teste de toxicidade aguda, os resultados demonstraram ausência de toxicidade da planta por via oral. Isso foi corroborado pelo fato de que os animais que receberam a dose

máxima recomendada pela literatura do extrato de *C. luetzelburgii* por via oral não exibiram quaisquer alterações comportamentais e não ocorreu nenhum óbito (CARLINI, 1972).

Resultados semelhantes foram descritos com o óleo-resina da *C. reticulata* nas doses de 300 mg/kg a 2000 mg/kg (SACHETTI; CAMILE GIARETTA; FASCINELI; MARIA LUIZA; SAMPAIO; JULIANA ALVES; LAMEIRA; OSMAR ALVES; CALDAS, 2009).

A administração do extrato etanólico da casca (CCl-EtOH) de *C. luetzelburgii* por via intraperitoneal causou alteração de comportamento nos animais, com diminuição da atividade geral após 60 min da administração, conforme descrito por Carlini (CARLINI, 1972). O percentual de mortalidade aumentou gradativamente conforme o aumento da dose administrada, demonstrando tendência a uma mortalidade dose-dependente. Provavelmente, a baixa toxicidade ocorrida pela via oral deve-se a fatores como taxa de esvaziamento gástrico, pH gastrointestinal e concentração enzimática. Dessa forma, acredita-se que o extrato tenha sido biotransformado em primeira passagem pelo fígado, reduzindo assim seu potencial tóxico (SPINOSA; H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, 2006). Por outro lado, a via intraperitoneal oferece um padrão de absorção errático, havendo substâncias que penetram rapidamente na circulação e podem escapar da primeira passagem pelo fígado, fato que pode explicar a maior mortalidade dos grupos submetidos ao extrato por esta via, principalmente nas doses elevadas (OSÓRIO-DE-CASTRO, 2000).

O modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton tem sido amplamente estudado para prospectar novos fármacos com ação anti-inflamatória (ALMEIDA JUNIOR, 2019; F. ARRUDA *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2015; TUBARO *et al.*, 1986). Em nossos achados, o extrato CCl-EtOH não demonstrou efeito anti-edematogênico significativo quando comparado ao grupo controle, sugerindo que o extrato não possui atividade anti-inflamatória tópica, diferente dos resultados evidenciados com *Copaifera langsdorffii*, onde se concluiu que altas diluições do óleo de copaíba apresentam efeitos anti-inflamatórios (VIRIATO *et al.*, 2009).

No ensaio de atividade anti-edematogênica sistêmica, o processo inflamatório induzido pela carragenina atinge seu pico entre a terceira e a quarta hora. A resposta inflamatória aguda compreende três fases distintas: na primeira fase ocorre a liberação simultânea de histamina e serotonina; na segunda fase, há a liberação de cininas, como a bradicinina; e na fase final, ocorre a liberação de prostaglandinas (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; ROWLEY; BENDITT, 1956; SOUSA-NETO *et al.*, 2018). Em nossos resultados, o extrato CCl-EtOH apresentou efeito até a quinta hora de administração, quando comparado com o controle, indicando que esse extrato pode conter princípios ativos que estariam inibindo o processo

inflamatório em diferentes etapas da resposta inflamatória, envolvendo vários mediadores químicos da inflamação (histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas). Vale ressaltar que, na dose de 250 mg/kg, o extrato não apresentou efeito significativo em nenhum momento das análises, demonstrando que o efeito não é dose-dependente.

Estudo que analisou o potencial anti-inflamatório da *C. reticulata* em ratos verificou que o óleo-resina com alta concentração de β -bisboleno demonstrou atividade anti-inflamatória, reduziu a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, a formação de edema de pata induzido por carragenina, diminuindo a migração celular e a produção de citocinas inflamatórias (DE ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2021).

O dextrano é um agente inflamatório, caracterizado por extravasamento de fluidos e formação de edema em ratos (WAUWE; GOOSSENS, 1989). No modelo de edema de pata induzido por dextrana, o extrato etanólico da casca (CCl-EtOH) mostrou atividade anti-inflamatória apenas na maior dose testada. Já a dose do extrato da casca semelhante ao teste com carragenina também não demonstrou efeito, confirmando a informação anterior (METCALFE, 2008).

5. Conclusões

Conclui-se que os extratos analisados demonstraram atividade anti-edematogênica evidenciada nos modelos de edema de orelha e de pata, sem apresentar atividade tóxica contra *Artemia salina* ou citotoxicidade através de hemólise. Dentro desta perspectiva, sugere-se realizar mais estudos para determinar os possíveis mecanismos de ação dos extratos estudados.

6. Referências

- ALMEIDA JUNIOR, S. DE. In vivo methods for the evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive potential. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 2, n. 4, 2019.
- ALVES LUSTOSA, E. *et al.* Toxicidade de inseticida agrícola em bioensaio com *Artemia salina*. **Scientia Plena**, v. 18, n. 5, 15 jun. 2023.
- ARCANJO, D. *et al.* Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505–509, ago. 2012.
- BARDAJÍ, D. K. R. *et al.* *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p. 18–27, ago. 2016.
- BARRETO JÚNIOR, A. G. *et al.* Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 719–722, ago. 2005.

- BRITO, M. V. H. *et al.* Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 243–246, jun. 2005.
- CARDINELLI, C. C. *et al.* Toxicological Effects of Copaiba Oil (*Copaifera* spp.) and Its Active Components. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1054, 27 fev. 2023.
- CARLINI, E. Screening farmacológico de plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 32, n. 2, p. 265–274, 1972.
- DASILVA, J. J. M. *et al.* Determination of the Composition of *Copaifera* (Fabaceae) Leaf Extracts with Potential Antioxidant Activity by Metabolomics Approach. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 720–725, 26 out. 2021.
- DASILVA, K. C.; AGUIAR, D. H.; BOMFIM, G. F. Assessment of the effect of copaiba oil (*Copaifera* sp.) on the kidneys of rats with hepatic dysfunction. **Scientific Electronic Archives**, v. 16, n. 5, 30 abr. 2023.
- DE ALMEIDA JÚNIOR, J. *et al.* Anti-Inflammatory Potential of the Oleoresin from the Amazonian Tree *Copaifera reticulata* with an Unusual Chemical Composition in Rats. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 12, p. 320, 10 dez. 2021.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15–29, maio 1971.
- DIEFENBACH, A. L. *et al.* Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 4, p. 586–596, 29 abr. 2018.
- DO CARMO SILVA, L. *et al.* Antifungal activity of Copaíba resin oil in solution and nanoemulsion against *Paracoccidioides* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 125–134, 12 mar. 2020.
- DOS SANTOS, I. M. *et al.* Predação de sementes por insetos em três espécies simpátricas de *Copaifera* L. (Fabaceae). **Biotemas**, v. 28, n. 2, p. 87, 16 mar. 2015.
- F. ARRUDA, R. *et al.* Chemical Study and Evaluation of Anti-Inflammatory, Antitumor and Antioxidant Activities of Aerial Parts from *Aeschynomene sensitiva*. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, p. 684–697, 2018.
- FERNANDES, H. B. *et al.* Laticifer proteins from *Plumeria pudica* inhibit the inflammatory and nociceptive responses by decreasing the action of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 269–277, maio 2015.
- FERNANDES, M. N. M. *et al.* Chemical and Pharmacological Properties of the Genus *Copaifera* in the Treatment of Injuries/Wounds: Integrative Review. **ESTIMA, Brazilian Journal of Enterostomal Therapy**, 1 mar. 2023.

FRAZÃO, D. R.; SILVA, F. O.; SOUSA, A. M. P.; MENEZES, I. R. A.; BEZERRA, D. P. Evaluation of the biological activities of Copaiba (*Copaifera* spp.): a comprehensive review based on scientometric analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1150864>. Acesso em: 7 set. 2025.

GAMA, A. D. S. *et al.* Exotic species as models to understand biocultural adaptation: Challenges to mainstream views of human-nature relations. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0196091, 30 abr. 2018.

HAWWAL, M. F. *et al.* (E)-2,6,10-Trimethyldodec-8-en-2-ol: An Undescribed Sesquiterpenoid from Copaiba Oil. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4456, 23 jul. 2021.

J. A. S. COSTA AND L. P. QUEIROZ. Lectotypifications and nomenclatural notes in *Copaifera* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae-Detarieae). **Kew Bulletin**, v. 65, n. 3, p. 475–478, 2010.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Inflammation unites diverse acute and chronic diseases. **Nature Medicine**, v. 30, n. 4, p. 842–856, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03075-0>. Acesso em: 11 set. 2025.

MEDEIROS, R. S. S.; VIEIRA, D. L. M. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 3, p. 282–288, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.04.012>. Acesso em: 11 set. 2025.

METCALFE, D. D. Mast cells and mastocytosis. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 946–956, 15 ago. 2008.

NASCIMENTO, H. E. M.; GUEDES, M. C.; SILVA, M. F. F.; LIMA, A. J. L.; OLIVEIRA, C. P. Change in oleoresin productivity between harvests and its relation to tree diameter in *Copaifera* spp. **Cerne**, v. 29, e103388, 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cerne/a/QC7yN5xdhKTRFksGrhgTC4P/>. Acesso em: 7 set. 2025.

OSÓRIO-DE-CASTRO, C. G. S. **Estudos de utilização de medicamentos – noções básicas**. Rio de Janeiro: Fiocruz.

PAVAN, E. *et al.* Evaluation of genotoxicity and subchronic toxicity of the standardized leaves infusion extract of *Copaifera malmei* Harms in experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 70–77, jan. 2018.

PEREIRA, D. L. *et al.* Antioxidant and hepatoprotective effects of ethanolic and ethyl acetate stem bark extracts of *Copaifera multijuga* (Fabaceae) in mice. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 4, p. 347–357, dez. 2018.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PIOCORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, IBDF, 1984.

REIS, M. V. S.; SANTOS, L. F.; MOURA, J. P.; OLIVEIRA, R. R. Gênero *Copaifera* L. no estado de São Paulo: caracterização química e potencial de uso. **Scientia Naturalis**, v. 6, n. 1, p. 12–25, 2024. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SciNat/article/view/7147>. Acesso em: 11 set. 2025.

RIBEIRO, V. P. *et al.* Use of spinning band distillation equipment for fractionation of volatile compounds of *Copaifera* oleoresins for developing a validated gas chromatographic method and evaluating antimicrobial activity. **Biomedical Chromatography**, v. 33, n. 2, 5 fev. 2019.

RIOS, M. A. N. V. da SILVA; PASTORE JÚNIOR, F. **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. Brasília: Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011.

ROWLEY, D. A.; BENDITT, E. P. 5-Hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 4, p. 399–412, 1 abr. 1956.

SACHETTI, C.; CAMILE GIARETTA; FASCINELI, MARIA LUIZA; SAMPAIO, JULIANA ALVES; LAMEIRA, OSMAR ALVES; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 937–941, 2009.

SANTOS, M. D. E. O. *et al.* *Copaifera langsdorffii* Desf.: A chemical and pharmacological review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102262, jan. 2022.
SOUSA-NETO, B. P. *et al.* Antiedematogenic activity of the indole derivative N-salicyloyltryptamine in animal models. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 185–194, mar. 2018.

SOUZA, A. B. *et al.* Antimicrobial Evaluation of Diterpenes from *Copaifera langsdorffii* Oleoresin Against Periodontal Anaerobic Bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9611–9619, 18 nov. 2011.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Guanabara, 4. ed.

TUBARO, A. *et al.* The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, v. 17, n. 3–4, p. 347–349, jan. 1986.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

VIRIATO, E. P.; BIANCHETTI, E. S.; SANTOS, K. C.; VAZ, A. F.; CAMPOS, R. M. V.; PEREIRA, A. P.; BEZERRA, R. M.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T. Study of high dilutions of copaiba oil on inflammatory process. **Int J High Dilution Res**, v. 8 (26), p. 9–19, 2009.

WAUWE, J. P.; GOOSSENS, J. G. Arabinogalactan- and dextran-induced ear inflammation in mice: Differential inhibition by H1-antihistamines, 5-HT-serotonin antagonists and lipoxygenase blockers. **Agents and Actions**, v. 28, n. 1–2, p. 78–82, ago. 1989.

ZHAI, H.; YANG, X.; WU, H.; WANG, Y.; ZHANG, J.; LIU, Y. The global burden of inflammation-related diseases of the digestive system among adolescents and young adults aged 15–49 years from 1990 to 2019. **SSRN Electronic Journal**, 2024. Disponível em: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4926622. Acesso em: 11 set. 2025.

7. Agradecimentos:

Gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

8. Conflito de interesse: Os autores declaram não possuir conflito de interesse.

9. Autor correspondente:

Waldilleny Ribeiro de Araújo Moura Universidade Federal do Piauí - UFPI

End. , Teresina, PI, Brazil, Telefone: +55 86 988081414

E-mail: waldilleny@yahoo.com.br

10. Contribuições dos autores:

Conceitualização: WRAM, CPF, MCCM, RCMO; Metodologia: EMLB, SGL, DDRA; Redação – Preparação do rascunho original: WRAM, CPF, AKSB, RCMO; Redação – revisão e edição: CPF, AKSB, RCMO; Supervisão: RMF, WRAM; Administração do projeto: WRAM, CPF, RCMO. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.