AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE NEOLIGNANAS ISOLADAS DE ANIBA FIRMULA

Maria Eduarda Dan Macedo[1]; João Victor Andrade[2], Híllary Ozorio Gobeti Caprini[3]; Daniel Alves de Paula[4], Gilvana de Oliveira Costa[5] Mário Ferreira Conceição Santos

Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, S/N - Guararema, Alegre - 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, Universidade Federal do Espírito Santo/ Departamento de Biologia,mariaeduardadan2003@gmail.com, joaovictorandrade927@gmail.com, hillarygcaprini214@gmail.com, Danielalvesdepaula96@gmail.com.oliveiragil999@gmail.com mariosantos408@gmail.com

Resumo

As neolignanas são metabólitos fenólicos característicos da família Lauraceae e possuem reconhecidas propriedades biológicas. Neste estudo, avaliou-se o potencial anti-inflamatório de duas neolignanas obtidas de cascas do caule de *Aniba firmula*, espécie nativa da Mata Atlântica e usada na medicina popular. O extrato etanólico do vegetal passou por partição em acetato de etila, fracionamento em fase reversa C18 e purificação por HPLC. A elucidação estrutural por RMN de ^{1}H e ^{13}C identificou uma neolignana di-hidrodibenzofurânica (composto 1) e outra tetra-hidrofurânica com anel metilenodioxifenil (composto 2). A atividade anti-inflamatória foi mensurada via ensaio *ex vivo* em sangue humano heparinizado estimulado por lipopolissacarídeo, com quantificação da liberação de PGE2 por UPLC-MS/MS. Utilizaram-se dexametasona e indometacina como controles positivos de referência no teste. Os resultados demonstraram que o composto 1 e o composto 2 reduziram a liberação de PGE2 em 45,3% e 40,2%, respectivamente. Ambas as substâncias apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle negativo.

Palavras-chave: *Aniba firmula*. Neolignanas. Atividade anti-inflamatória. Ensaio *ex vivo*. Produtos naturais.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra – Química Orgânica.

Introdução

A Aniba firmula (Lauraceae), conhecida popularmente como canela-sabiá, destaca-se pelo seu perfil químico promissor, com ênfase no isolamento de neolignanas (Santos *et al.*, 2023). As neolignanas são metabólitos secundários vegetais com amplo espectro de bioatividades relatadas na literatura recente, incluindo propriedades antioxidantes, imunomoduladoras e, notadamente, anti-inflamatórias (Caprini *et al*., 2026). O processo inflamatório é uma resposta fisiológica essencial a estímulos nocivos ou lesões teciduais. Contudo, quando desregulada ou persistente, a inflamação torna-se o conduto fisiopatológico de diversas doenças crônicas não transmissíveis, como artrite, patologias cardiovasculares e desordens neurodegenerativas (Hassanein *et al.*, 2024). A busca por novos fármacos anti-inflamatórios que apresentem maior seletividade e menor perfil de efeitos colaterais tem direcionado a atenção da comunidade científica para produtos naturais e seus derivados (Hanáková *et al.*, 2017).

Nesse contexto, os ensaios *ex vivo* surgem como uma ferramenta metodológica valiosa e estrategicamente posicionada entre os testes *in vitro* e *in vivo* (Pérez-Salas *et al.*, 2023). Ao utilizar órgãos, tecidos ou células funcionais mantidas em ambiente controlado fora do organismo hospedeiro, o modelo ex vivo preserva a arquitetura tecidual e as interações celulares nativas, como no monitoramento da supressão da mediação inflamatória por PGE2, oferecendo respostas translacionais mais fidedignas antes do avanço para etapas pré-clínicas mais complexas (Santos *et al.*, 2019).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo realizar a avaliação *ex vivo* da atividade anti-inflamatória de neolignanas isoladas de *Aniba firmula*. Espera-se contribuir para o mapeamento

biológico de espécies da flora nativa, validar o potencial farmacológico dessas moléculas e fornecer subsídios científicos para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas no manejo de afecções inflamatórias.

Metodologia

As cascas do caule de Aniba firmula foram coletadas em área remanescente de Mata Atlântica. O material vegetal foi seco em temperatura ambiente, moído em moinho de facas e homogeneizado previamente às etapas de extração, de modo a garantir maior superfície de contato e eficiência na etapa de extração exaustiva.

O material vegetal moído foi extraído com 2 L de álcool etílico, e o solvente foi reduzido em rotaevaporador (IKA RV 8) até aproximadamente 500 mL. O extrato bruto resultante foi diluído em água e submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila (250 mL, três vezes), originando as frações alcoólica e acetato de etila. Esta última, por concentrar preferencialmente metabólitos de polaridade intermediária, entre os quais as neolignanas, foi selecionada para as etapas subsequentes de fracionamento.

A fração acetato de etila foi submetida a fracionamento em cartuchos de fase reversa C18 (10 g), eluídos com gradiente crescente de metanol em água (40%, 60%, 80% e 100% de MeOH), o que produziu quatro subfrações de 100 mL cada (F1 a F4). A subfração F3 (80% MeOH/20% H2O) foi selecionada para purificação em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Shimadzu), empregando coluna de fase reversa (ODS-4 Intersil, C18, 7,6 x 250 mm, 5 µm) e fase móvel constituída por acetonitrila/água (0,1% de ácido acético) na proporção 57:33. Essa etapa permitiu o isolamento de duas substâncias puras, denominadas composto 1 e composto 2.

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada por ensaio ex vivo, conforme metodologia descrita por Rosa et al. (2021), previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo n. 89325818.1.0000.5142). Sangue venoso periférico foi coletado de voluntários saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre 20 e 35 anos, que assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e que não relataram uso de anti-inflamatórios ou de cloranfenicol (padrão interno) nos 15 dias anteriores à coleta.

O sangue heparinizado (200 µL) foi diluído em placas de 96 poços contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,01 M de fosfato, 0,15 M de cloreto, pH 7,2) e estimulado com lipopolissacarídeo (LPS, E. coli O26:B6, 10 µg/mL) como agente indutor da resposta inflamatória. As amostras foram incubadas na presença dos compostos isolados (1 µg/mL), dos controles positivos dexametasona e indometacina (1 µg/mL) e do controle negativo (PBS), por 24 horas, em atmosfera de 5% de CO2 a 37 °C, e posteriormente centrifugadas (1000 rpm, 5 min, 4 °C). O plasma (100 µL) foi coletado e submetido à precipitação proteica com metanol/acetonitrila refrigerados (1:1, v/v), seguida de centrifugação (6000 rpm, 10 min, 4 °C). Os sobrenadantes foram diluídos em água destilada, carregados em cartuchos de extração em fase sólida C18 e eluídos com solução metanólica de ácido acético 0,1%, para posterior quantificação da concentração plasmática de PGE2 por UPLC-MS/MS

Resultados

A avaliação do potencial anti-inflamatório *ex vivo* das neolignanas bicíclicas do tipo [3.2.1] octano isoladas de *Aniba firmula* foi realizada mensurando-se a capacidade de inibição da produção de Prostaglandina E2 (PGE2) em sangue humano estimulado por lipopolissacarídeo (LPS). Este modelo mimetiza as condições fisiopatológicas do microambiente inflamatório ao manter as interações celulares nativas do sangue total (Santos *et al.*, 2024). Os resultados quantitativos de supressão obtidos para os compostos isolados 1 e 2, bem como para os fármacos de referência (dexametasona e indometacina) e os controles de sistema, estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Efeito da inibição ex vivo da produção de Prostaglandina E2 (PGE2) por neolignanas isoladas de Aniba firmula

Amostra	% Inibição
Veículo	**-**
Indometacina	**86,2**
Dexametasona	**76,0**
Composto 1	**45,3**
Composto 2	**40,2**

Fonte: Feito pelo autor.

Conforme apresentado na Tabela 1, o estímulo inflamatório com LPS elevou substancialmente os níveis plasmáticos de PGE2 no grupo veículo. O tratamento com os compostos isolados de *Aniba firmula* demonstrou uma redução estatisticamente significativa na liberação deste mediador eicosanóide ($p < 0,007$). O Composto 1 exibiu o percentual de inibição mais pronunciado entre os metabólitos testados (45,3%), seguido pelo Composto 2 (40,2%).

Discussão

Os resultados obtidos no ensaio *ex vivo* confirmam que as neolignanas isoladas de *Aniba firmula* possuem atividade anti-inflamatória promissora, atuando diretamente sobre a supressão de prostaglandina E2. O modelo de sangue humano total estimulado por lipopolissacarídeo (LPS) é considerado um ecossistema metodológico translacional de alta relevância (Cavalcante *et al.*, 2022).

O lipopolissacarídeo (LPS), componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, liga-se aos receptores do tipo Toll-like 4 (TLR4) nos monócitos, ativando vias de sinalização pró-inflamatórias como a do fator nuclear Kappa B. Esse processo culmina na superexpressão da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e da mPGES-1, desencadeando a conversão do ácido araquidônico em PGE2 (Mir e Masoodi, 2020). A liberação exacerbada de pge2 é um marco central da resposta inflamatória, induzindo vasodilatação, edema e recrutamento leucocitário (Di Serio *et al.*, 2024). A redução significativa dos níveis de pge2 observada para o Composto 1 (45,3%) e composto 2 (40,2%) ($p < 0,007$) indica que essas neolignanas modulam negativamente essa cascata eicosanóide (Santos *et al.*, 2024).

Estudo recente aponta que a presença dessa estrutura bicíclica favorece o encaixe conformacional no sítio catalítico da COX-2 ou no receptor de membrana, enquanto variações nos substituintes oxigenados e metoxilados do anel aromático alteram a afinidade de ligação da molécula (Mir & Masoodi *et al.*, 2020). A taxa de inibição ligeiramente superior demonstrada pelo Composto 1 (45,3%) sugere que pequenas modificações nos seus grupamentos funcionais podem aumentar o impedimento estérico ou facilitar interações por pontes de hidrogênio com aminoácidos do sítio ativo enzimático (Santos *et al.*, 2022, 2024).

A comparação com os controles revela um padrão biológico coerente: a dexametasona obteve a maior inibição (**78,0%**), atuando na inibição da PLA2 e no bloqueio transcricional da COX-2, enquanto a indometacina atingiu **61,4%** por inibição direta e não seletiva da COX (Santos *et al.*, 2023). Embora inferiores aos fármacos de referência na mesma dosagem, os percentuais dos Compostos 1 e 2 (**40% a 45%**) são expressivos para produtos naturais não otimizados (Santos *et al.*, 2024). Diferentes dos anti-inflamatórios não esteroidais clássicos, que causam severos danos gastrointestinais e renais pela supressão da COX-1 constitutiva (Di Serio *et al.*, 2024), as neolignanas bicíclicas surgem como protótipos promissores por atuarem de forma mais seletiva sobre a COX-2 ou na modulação de citocinas. Esses achados *ex vivo* confirmam o potencial farmacológico de *Aniba firmula* e embasam futuras otimizações estruturais dessa classe de compostos (Santos *et al.*, 2024).

Conclusão

Os resultados obtidos reforçam o potencial de *Aniba firmula* como fonte de neolignanas bioativas e sustentam a continuidade dos estudos, incluindo a avaliação de outras vias inflamatórias, de possíveis mecanismos de ação envolvidos na inibição da liberação de PGE2 e de relações estrutura-atividade entre diferentes neolignanas de espécies de Lauraceae. Estudos futuros que contemplem a avaliação de outras frações e compostos da espécie, bem como ensaios complementares de toxicidade, poderão contribuir para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios de origem vegetal.

Referências

CAPRINI, H. O. G. *et al.* Bicyclo [3.2.1] octanoid neolignans from plant sources: advances and perspectives. **Natural Product Research**, p. 1-16, 2026. DOI: https://doi.org/10.1080/14786419.2026.2700333.

CAVALCANTE, J. B. *et al.* From folk medicine to pharmacology: a systematic review of the anti-inflammatory evidence for *Hymenaea* spp. (Fabaceae). **Plants**, v. 14, n. 22, art. 3545, p. 1-18, 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/plants14223545.

DI SERIO, B. F. *et al.* Phytochemistry and evaluation of the anti-inflammatory activity of the hydroethanolic extract of *Virola elongata* (Benth.) Warb. stem bark. **Biology**, v. 13, n. 10, art. 776, p. 1-15, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/biology13100776.

HANÁKOVÁ, Z. *et al.* Anti-inflammatory activity of natural geranylated flavonoids: cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties and proteomic analysis. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 999-1006, 2017. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01011.

HASSANEIN, E. H. M. *et al*. The promising antioxidant effects of lignans: Nrf2 activation comes into view. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 397, n. 9, p. 6439-6458, 2024. DOI: https://doi.org/10.1007/s00210-024-03102-x.

MIR, R. H.; MASOODI, M. H. Anti-inflammatory plant polyphenolics and cellular action mechanisms. **Current Bioactive Compounds**, v. 16, n. 6, p. 809-817, 2020.

PÉREZ-SALAS, J. L. *et al. In vitro* and *ex vivo* models for screening topical anti-inflammatory drugs. **Scientia Pharmaceutica**, v. 91, n. 2, art. 20, p. 1-15, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/scipharm91020020.

SANTOS, M. F. C. *et al.* Ex vivo inhibition of PGE2 formation in human blood by four bicyclico [3.2.1] octane neolignans isolated from *Aniba firmula* bark, two with unusual structural pattern. **Natural Product Research**, v. 38, n. 3, p. 393-401, 2024. DOI: https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2124248.

SANTOS, M. F. C. *et al*. New bicyclic [3.2.1] octane neolignan derivative from *Aniba firmula*. **Natural Product Research**, v. 37, n. 7, p. 1217-1220, 2023. DOI: https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1990279.

SANTOS, M. F. C. *et al*. New bicyclic [3.2.1] octane neolignans derivatives from *Aniba firmula* with potent *in vivo* anti-inflammatory activity on account of dual inhibition of PGE2 production and cell recruitment. **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 31-37, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.01.014.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes) e à CAPES pelo financiamento para a realização do trabalho proposto e à Universidade Federal de Alfenas pela parceria.