



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

# IJDR

International Journal of Development Research  
Vol. 10, Issue, 04, pp. 35336-35341, April, 2020  
<https://doi.org/10.37118/ijdr.18666.04.2020>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

## BIOATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO VEGETAL EXTRAÍDO DA COPAIFERA MULTIJUGA

<sup>1</sup>Matheus Santana Pessoa, <sup>1,2,3</sup>Mateus Goulart Alves, <sup>1</sup>Vanessa Fernandes Mendonça Marciano, <sup>2</sup>Larissa Costa Oliveira, <sup>2</sup>Sérgio Ricardo Ambrósio, <sup>2</sup>Regina Helena Pires Gonçalves, <sup>1</sup>Marlon Vilela de Britos and <sup>1,2\*</sup>Marco Túlio Menezes Carvalho

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Passos, Passos/MG, Brasil

<sup>2</sup>Universidade de Franca, Franca/SP, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade Atenas – Campus Passos, Passos/MG, Brasil

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 18<sup>th</sup> January, 2020

Received in revised form

11<sup>th</sup> February, 2020

Accepted 17<sup>th</sup> March, 2020

Published online 30<sup>th</sup> April, 2020

#### Key Words:

Bioatividade, *Copaifera multijuga*,  
Coagulação, Antimicrobiano.

\*Corresponding author: Marco Túlio Menezes  
Carvalho,

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do óleo da *Copaifera multijuga* sobre a coagulação sanguínea como um possível agente anticoagulante e sua ação antimicrobiana. A atividade anticoagulante do óleo foi mensurada através de ensaios “*in vitro*” utilizando Plasma Pobre em Plaquetas para a determinação do Tempo de Protrombina e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. O óleo prolongou o Tempo de Protrombina em 1,2 vezes na concentração de 0,5 mg, entretanto, o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada prolongou 5,7 e 1,3 vezes quando utilizada as concentrações de 0,5; 0,125mg respectivamente. A atividade antimicrobiana, foi testada a partir de diferentes concentrações do óleo de *Copaifera multijuga* e discos contendo Penicilina 50mg foi utilizado como controle. Após 24 horas, os halos de inibição, quando formados, foram medidos e comparados com os controles para demonstrar a inibição e crescimento conforme a concentração de extrato contida em cada um. Os resultados mostraram que o extrato utilizado nas concentrações de 0,5; 0,1; e 0,1 µg/ml foram as concentrações capazes de inibir o crescimento da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, respectivamente. Os resultados indicam que o óleo extraído *Copaifera multijuga* pode ser útil para estudos futuros em modelos de coagulação e antibacteriano.

Copyright © 2020, Bruno Bender Daubermann et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Matheus Santana Pessoa, Mateus Goulart Alves, Vanessa Fernandes Mendonça Marciano, Larissa Costa Oliveira, Sérgio Ricardo Ambrósio, et al. 2020. “Bioatividade anticoagulante e antimicrobiana do óleo vegetal extraído da *Copaifera multijuga*”, *International Journal of Development Research*, 10, (04), 35336-35341.

## INTRODUÇÃO

Em condições fisiológicas o sistema hemostático humano é composto por três componentes principais: parede vascular, plaquetas e sistema de coagulação do plasma. Enquanto a parede vascular mantém a fluidez do sangue por manter a fibrinólise e inibir a agregação plaquetária, o endotélio serve como uma barreira protetora que separa as células sanguíneas e os fatores plasmáticos dos elementos reativos, fator tissular e fator de Willebrand, das camadas internas dos vasos sanguíneos (COLMAN et al.; 1994). No Brasil, país que abriga uma das maiores biodiversidades vegetais do mundo, a utilização de plantas da flora nativa para fins medicinais é realizada com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, bem como com ausência do conhecimento de seus constituintes químicos

responsáveis por tais atividades (MACIEL et al., 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2005). Atualmente no Brasil, o principal órgão que regula o uso de plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no qual a legislação em vigor para o desenvolvimento de fitomedicamentos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 14/2010, a qual determina a necessidade da comprovação da segurança, eficácia e qualidade de produtos vegetais antes de serem comercializados e utilizados pela população (BRASIL, 2010; CARVALHO et al., 2008). Dentre todas as plantas medicinais comumente utilizadas pela população brasileira, as árvores do gênero *Copaifera*, conhecidas popularmente como “copaibas, copaibeiras ou pau d’óleo”, podem ser destacadas em função de suas aplicações farmacológicas historicamente comprovadas pela medicina popular (Veiga Junior et al., 1997; Veiga Junior; Pinto, 2002).

Estudos científicos desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa têm comprovado a eficácia farmacológica destes bálsamos. As propriedades anti-inflamatória e antitumoral *in vitro* e *in vivo* e antimicrobiana são claramente evidenciadas para diversas espécies de *Copaifera*. Todos estes trabalhos enfatizam estas fontes naturais como promissoras para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios (BASILE *et al.*, 1988; CARVALHO *et al.*, 2005; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2010), antitumorais (OHSAKI *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2008), bem como para o tratamento de importantes doenças infecciosas (TINCUSI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2008). Outras atividades biológicas marcantes, como leishmanicida (SANTOS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2010), tripanocida (MACIEL *et al.*, 2002), inibidora de radicais livres (DESMARCHELIER *et al.*, 1997), analgésica (CARVALHO *et al.*, 2005), cicatrizante (PAIVA *et al.*, 2002; VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002), efeito gastroprotetor (TAPPIN *et al.*, 2004), entre outras são cientificamente certificadas corroborando com as principais utilizações populares da oleorresina das espécies de *Copaifera*.

A *Copaifera multijuga* popularmente conhecida como copaíba ou copaibera, pertence à família Leguminosae, é encontrado por todo o território brasileiro. É uma árvore de grande porte, que pode chegar até 36 metros de altura e dentro as características mais marcantes desta espécie, podemos citar sua incrível capacidade produzir sementes, cerca de 2 a 3 Kg de sementes são produzidos dentro os meses de janeiro a agosto. Essa espécie apresenta um forte aroma proveniente de sua casca, assim sendo identificada pelos animais silvestres que se alimentam de seus frutos (MENDONÇA, ONOFRE; 2009). Popularmente é conhecida por diversos nomes em todo o território brasileiro, como: capauba e balsámo no Mato Grosso do Sul, copaibeira, copaúba, no estado de São Paulo, pau-óleo e pau-óleo do sertão, na Bahia, oleiro, cupiúva no Mato Grosso e em Minas Gerais é conhecida popularmente como copaíba vermelha, copaíba preta e copaíba da várzea (SILVA, SCUDELLER 2009). Plantas medicinais da região do Norte do Brasil são amplamente utilizadas na medicina popular pelas comunidades. Todavia pouco se sabe sobre os princípios ativos responsáveis pelos efeitos fitoterápicos, do óleo de Copaíba utilizadas para o tratamento da inflamação ou também na coagulação. Nos últimos anos, o interesse por estas plantas, utilizadas como remédios na medicina popular aumentou consideravelmente em todo o mundo, especialmente no Brasil, uma vez que estudos experimentais têm confirmado as suas propriedades terapêuticas relatadas. As drogas inibidoras da coagulação utilizadas no momento para terapêutica das trombooses apresentam uma série de desvantagens e, como já foi referida, nenhuma é suficientemente ativa e segura, sendo descrita a resistência a sua ação e alto risco hemorrágico (HAMILTON, 2009). Esses motivos têm levado a uma intensa pesquisa com a finalidade de conseguir antitrombóticos ideais, eficazes, sem risco hemorrágico, com poucos efeitos colaterais, de fácil administração (WEITZ; BATES, 2005), justificando as pesquisas por novas drogas e/ou compostos com potenciais terapêuticos. Diante disso, este estudo buscou avaliar a ação do oleorresina vegetal extraído da *Copaifera multijuga* sobre a coagulação sanguínea e seu efeito como antimicrobiano.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do projeto, o oleorresina da espécie de *Copaifera* proveniente da região amazônica foi gentilmente

cedido pelo Professor Doutor Sérgio Ricardo Ambrósio, coordenador do programa de pós-graduação em Ciências da Universidade de Franca - UNIFRAN do estado de São Paulo e do Grupo de Pesquisas em Produtos Naturais da Unifran (GPNUF). A pesquisa somente deu início após a aprovação do Comitê de Ética da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) – Belo Horizonte. O protocolo foi inscrito na plataforma Brasil sobre o número CAAE 67028717.0.0000.5525, no ano de 2017. Após o parecer favorável pelo número 2.031.912 foi feita a solicitação aos interessados para participar da pesquisa, onde foi pedido que assinassem duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Para os ensaios de coagulação TP e TTPa foram utilizados plasmas sanguíneos humanos (“pool” de 15 doadores). O plasma de cada paciente foi testado individualmente a fim de confirmar se o indivíduo não possui problema de coagulação, descartando pacientes que fazem uso de anticoagulante. Todos os ensaios foram realizados com diferentes concentrações do ácido gálico diluído em NaCl 0,9% partindo da concentração inicial de 1mg/ml, para a determinação de uma curva dose resposta para verificar a melhor dose com possível efeito anticoagulante. Foi realizado o grupo controle (veículo) com NaCl 0,9%.

O sangue de humanos (“pool” de quinze doadores voluntários) para o ensaio de coagulação foi coletado por punção venosa na veia basilica em seringa contendo 1/10 volumes de solução de citrato de sódio 3,8%. A coleta foi realizada lentamente evitando a hemólise do sangue. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3000g durante 10 minutos a 25°C para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). O plasma foi dividido em pequenas frações e estocados em freezer -80 °C para a posterior realização dos ensaios. A determinação do tempo de protrombina foi realizada com a utilização do kit de reagente TP CLOT, seguindo a metodologia indicada pela bula do fabricante. A determinação do TP foi feita da seguinte maneira:

Em um tubo padronizado aquecido a 37°C foi adicionado 50 µl de plasma e 50 µl da substância de estudo. Após a incubação a 37°C, durante 60 segundos, 50 µl de tromboplastina foram adicionados, acionando o cronometro. As medidas foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos pelo tempo obtido nos diferentes testes de plasmas. Os resultados foram expressos em segundos sendo o tempo máximo do ensaio 300 segundos. A determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada foi realizada com a utilização do kit de reagente TPPa CLOT, seguindo a metodologia indicada pela bula do fabricante. A determinação do TTPa foi feita, da seguinte maneira:

Em um tubo padronizado aquecido a 37°C foram adicionados 50 mL de plasma, 50 mL de cefalina na presença de 50 mL das substâncias em estudo. Após a incubação a 37°C, durante 120 segundos, foram adicionados 50 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,025 M), aquecido previamente a 37°C, sendo acionado simultaneamente o cronometro. As medidas foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos pelo tempo obtido nos diferentes testes de plasmas. Os resultados foram expressos em segundos sendo o tempo máximo do ensaio 300 segundos. Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato da óleo resina da *Copaifera multijuga* foram utilizados microrganismos padrão, ou seja, cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) cedidos por um hospital de grande porte do interior de Minas Gerais.

Os microrganismos utilizados foram o *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (ATCC 19433) e *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC 11229). Os microrganismos foram repicados em ágar Müller - Hinton e incubados a 37°C por 24 horas antes do experimento. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada baseada pelo método da diluição em ágar conforme recomendação do NCCLS (2003). Para o preparo do inóculo, as culturas de cada microrganismo foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de salina estéril até obtenção de turbidez equivalente a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, com auxílio de um swab estéril, as técnicas de semeadura foram realizadas, nas placas de Ágar Muller – Hinton, mediante duplicatas, adicionando os discos estéreis de papel filtro. Após a adição dos discos, foram pipetados 5 µl das concentrações 10 µg/mL; 5,0 µg/mL; 2,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 0,5 µg/mL e por fim 0,1 µg/mL, adicionando também 1 disco controle, sendo utilizado a Penicilina G 50 µg. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Foi considerada CIM a menor concentração dos extratos que inibir o desenvolvimento microbiano. A comparação feita entre os diferentes grupos, nos modelos utilizados neste trabalho foram expressos como média ± desvio padrão da média (eEPM.) e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA). O índice de significância considerado foi determinado por Kruskal-Wallis e complementado pelos testes de comparações múltiplas de Dunn o índice fixado foi de (5%)  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Concentração inibitória mínima (CIM):** A técnica da microdiluição utilizada para a determinação da CIM das oleorresinas é um método eficaz para a avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais (ALVES *et al.*, 2008), sendo também um processo confiável e de baixo custo, fornecendo assim, dados quantitativos (BONA *et al.*, 2014) e reprodutíveis (OSTROSKY *et al.*, 2008). Para validação da técnica foi utilizado como controle positivo a Penicilina (PEN 50 µg/disco) e o controle do solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% não interferiu na atividade microbiana. No presente estudo foi avaliado o efeito do óleo de *Copaifera multijuga* contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os microrganismos testados no presente estudo são causadores de doenças gastrointestinais como a *E. coli* e *E. faecalis*, como também bactérias presentes na microbiota normal dos seres humanos como por exemplo a cepa *S. aureus*. Foram utilizados ensaios de CIM, validando o grande efeito biológico citado em alguns estudos promissores com a oleorresina de copaíba sobre alguns microrganismos. Os resultados da CIM pelos halos de inibição que variaram de 10 a 0,1 mg/mL frente às bactérias ATCC adquiridas comercialmente estão apresentados na tabela 1. O extrato do óleo apresentou atividade significante em todas as concentrações testadas frente à bactéria *S. aureus* (ATCC 25923) revelando um efeito bactericida bastante significativo, já frente à bactéria *E. coli* (ATCC 11229). e *E. faecalis* (ATCC 19433), o efeito foi bactericida em algumas concentrações e bacteriostático em outras. Segundo Ríos e Recio (2005) só é considerado um resultado promissor quando a atividade antibacteriana de extratos brutos de plantas ocorra em concentrações iguais ou inferiores a 100,0 µg/mL, que equivale a 0,1 mg/mL. Ainda de acordo com estudos, e em caso de extratos, existe a definição de uma ampliação deste critério, sendo considerada "boa atividade" quando o CIM for menor ou igual a 100,0 µg/mL, "moderada" se o CIM for maior que 100,0 e menor que 500,0

µg/mL e "inativa" quando o CIM for maior que 500,0 µg/mL. Diante disso, o óleo de copaíba apresentou uma atividade satisfatória ou classificada como boa atividade contra os microrganismos *S. aureus* e *E. faecalis*, por apresentarem CIM igual 0,1 mg/ml, já a ação do óleo na cepa de *E. coli* foi considerada como moderada, como mostra a Tabela 2. Esse estudo corrobora com o estudo de Mendonça e Onofre (2009), onde foi encontrado resultados semelhantes para a CIM nas diluições do óleo de *Copaifera multijuga* de 0,015 mg/mL para a *E. coli*, 0,31 mg/mL para a bactéria *S. aureus*. No presente trabalho, as CIM encontradas com o óleo de *Copaifera multijuga* nas concentrações já mencionadas tem mostrado a atividade do extrato sobre o crescimento bacteriano, sendo assim, os dois trabalhos mostra a eficácia do extrato. Os resultados descritos acima apontam um grande efeito antimicrobiano do óleo extraído da *Copaifera multijuga* sobre diversas espécies de bactérias. Sabemos que atualmente o surgimento de cepas super-resistentes tem se tornado algo comum, onde o tratamento e controle desses microrganismos é algo muito difícil. A resistência bacteriana é motivo de preocupação por todo mundo, sendo descrita em quase todas as espécies de microrganismos, e o fenômeno da resistência é considerado muitas das vezes originado de forma natural. Atualmente tem sido objeto das mais recentes publicações sobre antimicrobianos, pois tais substâncias afetam não apenas o seu usuário, mas todo o ecossistema onde ele está inserido (MARINHO *et al.*, 2017).

Essa resistência é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no germe durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o ADN cromossômico, responsáveis pelo código genético. A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível. Esta resistência faz-se através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados nos plasmídios (MARINHO *et al.*, 2017). A partir disso, um dos maiores desafios da indústria farmacêutica é descobrir e produzir novas drogas antimicrobianas a fim de acabar com esses patógenos e substâncias extraídas de produtos naturais podem ser fontes promissoras com essa finalidade. Quando avaliamos a atividade do óleo resina sobre o crescimento da *E. coli*, podemos observar que a maior inibição de seu crescimento ocorreu na concentração de 10 mg/µL, havendo a formação de um halo de inibição de 31 mm; conforme os valores das diluições foram declinando, o tamanho dos halos de inibição caíram também, chegando a 15 mm na concentração de 0,5 mg/µL. Outro estudo realizado por Pieri; Mosse; Moreira (2011) observou-se a ação do extrato de *Copaifera langsdorffi* sobre a *E. coli*, onde foi formado um halo de 30 mm de inibição da bactéria na diluição de 10 mg/mL, ratificando que, o gênero copaíba, possui intensa atividade sobre a bactéria *E. coli*. Comparando os resultados obtidos com o antibiótico utilizado como controle, a Penicilina (PEN 50 µg/disco), pode concluir que a óleo resina extraído da *Copaifera multijuga* teve uma ação mais eficaz que a penicilina no combate com a *E. coli*, uma vez que, não houve inibição por parte do antibiótico. Avaliando os resultados também obtidos com a bactéria Gram positiva, *E. faecalis*, a óleo resina também mostrou atividade sob a inibição do seu crescimento. O maior halo de inibição obtido foi com a diluição de 10 mg/mL, formando um halo de 49 mm. Também é

Tabela 1. Concentrações do óleo resina e halos formados expresso em milímetros

Concentração do óleo	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
10 mg/mL	31 mm	60 mm	49 mm
5,0 mg/mL	21 mm	58 mm	41 mm
2,5 mg/mL	24 mm	54 mm	38 mm
1,0 mg/mL	18 mm	52 mm	36 mm
0,5 mg/mL	15 mm	50 mm	32 mm
0,1 mg/mL	0 mm	44 mm	15 mm
Controle - Penicilina	0 mm	> 60 mm	40 mm

Tabela 2. Concentração inibitória mínima e valores dos halos de inibição dos microrganismos estudados

Microrganismo	CIM	Halo Formado
<i>Escherichia coli</i>	0,5 mg/mL	15 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1 mg/mL	44 mm
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,1 mg/mL	15 mm

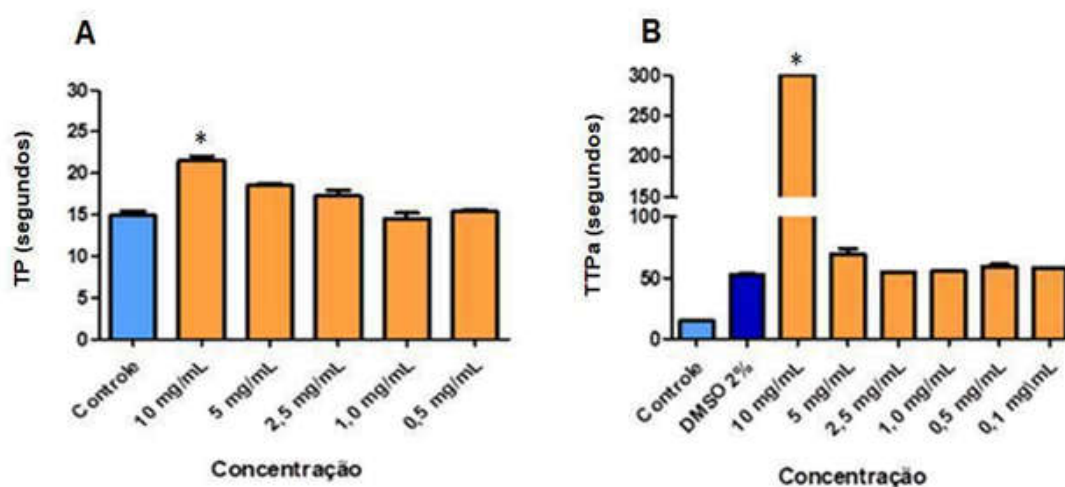


Figura 1. A e B. Ação da óleos resina sobre as via intrínseca e extrínseca da coagulação.

possível observar que, o óleo de copaíba foi mais eficaz, na diluição de 10 e 5mg/mL do que a penicilina utilizada como controle, apesar do antibiótico apresentar uma concentração menor que a do extrato utilizado. Em um estudo realizado por Madson *et al.* (2013), após utilizar a óleo resina extraída da *Copaiferalangsdorffi* sobre a bactéria *E. faecalis*, observou a formação do halo de inibição de 20 mm na concentração de 1,56 mg/mL, portanto, a *Copaifera multijuga* possui maior atividade antimicrobiana sobre a *E. faecalis* de acordo com os resultados obtidos.

**Efeito do óleo de copaíba na coagulação “in vitro”:** Para o estudo da ação anticoagulante do óleo *Copaifera multijuga* *in vitro* foram analisados o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), utilizando um “pool” de plasma humano de 15 doadores voluntários. A coagulação sanguínea é a transformação do sangue de um líquido para um gel sólido. O passo principal na formação do coágulo é a conversão do fibrinogênio em fibrina insolúvel. Essa conversão é catalizada pela enzima trombina no local do ferimento. Esta enzima está presente no plasma na sua forma inativa chamado de protrombina. Para que haja essa conversão, vários fatores da cascata de coagulação são ativados. Esses fatores são designados por numerais romanos na ordem em que foram descobertos. Quando o primeiro fator da sequência é ativado, ele aciona por sua vez, o fator seguinte, e assim por diante, em uma série de reações até que a trombina catalise a conversão final do fibrinogênio em fibrina (SHERWOOD, 2011).

A cascata de coagulação pode ser ativada de duas maneiras: via intrínseca, quando o fator XII é ativado pelo contato com o colágeno exposto em uma superfície vascular lesionada ou pelo contato com superfície estranha, causando coagulação dentro dos vasos sanguíneos. A via extrínseca é ativada pela tromboplastina de tecido liberada pelo tecido danificado, causa coagulação do sangue no tecido ao redor do ferimento. A partir do fator X que ativa a protrombina em trombina, as duas vias são idênticas (SHERWOOD, 2011; GENTRY, 2003). Os resultados obtidos mostraram que o TP do plasma humano foi alterado significativamente pelo óleo de *Copaifera multijuga* na concentração de 10 mg/mL. Entretanto as concentrações de 5; 2,5; 1,0; e 0,5 mg/mL não prolongou de forma significativa o TP. Por outro lado, o teste do TTPa também foi prolongado pelo óleo *Copaifera multijuga* na concentração de 10 mg/mL a valores superiores a 300 segundos demonstrado na figura 1 A e B respectivamente. Demonstram o efeito da substância estudada sobre o TP e TTPa no plasma humano, onde \* $p < 0,05$  e \* $p < 0,001$  respectivamente. Valores de referência: TP 11 a 16 segundos e TTPa 25 a 36 segundos. Segundo o kit comercial CLOT, evita a restrita especificidade das enzimas da coagulação é fácil entender por que poucos inibidores isolados de plantas são capazes de bloquear suas atividades (OLIVA; SAMPAIO, 2008; BRITO *et al.*, 2014). Como a tripsina e a quimotripsina, as enzimas da coagulação do sangue são serinopeptidases, porém, ao contrário da tripsina, as peptidases da cascata da coagulação, durante o curso da evolução, adquiriram um alto grau de especificidade e clivam apenas um número limitado de ligações peptídicas envolvendo resíduos de

aminoácidos básicos. O efeito do óleo resina prolongando o tempo de tromboplastina parcialmente ativada *in vitro*, indica ser a fase de contato inibida na presença da substância, que afeta as enzimas da via intrínseca da coagulação como a calicreína plasmática humana ou enzimas da via comum. O TP é utilizado para detectar deficiências dos fatores pertencentes ao sistema extrínseco bem como e subsequente a via comum, permitindo revelar deficiências dos fatores que tomam parte neste sistema. Reflete alterações em três dos fatores dependentes da vitamina K (fator II, VII e X), do fibrinogênio e do fator V A elevação no TP nos experimentos realizados é um possível indicativo da ação do óleo sobre a via extrínseca da coagulação. O prolongamento dos tempos de TP e TTPa pela substância em estudo demonstram que o óleo possui um forte indicio para ser utilizado como anticoagulante, porém estudos mais detalhados da substância devem ser realizados para a caracterização da molécula ativa.

### Considerações Finais

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o óleo de *Copaifera multijuga* interfere na coagulação do plasma sanguíneo humano promovendo o aumento do tempo de protrombina e tempo de trombina parcialmente ativada, apontando que o extrato vegetal utilizado tem efeito sobre as via intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação. Conclui-se também que o óleo promove uma considerável inibição de bactérias causadoras de infecções gastrointestinais e principalmente sobre o *S. aureus*, que é um microrganismo que faz parte da microbiota normal dos seres humanos e que pode ser causador de infecções hospitalares. Gomes (2010) relata a capacidade da bactéria *S. aureus* de converter diretamente fibrinogênio em fibrina insolúvel, podendo causar "grumos" ou "clumping", devido a ação da enzima coagulase. A formação dessa rede de fibrina, próximo a infecção do *S. aureus*, impede que mesmo seja fagocitado pelo organismo. Como se observa no estudo, o extrato vegetal da *Copaifera multijuga*, possui intensa atividade sobre o *S. aureus*, causador de coagulação disseminada, podendo levar a trombose, que é um dos principais causadores de AVC, infarto do miocárdio e amputação de membros, devido a desordem da hemóstase. O prolongamento dos tempos de TP e TTPa pela substância em estudo demonstram que o óleo possui um forte indicio para ser utilizado como anticoagulante, porém o princípio ativo responsável por tal atividade na coagulação do plasma é desconhecido, assim estudos mais detalhados da substância devem ser realizados para a caracterização da molécula ativa.

### Agradecimentos

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Finance Code 001. The authors thank São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the financial support, grants 2011/13630-7.

### REFERENCIAS

Albuquerque, K.C.O. *et al.* Brazilian Amazon Traditional Medicine and the Treatment of Difficult to Heal Leishmaniasis Wounds with *Copaifera*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v.2017, 2017.

Alves, E. G; Vinholis, A. H; Cassemiro, L. A; Furtado, N. A. J. C; Silva, M. L. A.; Cunha, W. R.; Martins, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da

atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

- Basile A.C, Sertié J.A.A, Freitas P.C.D, Zanini A.C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian copaifera. *Journal of Ethnopharmacology*. v 22, p. 101-109, 1988.
- Bona, E. A. M; Pinto, F. G. S; Fruet, T. K; Jorge, T. C. M; Moura, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 81, n. 3, p.218-225, 2014
- Brasil, 2010. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução de Diretoria Colegiada no. 14 de 05 de abril de 2010*. Brasília, Brasil, 2010.
- Brito, M. V; Oliveira, C; Salu, B. R; Andrade, A. A; Paula, M. D; Sato, A. C; Vicente, C. P; Sampaio, M, U; Maffei, F. H. A; Oliva, M. L. V. The Kallikrein inhibitor from *Bauhinia bauhinoides* (BbKI) shows antithrombotic properties in venous and arterial thrombosis models, *Elsevier*, v.133, p, 945-951, 2014.
- Carvalho A.C.B; Balbino E.E; Maciel A, Perfeito J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 18, p. 314-319, 2008.
- Carvalho J.C.T; Cascon V; Possebon L.S; Morimoto M.S.S; Cardoso L.G.V; Kaplan M.A.C; Gilbert B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytotherapy Research*. v. 9, p. 946-950, 2005.
- Colman R.W. Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *J Clin Invest*. v. 5, p. 1249-1253.1994.
- Desmarchelier C; Coussio J; Ciccía G. Extracts of Bolivian plants, *Copaifera reticulata* and *Heisteria pallida* inhibit in vitro free radical-mediated DNA damage. *Phytotherapy Research*, v.11, p. 460-462, 1997.
- Gentry, P. A; Comparative aspects of blood coagulation. *Vet. J.*, London, v.198, p.238-251, 2003.
- Gomes N.M; Rezende C.M; Fontes S.P; Hovell A.M; Landgraf R.G; Matheus M.E; Pinto A.C, Fernandes P.D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Erlich tumor. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, p. 179-184, 2008
- Gomes N.M; Rezende C.M; Fontes S.P; Matheus M.E; PINTO A.C; Fernandes P.D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, p. 177-183, 2010.
- HAMILTON, J. R. Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy, *Blood reviews*, v. 23, p. 61-65, 2009.
- Lima S.R.M; Veiga Jr, V.F; Christo H.B; Pinto A.C; Fernandes P.D. In vivo and In vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 1048-1053, 2003.
- Maciel M.A.M; Pinto A.C; Veiga Jr, V.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 3, p. 429-438, 2002.
- Masson, D.S.; Salvador, S.L.; Polizello, A.C.M.; Frade, M.A.C.. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. *Rev. bras. plantas med*. v.15, n.4, p.664-69, 2013.
- Mendonça D.E; Onofre S.B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba - *Copaifera multijuga* Hayne

- (Leguminosae). *Rev. bras. Farmacogn*, João Pessoa , v. 19, n. 2b, p. 577-581, Junho 2009.
- Ohsaki, A; Yan L. T; ITO, S; Edatsugi H; Iwata D; Komoda Y. The isolation and in vivo potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 4, p. 2889-2892, 1994.
- Oliva, M. L. V; Sapampaio, M. U. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. *Bras. Cienc*, v. 81, p. 616-621, 2009.
- Ostrosky, E. A; Mizumoto, M. K; Lima, M. E. L; Kaneko, T. M; Nishikawa, S. O; Freitas, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- Paiva L. A. F; De Alencar CUNHA, K.M; Santos F.A; Gramosa N.V; Silveira E.R; Rao V. S. N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytotherapy Research*, v. 16, p. 737-739, 2002.
- Pieri, F.A.; Mussi, M.C.; Moreira, M.A.S.. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Rev. bras. plantas med.*, Botucatu , v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.
- Ríos, J. L; Recio, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.
- Santos A.O; Ueda-Nakamura T; Dis Filho B.P; Veiga Junior V.F; Pinto A.C; Nakamura, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaíba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 103: 277-281, 2008.
- Santos-Silva, E.N; Scudeller, V. V. Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central. v. 2, Manaus: UEA Edição, 2009. Capítulo 12, p 144-153
- Sherwood, Laurealee. Fisiologia humana das células aos sistemas. 7ª Edição norteamericana. São Paulo: CENGAGE Learning, p. 391-405, 2011
- Tappin, M. R. R; Pereira J. F. G; Lima. L. A; Siani, A. C; Mazzei, J. L; Ramos, M. F. S. Análise química para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Química Nova*, v. 27, p.236-240, 2004.
- Tincusi, B. M., Jiménez, I. A; Bazzocchi, I. L., Moujir, L. M., Mamani, Z. A., Barroso, J. P; Ravelo, A. G; Hernández, B. V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta Medica*, v. 68, p. 808-812, 2002.
- Vanni, D. S; Horstmann, B; Benjo, A. M, Daher, J. P.L; Kanaan, S; Sleiman M. Nitric oxide: inhibition of platelets and participation in thrombus formation. *J. Bras. Patol. Med. Lab* 43, 2007.
- Veiga Jr V.F, Pinto A.C. O Gênero *Copaifera*L. *Química Nova*25:273-286, 2002.
- Veiga Jr, V. F; Patitucci, M. L; Pinto A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova*, v. 20, p. 612-615, 1997.
- Veiga Jr, V. F; Pinto A. C; Maciel, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? *Química Nova*, v. 3, p. 519-528, 2005.
- Veiga Jr, V. F; Rosas, E. C; Carvalho, M. V; Henriques, M. G; Pinto, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Haynea comparative study, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, p. 248-254, 2007.
- WETZ, J. I; BATES, S. M. 2005. New anticoagulants, *J Thromb Haemost*, v.3, n. 8, p. 43-53.

\*\*\*\*\*