



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

VANESSA SILVA DE ALMEIDA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTIBACTERIANA E
IMUNOMODULADORA DO EXTRATO METANÓLICO DE *RHIZOPHORA MANGLE*
LINNEUS (RHIZOPHORACEAE)**

Recife, PE

2017

VANESSA SILVA DE ALMEIDA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTIBACTERIANA E
IMUNOMODULADORA DO EXTRATO METANÓLICO DE *RHIZOPHORA MANGLE*
LINNEUS (RHIZOPHORACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo.

Recife, PE

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Almeida, Vanessa Silva de

Investigação da atividade citotóxica, antibacteriana e imunomoduladora do extrato metanólico de *Rhizophora Mangle* Linneus (Rhizophoraceae) / Vanessa Silva de Almeida. – 2017.

93 f. : il.

Orientadora: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira.

Coorientadora: Cristiane Moutinho Lagos de Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Plantas medicinais 2. Toxicologia 3. Agentes anti-infecciosos I. Vieira, Jeymesson Raphael Cardoso (orientador) II. Melo, Cristiane Moutinho Lagos de (coorientadora) III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 016

VANESSA SILVA DE ALMEIDA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTIBACTERIANA E
IMUNOMODULADORA DO EXTRATO METANÓLICO DE *RHIZOPHORA MANGLE*
LINNEUS (RHIZOPHORACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 01/08/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Jeanne Cristina Lapenda Lins Cantalice (Examinadora Externa)
Centro Universitário Vale do Ipojuca Unifavip Devry

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

REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Profª. Drª. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR CENTRO DE BIOCÊNCIAS
Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MORFOTECNOLOGIA**
Profa. Dra. Sônia Leite

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MORFOTECNOLOGIA**
Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

**CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MORFOTECNOLOGIA**

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas	Profa. Dra. Juliana Pinto de Medeiros
Profa. Dra. Cláudia Sampaio de A. Lima	Profa. Dra. Kenia Valenca Correia
Prof. Dr. Claudio Gabriel Rodrigues	Profa. Dra. Luciana Maria S. de Seixas Maia
Profa. Dra. Eliete Cavalcante da Silva	Prof. Dr. Luiz Lucio Soares da Silva
Prof. Dr. Gilberto Gonçalves Rodrigues	Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros
Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza	Prof. Dr. Ricardo Yara
Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto	Profa. Dra. Rosa Valeria da S. Amorim
Prof. Dr. Jeymesson Raphael C. Vieira	Profa. Dra. Sônia Pereira Leite

*Dedico esta dissertação aos meus pais
Quintino e Fátima.*

AGRADECIMENTOS

À Deus que me concede todas as oportunidades em minha vida, me carrega no colo e protege de todo e qualquer mal. À Virgem Maria, que me cobre com seu manto Sagrado, guiando todos os meus paços e escolhas.

Aos meus pais Quintino e Fátima, que são minha base, que fazem o possível e impossível por mim. Meu muito obrigada por tudo.

Aos meus tios Daniel e Alda, e a minha prima Danyelle, por todo apoio e incentivo e por cada ajuda nesse momento.

A meu avô Espedito, minha avó Angelina, que cuidam, que torcem, que rezam, que me apoiam e incentivam a alcançar meus objetivos.

A minha tia Fatinha (Tete), que sempre me apoia em todas as decisões da minha vida.

A toda minha família que me ajudou e acolheu quando precisei.

A Carol e toda sua família, por todo apoio, carinho e atenção aqui em Recife. Por cada palavra de ensinamento, por cada abraço nas horas mais difíceis, por estarem sempre ao meu lado e se tornar meu porto seguro.

Ao Professor Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira, por ter me acolhido, ter me ajudado a dar os primeiros passos cientificamente na cidade de Recife. Por cada ensinamento e puxão de orelha que foram e são para o meu crescimento.

À Professora. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo pela orientação, amizade, conselhos, broncas, ensinamentos. Obrigada por ser essa orientadora/mãe, que está me ajudando e proporcionando esse meu crescimento pessoal e intelectual.

Ao LAIA, Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais, e a todos que fazem parte dessa família. Dayane, Bárbara, Letícia, Bruno, Miguel, por todo apoio, por não serem apenas colegas de trabalho, mas sim irmãos que ajudam e torcem pelo sucesso do seu próximo. À Amandinha, por todo incentivo e risadas nos momentos mais apreensíveis dos experimentos.

À todos os professores da Pós-Graduação em Morfotecnologia que colaboraram para a minha formação profissional.

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação em Morfotecnologia, em especial a Stella, pelo apoio durante todo o processo de formação.

Ao Dr. Wolfgang Harand e toda equipe do Instituto Nacional do Semiárido por todo auxílio e conhecimento acrescentado.

À toda equipe do laboratório de imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, Dr^a. Virginia Barros, Ma. Ana Karine Soares e Leyllane Moreira por toda colaboração e conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Thiago Napoleão por ter disponibilizado recurso para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a. Kesia Xisto e todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ensaio Antimicrobianos do Departamento de Antibióticos CB/UFPE pelo desenvolvimento do trabalho e pelos diversos esclarecimentos prestados.

*“Posso, tudo posso, Naquele que me
fortalece...”*

(Pe. Fábio de Melo)

RESUMO

Rhizophora mangle (Rhizophoraceae) é uma das espécies mais conhecidas dos manguezais, conhecida como mangue de caneta, tem sido utilizada na medicina popular para tratamento de diversas patologias. No entanto, investigações mais aprofundadas como a citotoxicidade e a atuação no sistema imunológico ainda são desconhecidas. Este estudo teve como objetivo realizar uma investigação mais aprofundada da atividade antibacteriana do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* (EMFRm) em bactérias Gram positivas e Gram negativas, bem como das atividades citotóxica e imunomodulatória em esplenócitos de camundongos tratados com EMFRm. Trata-se de um estudo pré-clínico desenvolvido no período de março de 2016 a junho de 2017. O material botânico foi coletado no Manguezal da cidade de Itamaracá, distrito de Vila Velha no estado de Pernambuco – Brasil, autorizado pela Empresa Pernambucana de Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos (CA DFRB N. 120/2014º). O extrato foi produzido a partir da extração de fluxo constante pelo método Low Bubble Point. A caracterização fitoquímica do extrato foi realizada pelo teste de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de gel de sílica para identificação dos metabólitos secundários. Os ensaios contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram realizados analisando a difusão em disco e os parâmetros de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (CMB). Os esplenócitos dos camundongos (10^6 células/poço) foram tratados com EMFRm em 50, 25, 10 e 5 µg/mL para a análise de viabilidade celular utilizando anexina V e iodeto de propídio. Após este teste, a concentração de 10 µg/mL foi escolhida para medição dos níveis de citocinas, análise de óxido nítrico e ensaio de proliferação celular com 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE). O EMFRm apresentou em sua composição a presença de flavonóides, saponinas, proantocianidinas poliméricas, monoterpenos e triterpenos. O EMFRm apresentou atividade antimicrobiana principalmente contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e contra *Pseudomona aeruginosa*. Os testes com os esplenócitos demonstraram que abaixo da concentração de 25 µg/mL o extrato pode ser usado com segurança para ensaios *in vitro* e que, em 10 µg/mL, as células foram estimuladas a produzir IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ e óxido nítrico. Além disso, o extrato é capaz de induzir proliferação nos esplenócitos. *Rhizophora mangle* apresentou atividade antibacteriana moderada, não

mostrou atividade citotóxica e apresentou atividade imunomoduladora em esplenócitos de camundongos induzindo o perfil Th1 e sugerindo um potencial terapêutico alternativo desta planta para tratamento de processos inflamatórios.

Palavras-chave: Plantas medicinais. *Rhizophora mangle*. Antibacteriano. Citotoxicidade. Imunomodulatório. Citocinas.

ABSTRACT

Rhizophora mangle (Rhizophoraceae) is one of the most well-known species of mangroves, known as red mangrove or pen mangrove, has been used in folk medicine for the treatment of several pathologies. This study aimed to investigate the antimicrobial activity of *Rhizophora mangle* (MELRm) leaf methanolic extract in Gram positive and negative bacteria, multiresistant and isolated from wounds and cytotoxic and immunomodulatory activities in human cells stimulated with MELRm. This is a preclinical study developed from March 2016 to June 2017. The botanical material was collected in the Mangue da Itamaracá, Vila Velha district in the state of Pernambuco - Brazil, authorized by Empresa Pernambucana de Control of Environmental Pollution and Water Resources Administration (CA DFRB N. 120 / 2014^o). The extract was produced from the constant flow extraction by the Low Bubble Point method. The phytochemical characterization of the extract was performed by the thin layer chromatography (CCD) on silica gel plates to identify the secondary compounds. The assays against Gram-positive and negative bacteria were performed by analyzing the disk diffusion and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CMB) parameters. Splenocytes from the mice (10⁶ cells) were treated with MELRm at 50, 25, 10 and 5 µg / ml. Cell viability analysis was performed by the annexin V-FITC test and staining with propidium iodide at MELRm concentration of 50, 25, 12.5 and 6 µg / mL. Measurement of cytokine and chemokine levels in lymphocyte supernatants was performed by the CBA, in vitro nitric oxide analysis and proliferation assay with CFSE in vitro. Were performed for the immunological profile. MELRm presented flavonoids, saponins, polymeric proanthocyanidins, monoterpenes and triterpenes in their composition. MELRm showed antimicrobial activity mainly for Gram-positive bacteria *S. aureus* and for *Pseudomonas aeruginosa*. The 25 µg / mL concentration did not promote significant necrosis or apoptosis. IL-2, IL-6, TNF-α, INF-γ and nitric oxide were produced at higher values by MELRm and IL-4 stimulated mice splenocytes were produced in a smaller but statistically significant number. Based on these findings, it can be concluded that *Rhizophora mangle* presented moderate antibacterial activity according to MIC levels, did not show cytotoxic activity and presented immunomodulatory activity in mice splenocytes inducing the Th1 profile and suggesting an alternative therapeutic potential of this Plant for effective treatment of wounds. Conclusion: Based on these findings, it can be concluded that *Rhizophora*

mangle presented moderate antibacterial activity according to MIC levels, did not show cytotoxic activity and presented immunomodulatory activity in mice splenocytes inducing the Th1 profile and suggesting an alternative therapeutic potential of this Plant for effective treatment of wounds.

Key words: Medicinal plants. Rhizophora mangle. Anti-bacterial. Cytotoxicity. Immunomodulatory. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	REPRESENTAÇÃO EM FOTOS DE PARTES DA PLANTA <i>RHIZOPHORA MANLGE</i> .	23
FIGURA 2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC).	37
FIGURA 3	VIABILIDADE CELULAR NOS ESLENÓCITOS TRATADOS COM EMFRM EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	43
FIGURA 4	PERFIL DA PRODUÇÃO DE TNF- α , INF- γ , IL-2 E IL-6, PROMOVIDO POR EMFRM EM CULTURAS DE ESLENÓCITOS HUMANOS EM 24 E 48 HORAS DE ENSAIO.	44
FIGURA 5	LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PROMOVIDA POR EMFRM EM CULTURA DE ESLENÓCITOS DE CAMUNDONGOS.	45
FIGURA 6	ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO PROMOVIDO PELO EMFRM.	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	SISTEMAS DE ELUIÇÃO DE METABÓLITOS UTILIZADOS PARA TRIAGEM FITOQUÍMICA DO EXTRATO METANÓLICO DE FOLHAS DE <i>RHIZOPHORA MANGLE</i> (EMFRM).	34
TABELA 2	MICROORGANISMOS OBTIDOS DA COLEÇÃO DE MICROORGANISMOS DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS E UTILIZADOS PARA O ENSAIO ANTIMICROBIANO.	35
TABELA 3	ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO METANÓLICO DE FOLHAS DE <i>RHIZOPHORA MANGLE</i> OBTIDO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.	41
TABELA 4	TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO DE PAPEL REALIZADO COM EXTRATO METANÓLICO DE FOLHAS DA <i>RHIZOPHORA MANGLE</i> CONTRA CEPAS DE <i>S. AUREUS</i> E <i>P. AERUGINOSA</i> .	42

LISTA DE ABREVIATURAS

CBA	- Cytometric Bead Array
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CPqAM	- Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
EMFRm	- Extrato metanolico das folhas de <i>Rhizophora mangle</i>
H₂O₂	- Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	- Interferon gama
IL-2	- Interleucina dois
IL-4	- Interleucina quatro
IL-6	- Interleucina seis
IL-10	- Interleucina dez
IP	- Iodeto de propídio
MH	- Müller Hinton
MIC	- Concentração Inibitória Mínima
MBC	- Concentração Bactericida Mínima
NK	- Natural Killer
NO	- Óxido nítrico
O₂	- Ânion superóxido
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PBMC	- Células Mononucleares de Sangue Periférico
PS	- Fosfatidilserina
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute
TNF-α	- Fator de Necrose Tumoral alfa
TPP	- Techno Plastic Products

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DAS PLANTAS (MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS)	20
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO ECOSISTEMA MANGUEZAL	21
2.3 <i>RHIZOPHORA MANGLE</i>	22
2.4 RESPOSTA IMUNE E SUAS AÇÕES NA DEFESA CONTRA ANTÍGENOS DIVERSOS	24
2.5 USO DE EXTRATOS OBTIDOS DE PLANTAS NA IMUNOMODULAÇÃO	26
2.6 IMPORTÂNCIA DA INVESTIGAÇÃO DE MORTE CELULAR	27
3 JUSTIFICATIVA	30
4 OBJETIVOS	31
4.1 OBJETIVO GERAL	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5 METODOLOGIA	32
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
5.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	32
5.3 CASUÍSTICA	32
5.3.1 Critérios de inclusão	32
5.3.2 Critérios de exclusão	32
5.4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	33
5.4.1 Material Botânico	33
5.4.2 Extração de folhas de <i>Rhizophora mangle</i>	33
5.4.3 Análise cromatográfica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	34
5.4.4 Preparação dos testes antibacterianos	35
5.4.5 Obtenção dos esplenócitos	37
5.4.6 Análise da viabilidade celular	38
5.4.7 Medição da produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)	38
5.4.8 Análise <i>in vitro</i> de nitritos presentes nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos de camundongos	39
5.4.9 Ensaio de proliferação usando coloração com 5(6) - éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE)	39
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
6 RESULTADOS	41

6.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO METANÓLICO DE FOLHAS DE <i>RHIZOPHORA MANGLE</i> POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD).....	41
6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PROMOVIDA PELO EXTRATO METANÓLICO DE <i>R. MANGLE</i>	41
6.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DA VIABILIDADE CELULAR POR ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDIO	42
6.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS	43
6.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	44
6.6 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	45
7 DISCUSSÃO	47
8 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	64
ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	65
ANEXO B- COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	66
ANEXO C- NORMAS DA REVISTA.....	67
ANEXO D- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA.....	70
APÊNDICE	71
APÊNDICE A- ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA.....	72

1 INTRODUÇÃO

A natureza tem sido fonte de agentes medicamentosos com um número impressionante de substâncias ativas que podem ser isoladas a partir de fontes naturais tradicionalmente utilizadas com fins medicinais. As plantas medicinais exercem um papel indispensável na medicina moderna por serem fontes vegetais que produzem compostos primários e secundários. As plantas podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos com atividades terapêuticas eficientes podendo fornecer fármacos importantes, de difícil obtenção na via de síntese química, como por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis spp.* (digitálicos) e os alcalóides da *Papaver somniferum* (morfina) (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

As plantas medicinais estão presentes e distribuídas universalmente, inclusive em ambientes de manguezal. As espécies vegetais arbustivas ou arbóreas desses ambientes compartilham características fisiológicas e adaptações, assim permitindo períodos longos de exposição em água com alta salinidade, regime diário das marés, baixo teor de oxigênio e substratos inconsolidados (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000; REVATHI et al., 2013).

Rhizophora mangle (Rhizophoraceae), pertence a um amplo gênero presente nas Américas, África, Ásia, Madagascar e Austrália. Conhecida como mangue vermelho (devido ao alto teor de compostos polifenólicos presentes na casca) é uma das espécies mais prevalentes no ecossistema brasileiro. Extratos desse mangue são amplamente conhecidos na medicina popular e apresentam propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias, cicatrizantes, gastroprotetoras, antiúlcero-gástrico e atividade anti-viral. As propriedades medicinais publicadas com a *Rhizophora mangle* são hemostáticas, febrífugas, antifúngicas, antibacterianas e cicatrizantes (PERERA et al., 2001; MELCHOR et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2002; ANNAPOORANI et al., 2013; DAT et al., 2015).

A presença majoritária de compostos polifenólicos como os flavonóides nesta espécie, justifica grande atividade anti-inflamatória e antioxidante em algumas patologias. Marrero et al. (2006) mostraram que o extrato aquoso da casca da *R. mangle* possui potencial anti-inflamatório *in vitro* na inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) e fosfolipase A2, enzimas participantes do processo inflamatório (SÁNCHEZ et al., 2005; BERENGUER et al., 2006). Sánchez et al. 2005, mostraram que a atividade

antioxidante atribuída a este composto é a capacidade de quelar íons de ferro e indicaram que o tratamento com o extrato da *R. mangle* em ratos, sob estresse oxidativo, aumentou a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase, enzimas responsáveis pela proteção contra danos oxidativos e hemólise.

Neste estudo avaliamos a atividade antibacteriana da *R. mangle* em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes isoladas de feridas, além do perfil citotóxico e imunomodulador do extrato metanólico de *R. mangle* contra esplenócitos de camundongos estimulados *in vitro* por 24h visando promover estudos moleculares iniciais para prover bases científicas e seguras através de ensaios pré-clínicos para uso potencial em fases terapêuticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DAS PLANTAS (MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS)

Terapia das plantas ou fitoterapia, diz respeito ao estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura e/ou tratamento de patologias diversas (ROSSATO et al., 2012). Para o tratamento de diversas patologias a utilização de plantas medicinais é tradicional na cultura mundial e os serviços de saúde devem estar voltados para aceitar e aproveitar esse conhecimento popular. A Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC) nº 26 classifica os fitoterápicos como produtos obtidos de matéria prima ativa vegetal, não considerando aqueles que incluam substâncias ativas isoladas na composição, nem associações das mesmas com os extratos vegetais. Todos os levantamentos etnofarmacológicos quanto à eficácia e a segurança são validados através de documentações tecnocientíficas divulgadas em publicações ou ensaios clínicos (BRASIL, 2014).

Os medicamentos fitoterápicos são produzidos a partir de plantas secas ou frescas por vários métodos, tais como: maceração, destilação, percolação, e outras técnicas. As qualidades do fitoterápico podem ser alcançadas se todas as etapas de processamento da matéria-prima vegetal do produto final conservar o constituinte ativo e as substâncias sinérgicas (COSTA et al., 2008; ROSSATO et al., 2012).

De fato, a fitoterapia apresenta uma grande diversidade de moléculas encontradas em um mesmo produto (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001). Os fitoterápicos podem ser obtidos de maneira sustentável, são ecologicamente aceitos (COSTA et al., 2008) e apresentam-se como uma alternativa para os agricultores que optam pelo sistema orgânico de produção.

As propriedades farmacológicas das plantas medicinais dependem dos seus compostos secundários, conhecidos também como metabólitos secundários, produzidas pelas plantas que são geralmente classificados de acordo com suas vias biossintéticas, sendo os compostos nitrogenados, compostos fenólicos ou fenóis e terpenos ou terpenóides (CUNHA et al., 2016), considerados como três grandes famílias de moléculas bioativas (BEHLING et al., 2004; PERERA e CARDOSO, 2012).

A origem dos metabólitos secundários envolve o metabolismo da glicose via dois intermediários principais: o ácido acetato e o chiquímico. O ácido chiquímico é

precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, compostos estes que tem em comum um anel aromático em sua constituição. Já os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos, compostos fenólicos, terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos. Geralmente a estrutura dos metabólitos secundários é complexa, com baixo peso molecular, com atividades biológicas e diferentemente dos metabólitos primários, apresentam poucas concentrações em determinados grupos de plantas (SIMÕES et al., 2010; SILVA e LIMA, 2016).

Os metabólitos secundários são diretamente influenciados pelo local de ocorrência, solo, temperatura, salinidade, poluição ambiental, processo de herbivoria e alguns fatores fenotípicos faz com que a mesma planta tenha funções diferentes em locais diferentes. (EDREVA et al., 2008; SILVA et al., 2010). Além disso, a utilização de solventes orgânicos ou inorgânicos extraem metabólitos com diferentes polaridades a partir de plantas medicinais, configurando diferentes atividades biológicas (SILVA et al., 2010; TAN et al., 2011).

Assim a fitoterapia vem se tornando conhecida mundialmente e vem sendo reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas no desenvolvimento de drogas terapêuticas (COSTA, 2015). Entretanto, há a falta de divulgação para população, com informações adequadas sobre as propriedades destas plantas. Alertando sobre o consumo associado aos medicamentos alopáticos sem consentimento do médico e a existência das plantas tóxicas. Esses conjuntos de fatores demonstram a necessidade de pesquisas e projetos que busquem informar a população sobre o uso adequado das plantas medicinais (MARTINS e GARLET, 2016).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO ECOSISTEMA MANGUEZAL

A palavra manguezal descreve ecossistemas costeiros, de transição entre o ambiente marinho e terrestre, sendo característico de regiões subtropicais e tropicais. Tal ecossistema oferece uma variedade de benefícios ambientais, como fornecimento de recursos animais e vegetais para população ribeirinha, retenção de sedimentos, substâncias químicas e proteção das margens do estuário, bem como interações com ecossistemas marinho e fluvial. (BARROS, et al., 2000; SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000; REVATHI et al., 2013).

As plantas do manguezal, produzem metabólitos com características químicas peculiares que ainda não são conhecidas ou pouco estudadas, o que possibilita o desenvolvimento de novos compostos com atividade biológica, dando suporte ao surgimento de novas drogas de origem natural. A maioria dos fármacos em uso clínico tem sido elaborado a partir dos metabólitos secundários provenientes de produtos naturais ou por meio de composições químicas planejadas a partir destes, comprovando que a junção entre a química dos produtos naturais e a química medicinal se tornam um eficaz instrumento para a descoberta de novos fármacos (BANDARANAYAKE, 2002; ANDRADE et al., 2012; MARTINS et al., 2016).

Os manguezais ocupam uma área estimada de 181.000 km² e as regiões biogeográficas com mais diversidades incluem a Austrália, Indonésia, Nigéria, o Indo-Oeste Pacífico e Brasil (BURANELLI, 2016). Já no Brasil, os manguezais são encontrados desde o extremo norte (Oiapoque 04°30'N) no Amapá até Santa Catarina (Laguna 28°30'S), correspondendo aproximadamente 6.000 km (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

Devido a sua posição geográfica, o estado de Pernambuco, apresenta uma das menores faixas litorâneas da costa brasileira. Uma área de 23.973 hectares é ocupada por mangue, e a maioria localizado nos municípios de Itapissuma, Igarassu, Goiana e Itamaracá, nas margens do Canal de Santa Cruz (7° 40' S e 7° 50' S de Latitude; 34° 50' e 34° 54' de Longitude) (BARROS et al., 2000).

As principais espécies encontradas no mangue pertencem a quatro gêneros: (*Rhizophora mangle* L. – Rhizophoraceae, *Avicennia schaeuriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke e *Avicennia germinans* (L.) Stearn – Acanthaceae, *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn. – Combretaceae) e *Conocarpus erectus* (Combretaceae) (PIL et al., 2011).

2.3 RHIZOPHORA MANGLE

Rhizophora mangle (Figura 1A-C) também conhecida como mangue vermelho ou mangue de caneta, é amplamente distribuída na região de mangue das costas tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, Flórida, África Ocidental e nas ilhas de Fidji, Tonga e Nova Caledônia (CHEN Y., et al. 2015). Pertencente ao reino Plantae da classe Magnoliopsida, ordem Malpigiales, filo Tracheophyta, família Rhizophoraceae e gênero: *Rhizophora*. Atinge uma altura aproximada de dez metros

ou mais, suas raízes impenetráveis e longas formam moitas (Figura 1A); tem folhas variando de cinco a 15 cm de comprimento, arredondadas ou elípticas (Figura 1B) com duas a quatro flores e pedúnculo (Figura 1C) variando de 6 a 10 mm de comprimento (COELHO-FERREIRA, 2009).

Caule, frutos, raízes e folhas de *R. mangle* apresentam uso na medicina tradicional, sendo empregada em tratamentos de diversas patologias como: diabetes, hemorroidas, dor de dente e problemas estomacais (CARNEIRO et al. 2010). Vários estudos comprovaram atividades em úlceras gástricas (PERERA et al., 2010; DE-FARIA et al., 2012), anti-inflamatória (MARRERO et al., 2006), cicatrização de feridas cutâneas (FERNANDEZ et al., 2002), antioxidante (SÁNCHEZ et al., 2006), antidiarréico (WENDEL et al., 2013) e antibiótico (MELCHOR et al., 2001). Esta planta pode ser uma importante fonte de novos produtos destinados a solucionar problemas de saúde de grande relevância atual.

Figura 1. Representação em fotos de partes da planta *Rhizophora mangle* L. **A-** Raízes impenetráveis; **B-** Folhas; **C-** Pedúnculo.



Fonte: O autor (2017)

Sánchez et al (2005) caracterizaram a composição química da *Rhizophora mangle* L. do manguezal de Cuba, e evidenciaram a presença de polifenóis (54,70%), representados principalmente pela maioria de taninos poliméricos (80%) e taninos hidrolisáveis (20%), destacando ainda a presença de catequinas, epicatequinas, ácido clorogênico, ácido elágico e ácido gálico. Já em 1999, William isolou e caracterizou o taraxerol, um triterpenóide a partir de folhas e caule da *Rhizophora mangle*. Outros estudos com extratos de caule e folhas da *Rhizophora racemosa*, *Rhizophora apiculata* e *Rhizophora mucronata* demonstraram a presença de saponinas e terpenóides (UKOIMA et al., 2005; RAVIKUMAR et al, 2011; MATHEW et al 2012).

2.4 RESPOSTA IMUNE E SUAS AÇÕES NA DEFESA CONTRA ANTÍGENOS DIVERSOS

O sistema imunológico é composto por órgãos, células e moléculas que interagem, mantendo a homeostasia do organismo (CRUVINEL et al., 2010). A resposta imunológica envolve vários componentes plasmáticos como fatores de crescimento, fatores do complemento, receptores celulares, proteínas quinase e citocinas que atuam em sincronia para auxiliar o hospedeiro na remoção de antígenos que venham a invadir seus tecidos internos (GAUR et al., 2009; ARCHANA, 2011).

Para preservar o hospedeiro de riscos patogênicos e ambientais, a proteção imunológica “ativa” um mecanismo de defesa equilibrado, protegendo assim o hospedeiro, impedindo desencadear respostas auto-antígenos ou aberrantes (MANGINO et al., 2017). Esta resposta é conceitualmente dividida em imunidade inata e adaptativa.

Após a entrada de um determinado antígeno em um organismo animal, inicia-se a imunidade inata, utilizando mecanismos de reconhecimento molecular para detectar presença desses antígenos. A resposta imune adaptativa é mais tardia, diferentemente, focaliza especificadamente o invasor gerando memória imunológica e explora a diversidade de receptores codificados na superfície de células B e T para reconhecer patógenos desconhecidos e proteger o organismo hospedeiro de infecções (GOLDMAN e PRABHAKAR, 2000; JANEWAY, 2000; CALLAN JR. et al., 2016).

Para ambas respostas imunológicas as células responsáveis são principalmente, células teciduais, granulócitos e linfócitos (BENJAMINE et al., 2002;

PARHAM, 2001). Os linfócitos B e os linfócitos T são os principais tipos de linfócitos que agem no sistema adaptativo. Os linfócitos B quando ativados são denominados de plasmócitos e liberam anticorpos mediadores da resposta imune humoral. Já os linfócitos T são divididos em subpopulações de acordo com suas moléculas de superfície, por meio do sistema de designação de “cluster”, passando a se chamar de linfócitos Th1 e Th2 associados ao CD4 (Linfócitos T auxiliares) e os linfócitos supressores ou reguladores associados ao CD8 (Linfócitos T citotóxicos) (GOLDMAN e PRABHAKAR, 2000; PARHAM, 2001; WYKES et al., 2017). Os linfócitos T CD4, atuam na imunidade mediada por células funcionando como auxiliares dos linfócitos B na produção de anticorpos e das demais células imunes basais (leucócitos polimorfonucleares e monócitos) na produção de citocinas, mediadores químicos, enzimas vasoativas e fatores de crescimento. Os linfócitos T CD8, atuam de modo antígeno-específico e são citotóxicos contra células tumorais, regulam também as atividades dos linfócitos B e T (CRUVINEL et al., 2010).

Os linfócitos T auxiliares são subdivididos pelo padrão de citocinas que produzem, em Th0, Th1, Th2 e Th17, sendo as respostas Th1 e Th2 amplamente estudadas na imunologia (KOURILSKY e TRUFFA-BACHI, 2001). A resposta Th1 é caracterizada pela produção de interferon gama (INF- γ) e está relacionada com a imunidade mediada por células, incluindo recrutamento e ativação de macrófagos inflamatórios, reações de hipersensibilidade tardia e respostas citotóxicas que levam a proteção contra microorganismos celulares. As células Th1 produzem ainda IL-2, citocina que atua na proliferação de linfócitos T (incluindo as próprias células T CD4 de maneira autócrina) e aumenta a capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8 (CHTANOVA e MACKAY, 2001; ARAÚJO et al., 2008).

A resposta Th2 está associada com a imunidade humoral e é caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10, incluindo ativação de mastócitos e eosinófilos levando a proteção contra microorganismos extracelulares e contribuindo para a produção de anticorpos (PARKIN e COHEN, 2001). A resposta Th2 está correlacionada a infecções por helmintos e patologias alérgicas, visto que a IL-4 estimula a troca de classes de imunoglobulinas nos linfócitos B para IgE e a IL-5 induz a ativação de eosinófilos (CRUVINEL et al., 2010).

Como as citocinas, o óxido nítrico é um importante mediador da resposta imune inespecífica. Este composto, produzido por macrófago é um radical instável, gasoso, derivado da oxidação do átomo de nitrogênio no terminal guanidino da L-arginina pela

ação catalítica da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), na presença de oxigênio molecular. Pesquisadores observaram que o óxido nítrico produzido em elevados níveis por macrófagos ativados tem ação citotóxica contra bactérias, parasitas, tumores e vírus, exercendo, assim importante função na modulação do sistema imune (MONCADA et al., 1991; KIM et al., 1999; MELO et al., 2011).

A atividade imunomoduladora de extratos de diversas plantas, utilizadas na medicina alternativa e fitoterapia, tem sido amplamente explorada. As plantas possuem a capacidade de alterar o sistema imunológico através da regulação de suas moléculas mensageiras, como as citocinas, óxido nítrico, moléculas de adesão e neurotransmissores (SPELMAN et al., 2006). Plantas medicinais utilizadas tradicionalmente para o tratamento de inflamações, alergias, dores, são reconhecidas pela capacidade de modular a diferenciação de linfócitos T e a produção de citocinas, levando a um perfil Th1 ou Th2. (SHARMA e RANGARI, 2016). Bae et al., 2010, sugerem que a espécie *Cyperus Rhizoma* estimula uma resposta Th1 através do estímulo da transcrição de IFN- γ e demonstram ainda que a produção de IL-4 foi significativamente reduzida, provavelmente devido ao predomínio da resposta Th1.

Ammon (2010) mostrou em sua revisão que extratos *Boswellia serrata* em vários ensaios tem um perfil imunomodulador através da desregulação de TNF- α e diminuição da produção de IL-1 β , IL-4 e IL-6. A resina secretada pela planta *Commiphora mukul* também promoveu desregulação da produção de IL-2, TNF- α , IL-1 e óxido nítrico (MANJULA et al., 2006). Chandran e Patwardhan (2016), relatam o potencial da *Withania Somnifera* em modular 15 vias do sistema imunológico, como sistema complemento, cascatas de coagulação, ativação plaquetária, apresentação de antígenos, via de sinalização de quimiocinas, entre outros.

2.5 USO DE EXTRATOS OBTIDOS DE PLANTAS NA IMUNOMODULAÇÃO

As plantas possuem substâncias químicas com propriedades úteis na modulação do sistema imunológico, como os compostos secundários. Assim alguns estudos com essas plantas já apresentam e comprovam atividades imunoestimuladoras, imunorreguladoras, imunossupressoras. Sendo, utilizadas tradicionalmente para o tratamento de desordens alérgicas, autoimunes e inflamatórias; atualmente são reconhecidas pela sua capacidade de modular a produção de citocinas e a diferenciação de linfócitos T rumo a uma resposta com perfil

Th1 ou Th2 (BASSO et al., 2005; PATWARDHAN; MANISH, 2005; MEHROTRA et al., 2003; BAE et al., 2010).

Alguns estudos já são relatados na literatura mostrando o potencial imunomodulador de algumas plantas, como a espécie *Sinomenium acutum*, que mostrou uma redução da produção de mediadores da resposta Th1 (IFN- γ) e Th2 (IgE e IL-5) (FENG et al., 2006). Já a *Periploca sepium*, uma espécie tradicionalmente na China, é capaz de inibir a proliferação de linfócitos T estimulados por mitógeno, além da expressão de IFN- γ e IL-2, sendo utilizada para o tratamento de doenças auto-imunes do tipo Th1. Lin et al., (2005), mostraram em seus estudos uma fórmula constituída por ginseng, alcaçuz e chá verde que foi administrada em camundongos por via oral, assim elevando a produção de citocinas com perfil Th1 (IL-2, INF- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10).

Os extratos metanólicos de cascas, folhas e polpa de frutas de *Adansonia digitata* L. produzem aumentos significativos na hipersensibilidade tardia, produção de anticorpos e no índice fagocitário, indicando atividades imunoestimulantes em animais experimentais (SHARMA e RANGARI, 2016).

Doskocil et al. (2016) mostraram que os extratos etanólicos de *Neolentinus lepideus*, *Piptoporus betulinus*, *Polyporus squamosus*, *Trametes gibbosa* e *Aurantiporus fissilis* foram classificados como sendo os mais potentes entre as 24 espécies analisadas quanto as suas capacidades imunomoduladoras *in vitro*.

Para novos medicamentos com fins imunomoduladores há a necessidade de passar por avaliações de segurança, incluindo os fitoterápicos, assim sendo necessário a realização de ensaios pré-clínicos para avaliar esses efeitos. Podendo ser avaliados *in vivo*, *in vitro* e com ensaios clínicos, como por exemplo testes para analisar o aumento da proliferação de linfócitos e modulação da produção de citocinas (PUTMAN et al., 2002; PLAEGER, 2003).

2.6 IMPORTÂNCIA DA INVESTIGAÇÃO DE MORTE CELULAR

O desenvolvimento dos organismos multicelulares depende de uma interação entre as células que o constituem. Muitas células produzidas em excesso no desenvolvimento embrionário são levadas à morte, contribuindo assim para a formação de órgãos e tecidos. Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas. Características estas

que levam a mudança na síntese das macromoléculas, volume celular, homeostase, bem como na perda da viabilidade celular estando relacionada às alterações morfológicas características de cada tipo de morte celular (MEIER et al., 2000; YU et al., 2000; HENGARTNER et al., 2000; TINARI et al., 2008).

Necrose e apoptose, são as formas distintas de morte celular que vêm sendo mais estudadas de acordo com suas características morfológicas, bioquímicas e celulares (KANDUC et al., 2002; LULLI et al., 2010). Na necrose, uma lise celular ocorre após uma lesão aguda, não fisiológica ou acidental. Este tipo de morte celular está associado a uma lesão na membrana celular, que ocasiona liberação de constituintes celulares para o meio extracelular, podendo ocasionar um dano ao tecido circundante e inflamação no local (CURTIN et al., 2002; BRAS et al., 2005; BROUJRAD et al., 2007).

A morte celular por necrose, geralmente ocorre de forma violenta, iniciada por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia. Morfologicamente é caracterizada por inchaço citoplasmático, mitocondrial e do retículo endoplasmático, condensação da cromatina, ruptura da membrana plasmática assim liberando o conteúdo extracelular. Ocorrendo a formação do processo inflamatório, podendo ocasionar injúria e morte celular das células circunvizinhas. É considerada uma resposta a injúria celular, porém pode ser regulada geneticamente (CURTIN et al., 2002; BRAS et al., 2005; BROUJRAD et al., 2007).

Por outro lado, a apoptose celular pode ser induzida por estímulos, como DNA danificado, infecções virais, irradiação, fatores letais, drogas anti-câncer, ligadores de indutores químicos a determinados receptores de morte presentes na superfície celular. A apoptose requer ação de nucleases e proteases dentro de uma membrana plasmática intacta (OUYANG et al., 2012).

Características bioquímicas da apoptose são representadas por perda do potencial de membrana mitocondrial interna, disfunção mitocondrial, aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, inibição da cadeia respiratória. Já as características morfológicas incluem retração celular, decomposição celular em corpos apoptóticos ligados a membrana destinados para fagocitose, condensação da cromatina, exposição da fosfatidilserina, e fragmentação do DNA (ELMORE, 2007; OUYANG et al., 2012).

O processo apoptótico pode se iniciar por dois caminhos: via intrínseca ou mitocondrial e via extrínseca (dependente receptor) (ZHOU et al., 2012; RENAULT e

CHIPUK, 2013). A via intrínseca ocorre devido a retirada de fatores de hormônios ou crescimento, quando acontece lesão no DNA por radiação, radicais livres ou toxinas. Podendo envolver alteração no potencial de membrana mitocondrial, permeabilizando a membrana mitocondrial e liberando o citocromo C. Essa via é induzida pela resposta a estímulos pró-apoptóticos com ativação de receptores de morte celular (REED, 2006). Já a via extrínseca inicia com a ativação dos receptores de morte (death domains) como o TNF (fator de necrose tumoral), ativando uma cascata de proteínas adaptadoras, que culminará na ativação das caspases (TAKAHASHI et al., 2004; POLSTER e FISKUM, 2004; KROEMER et al., 2009).

Estudos sobre o processo apoptótico demonstram que este é um processo importante no tratamento de câncer, visto que a maioria dos fármacos anticarcinogênicos exercem seu efeito antitumoral a partir da indução da apoptose. Relatos na literatura têm mostrado que fármacos, tais como doxorrubicina, cisplatina, flavopiridol, paclitaxel, induzem apoptose em células tumorais *in vitro* (MIZUTANI et al., 2005; FULDA e DEBATIN, 2006; BRENES et al., 2007; FULDA et al., 2013).

A alteração da membrana plasmática levou Koopman et al. (1994) a esboçar um ensaio de detecção da fosfatidilserina, que é um lipídio que se encontra distribuído assimetricamente no folheto interno e externo da membrana plasmática. Fosfatidilserina (PS) é normalmente restrito ao folheto interno da membrana plasmática e é, portanto, apenas exposto intracelularmente. No entanto, durante a apoptose, a assimetria lipídica é perdida e a PS fica exposta no folheto externo da membrana plasmática. Anexina V, marcada fluorescentemente (isotiacianato fluoresceína - FITC), tem forte afinidade com a fosfatidilserina, podendo ser utilizada para detectar PS que é exposta no exterior de células apoptóticas. No entanto, as células apoptóticas podem ser distinguidas das células necróticas por coloração com iodeto de propídio (PI) o qual entra em células necróticas, e liga-se ao DNA (CROWLEY et al., 2016). Nesse ensaio, células viáveis, necróticas e apoptóticas podem ser diferenciadas por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência (BOERSMA et al., 2005; CROWLEY et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

As plantas são consideradas uma das principais fontes químicas biologicamente ativas, com interesse científico e comercial na busca de potenciais fármacos. Para algumas patologias, representam uma fonte valiosa na produção de fármacos inovadores com alta eficiência. As plantas medicinais têm sido reconhecidas durante muitos anos como uma fonte importante de diversidade estrutural, levando a avanços de medicamentos e promovendo melhorias nas propriedades farmacológica ou farmacêutica de muitos agentes.

Rhizophora mangle considerada uma árvore típica do manguezal, possui inúmeras características etnomedicinais auxiliando no tratamento de diversas patologias. Muitos experimentos foram desenvolvidos até o momento comprovando a eficácia do uso de extratos dessa planta para fins medicinais pelas comunidades locais. Nesse sentido, este trabalho visa fornecer novos estudos sobre a possível ação imunológica, bem como perfil citotóxico do extrato metanólico obtido de folhas de *R. mangle* no intuito de aprofundar um mais um pouco os conhecimentos obtidos até o momento.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as atividades antibacteriana, citotóxica e imunomodulatória do extrato metanólico obtido de folhas de *Rhizophora mangle*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise cromatográfica do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* através da Cromatografia de Camada Delgada;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato em bactérias Gram-positivas e negativas multiresistentes isoladas de feridas;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato contra esplenócitos de camundongos;
- Investigar o potencial proliferativo do extrato metanólico de *R. mangle* em esplenócitos de camundongos;
- Avaliar se o extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* é capaz de induzir a produção das citocinas e liberação de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas de esplenócitos de camundongos.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo pré-clínico *in vitro* sobre as atividades citotóxica, imunomodulatória e antibacteriana do extrato metanólico de folhas da *Rhizophora mangle* em esplenócitos de camundongos.

5.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada através do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa Translacional e Inovação Terapêutica do Departamento de Histologia e Embriologia CB/UFPE, no Instituto Nacional do Semiárido (INSA) - PB, no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e no laboratório de Microbiologia Aplicada e Ensaio Antimicrobianos do Departamento de Antibióticos CB/UFPE.

5.3 CASUÍSTICA

5.3.1 Critérios de inclusão

Foram usadas células viáveis ($\geq 95\%$) isoladas de baço de camundongos BALB/c e foram utilizadas culturas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas não contaminadas.

5.3.2 Critérios de exclusão

Células isoladas de baço de camundongos com baixa viabilidade ou portadores de alguma patologia e cepas de bactérias contaminadas com outras culturas.

5.4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

5.4.1 Material Botânico

As folhas de *Rhizophora mangle* foram coletadas na fase adulta no período de floração (janeiro 2016) no manguezal da cidade de Itamaracá, distrito de Vila Velha, no estado de Pernambuco, com 7 ° 40 'de latitude sul e 34 ° 50' longitude oeste, sendo selecionado folhas verdes, aparência vistosa, visualmente intacta, livre de danos mecânicos, pragas, doenças ou cor alterada. Uma amostra da planta foi identificada pela Profa. Dra. Marlene Barbosa, curadora do herbário do Departamento de Botânica, e depositada no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob número UFP: 69.655. A coleta foi autorizada pela Companhia Pernambucana de Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos sob autorização do CA DFRB N. 120/2014 (Anexo A).

5.4.2 Extração de folhas de *Rhizophora mangle*

O extrato metanólico de *R. mangle* foi preparado no Instituto Nacional do Semiárido – INSA, em Campina Grande, Paraíba, Brasil. Para a preparação do extrato foi utilizado 1kg de folhas frescas de *R. mangle* trituradas em equipamento Pulverisette 14 Classic Line (Fritsch), no qual pequenas porções de folhas foram inseridas no equipamento para obter um produto final suficientemente triturado. O extrato metanólico foi produzido a partir do método Low Bubble Point de extração de fluxo constante (Bejtlich, 1996). O material vegetal foi inserido em duplicata no extrator Dionex ASE 350 (Thermo Scientific) (40°C) em células de inox (19 células), cada uma com 30 g do triturado e 100 mL do solvente metanol (fase móvel) sob pressão de hidrogênio (H₂). O extrato metanólico foi conduzido para recipientes padronizados de 200 mL alocados na bandeja do equipamento, gerando um total de 7,6 L. O extrato metanólico foi conduzido para rotaevaporação em Genevac Rocket TM (Genevac), com temperatura de 40.3°C e temperatura de refrigeração 3.8°C com variação de 1.93°C, passando por ciclos de 1h40min com pressão de 72 mbar e 648 rpm. Cada ciclo gerou metanol recondicionado, o que possibilitou a sua reutilização no processo de produção de extrato, e produzindo também o extrato bruto concentrado (Nagato, et

al., 2001). Vários ciclos foram necessários a fim de se obter o extrato mais seco possível e livre do metanol.

5.4.3 Análise cromatográfica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Realizou-se a triagem fitoquímica do EMFRm através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando placas de gel de sílica 20x20 cm (0,25 mm de espessura) com reveladores adequados e sistema de desenvolvimento, empregando padrões cromatográficos como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Sistemas de eluição de metabólitos utilizados para triagem fitoquímica do EMFRm

Classe de Metabólitos secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonóides e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina Rutina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner e Bladt, 1996
Triterpenos e esteróides	β-sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Saponinas	-	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Mono e sesquiterpenos	Timol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e Lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner & Bladt, 1996
Alcalóides	Pilocarpina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidinas condensadas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts et al., 1957
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	n-BuOH-H ₂ O-AcOH (40:50:10 v/v)	Alúmen de ferro 1%	Stiasny, 1912

Fonte: O autor (2017)

5.4.4 Preparação dos testes antibacterianos

No teste de difusão em disco de papel foram utilizados os meios Ágar Mueller Hinton para bactérias. Para avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (CMB) o meio de cultura utilizado foi Müller Hinton (MH) em caldo e em Ágar, respectivamente. Foram utilizados cinco isolados clínicos: três de *Staphylococcus aureus* e dois de *Pseudomonas aeruginosa* todos provenientes de secreções purulentas (feridas) e obtidos através da Coleção de Microorganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (Tabela 2). Microorganismos que apresentam resistência a dois ou mais grupos de antimicrobianos são considerados multirresistentes (TEIXEIRA et al., 2004).

Tabela 2. Microorganismos obtidos da coleção de Microorganismos do Departamento de Antibióticos e utilizados para o ensaio antimicrobiano.

Microorganismos (Coleção) *	Sítio de infecção	Resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> (679)	Secreção de ferida	Eritromicina, clindamicina, penicilina.
<i>Staphylococcus aureus</i> (700)	Secreção de ulcera	Eritomicina, clindamicina
<i>Staphylococcus aureus</i> (719)	Secreção de ferida operatória	Eritomicina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfametoxazoltrimetoprima, cloranfenicol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (261)	Secreção de ferida operatória	Azetreonam, cefepima, gentamicina, imipinem, ceftazidima, piperacilina+tazobactam
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (262)	Secreção de ferida operatória	Imipinem, meropenem, ceftazidima

Fonte: O autor (2017). * Número de identificação da cepa da Coleção de Microorganismos do Departamento de Antibióticos da UFPEDA.

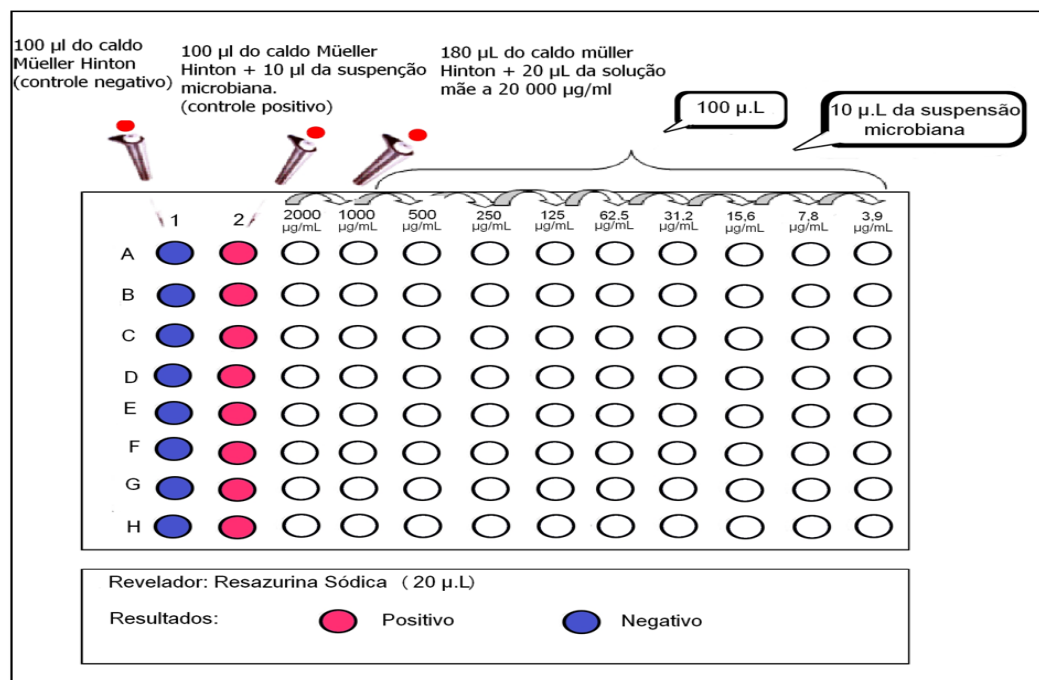
As suspensões bacterianas foram padronizadas de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

Discos de 6 mm de diâmetro foram embebidos com 20 µL do extrato em estudo, ficando cada disco a uma concentração de 2000 µg e colocados sobre a superfície do meio previamente semeado com os microorganismos testes padronizados em placa de Petri. As placas foram colocadas em geladeira por 20 minutos (para início da difusão antes do crescimento dos microorganismos) e em seguida incubadas a 35°C durante 24 horas (bactérias). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mm, foram calculados pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos nas três repetições (BAUER et al, 1966 modificado). Como padrão foi utilizado Cetoconazol (NeoQuímica) para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BAUER et al., 1966 modificado).

A determinação da MIC foi avaliada segundo os critérios adotados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015). Foi utilizada uma placa multipoços (96 poços), enumeradas de 1 a 12 na horizontal e em ordem alfabética, de A a H, na vertical. O extrato foi totalmente dissolvido em água esterilizada até formar uma mistura homogênea a 20.000 µg/mL intitulada solução mãe, e foi feito uma suspensão padronizada dos microorganismos em estudo de acordo com o tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Com exceção da terceira coluna, nas demais colunas foram colocados 100 µl do meio caldo Müeller Hinton, sendo a primeira coluna o controle negativo, ou seja, contendo apenas 100 µl do caldo Müeller Hinton; na segunda, foram adicionados 10 µl da suspensão microbiana padronizada aos 100 µl do caldo Müeller Hinton (controle positivo). Já na terceira coluna, foram colocados 180 µl do caldo Müeller Hinton e depois adicionado 20 µL da solução mãe do extrato bruto. A partir dessa coluna foram feitas diluições seriadas de 1:2, ou seja, foram retirados 100 µl da coluna atual e adicionados na coluna seguinte, até a décima segunda coluna. Aos poços das diluições foram colocados 10 µL da suspensão dos isolados clínicos (figura 3). A placa foi incubada durante 18 horas e após o período de incubação foi aplicado um corante revelador (resazurina sódica), capaz de exibir de forma mais precisa se houve ou não turbidez no poço.

Figura 2. Representação esquemática para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) realizada nos ensaios antibacterianos.



Fonte: O autor (2017).

O valor do MIC foi determinado na concentração do último poço onde não houve turbidez ar instalações de animais do Laboratório de Imunologia de Keizo Asami - LIKA, localizado na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os camundongos foram mantidos em condições laboratoriais padrão (20-22 ° C e 12 h ciclo diurno e noturno) com dieta padrão (Labina / Purina, Campinas, Brasil) e água “ad libitum”. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (número de protocolo: 0048/2016 –) (Anexo B).

5.4.5 Obtenção dos esplenócitos

Este procedimento foi realizado de acordo com Melo et al. (2011). Depois da eutanásia dos animais (gás CO₂), o baço de cada camundongo foi removido assepticamente e colocado num tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Em uma capela, cada baço foi transferido para uma placa de Petri e macerados. As suspensões celulares obtidas a partir de cada baço foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL de meio incompleto.

Os homogeneizados de baço foram sobrepostos numa camada Ficoll-PaqueTM PLUS com a densidade ajustada para 1,076 g/mL e centrifugadas a 1000 xg à temperatura ambiente durante 25 min. A camada celular de interface contendo células imunes foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e centrifugada duas vezes a 500 g durante 10 min para obtenção do pélite. As células foram contadas numa câmara de Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do azul de tripan. As células foram utilizadas apenas quando a viabilidade foi > 95%.

5.4.6 Análise da viabilidade celular

Esplenócitos tratados com EMFRm passaram 24 horas de incubação bem como células não tratadas e foram centrifugados a 450 xg a 4°C durante 10 min. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de PBS 1X ao precipitado e após ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (450 xg, 4°C, 10 min). O sedimento foi ressuspensão em 300 µL de tampão de ligação (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM), transferido para um tubo citométrico marcado e anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1: 500) e iodeto de propídio (PI, 20 µg / mL). A citometria de fluxo foi realizada em uma plataforma FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, EUA) e os resultados foram analisados usando o software CellQuest Pro (BD Biosciences). As células anexos-FITC negativo/PI positivo foram consideradas como necróticas e as células Anexina-FITC positivas/PI negativas foram consideradas na fase inicial da apoptose. Os duplos negativos foram considerados células viáveis.

5.4.7 Medição da produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)

Os sobrenadantes das culturas tratadas com EMFRm durante 24h e 48h, assim como as células não tratadas (controle negativo), foram coletados para a medição da produção de citocinas e ensaios de liberação óxido nítrico. A avaliação das citocinas foi realizada utilizando a citocina Th1 e Th2 humana II (Becton Dickinson Biosciences, EUA) para a detecção simultânea das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interferon-gama (IFN-γ).

A medição de citocinas baseou-se no princípio da tecnologia Cytometric bead array (CBA) e todos os dados foram adquiridos na plataforma FACSCalibur. A técnica CBA utiliza micropartículas ou esferas marcadas com intensidade de fluorescência discreta. As beads de captura foram marcadas com alo ficocianina e foram lidas a 650 nm. O anticorpo de detecção específico para citocinas foi marcado com fluorocromo de ficoeritrina que emite a 585 nm em parâmetros amarelos. A intensidade de fluorescência do parâmetro amarelo é proporcional à quantidade de citocina presente nas amostras teste. Resumidamente, amostras de teste (50 µL) e anticorpo de detecção de ficoeritrina foram incubadas com as beads de captura e reagente de detecção durante 2h no escuro à temperatura ambiente. Todos os anticorpos não ligados foram lavados (1,0 mL de tampão de lavagem) e ressuspensos em 300 µL de tampão de fixação antes da aquisição de dados na plataforma FACSCalibur. Cada citocina apresentou um pico único e bem separado e sete curvas padrão de citocinas individuais (0-5000 pg/mL) foram executadas em cada ensaio.

5.4.8 Análise *in vitro* de nitritos presentes nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos de camundongos

Os sobrenadantes de culturas de células incubadas ou não com EMFRm a 12,5 µg/mL durante 24h foram utilizados para análise de nitrito pelo método colorimétrico de Griess (DING et al., 1988). A concentração de óxido nítrico foi estimada usando uma curva padrão (3,12-100 µmol / mL). A leitura foi realizada num espectrofotômetro (Bio-Rad 3550, Hercules, CA) a 595 nm.

5.4.9 Ensaio de proliferação usando coloração com 5(6) - éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE)

O mesmo protocolo para os esplenócitos obtidos foi utilizado para o ensaio de proliferação usando 5(6) éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). Após a obtenção dos linfócitos, a solução celular foi centrifugada a 300 xg à temperatura ambiente durante 5 minutos com PBS 1X esterilizado adicionado com SFB 5% (pH 7,2). Depois disso, a solução celular foi ajustada para 1×10^6 cels/mL e recebeu 5 mM de CFSE. As células foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro e centrifugadas duas vezes a 300 xg por 5 minutos

com PBS 1X estéril. As células marcadas com CFSE foram cultivadas durante 24 horas com 10 µg/mL de EMFRm ou apenas meio de cultura (controle negativo). Após o término do tempo de cultivo, as células foram centrifugadas (300 xg por 5 min), foram transportadas para aquisição na plataforma FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) e os resultados foram analisados usando o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no software Sigma, versão 2.23.03. A normalidade das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para detectar as diferenças entre os grupos, utilizou-se o teste de Wilcoxon. O teste *t*-Student foi utilizado para analisar os resultados do ensaio de viabilidade celular. Todos os resultados foram expressos como média ± Desvio Padrão e um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

6.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO METANÓLICO DE FOLHAS DE *RHIZOPHORA MANGLE* POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD).

A presença de metabólitos secundários foi analisada pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD). Os resultados demonstraram que o extrato metanólico de *R. mangle* apresentou uma maior concentração de flavonóides, saponinas e proantocianidinas poliméricas (Tabela 3).

Tabela 3. Análise fitoquímica do extrato metanólico de folhas de *R. mangle* (EMFRm) obtido por cromatografia em camada delgada (CCD).

Classe dos metabólitos secundários	Extrato metanólico da <i>Rhizophora mangle</i>
Flavonóides	++
Fenilpropanoglicosídeos	+
Triterpenos	+
Esteróides	+
Saponinas	++
Monoterpenos e sesquiterpenos	+
Alcalóides	-
Cumarinas	-
Quinonas	-
Proantocianidinas e Leucoantocianidinas	++
Taninos hidrolisáveis	-

Fonte: O autor (2017). Legenda: (-) ausente; (+) fraco; (++) médio; (+++) forte

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PROMOVIDA PELO EXTRATO METANÓLICO DE *R. MANGLE*

Após a caracterização fitoquímica, foi realizada uma investigação antimicrobiana conforme mencionado no item 5.4.4 (Tabela 2) na seção de metodologia. De acordo com Estevam et al., 2009, os extratos de plantas que formam

zonas de inibição ≥ 10 mm são considerados ativos. No teste de difusão em disco de papel, o EMFRm mostrou atividade em relação ao *S. aureus* Gram-positivo (cepa 719) e a *P. aeruginosa* Gram-negativa (cepa 262). De acordo com a metodologia, essas cepas são resistentes aos antibióticos padrão e são provenientes de secreções de feridas cirúrgicas (Tabela 4).

O teste de MIC com EMFRm mostrou atividade contra as três cepas avaliadas (679,700 e 719) de *S. aureus* a 1000 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, para cepas de *P. aeruginosa*, a MIC foi superior a 2000 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, EMFRm apresentou valores acima de 2000 $\mu\text{g/mL}$ no teste de MBC em ambos os microorganismos. Resumindo esses resultados, o EMFRm apresentou atividade antimicrobiana no teste de difusão em disco de papel e testes de MIC contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, mas nenhuma atividade foi observada contra cepas Gram-negativas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 4. Teste de difusão do disco de papel realizado com extrato metanólico de folhas de *R. mangle* (EMFRm) contra cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Bactérias	EMFRm (1 mg/mL)		Antibióticos Resistentes
	Média	DP	
<i>S. aureus</i> (719)	10.66	0.57	Eritromicina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Sulfamethoxazol+trimetoprim, Chloramfenicol
<i>P. aeruginosa</i> (262)	10	0.21	Imipenem, Meropenem, Ceftazidime

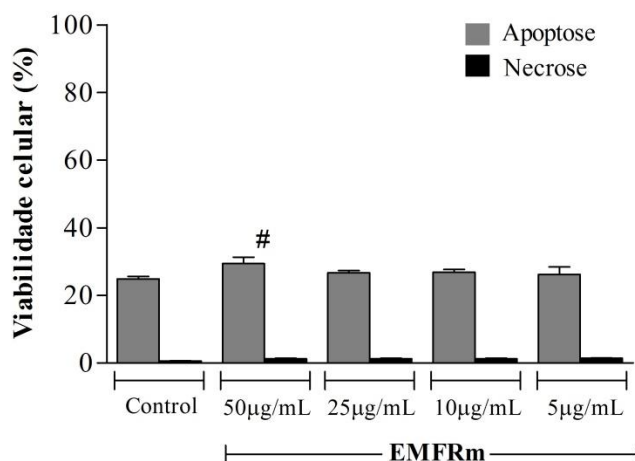
Fonte: O autor (2017).

6.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DA VIABILIDADE CELULAR POR ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDIO

Inicialmente investigamos a viabilidade celular nos esplenócitos dos camundongos tratados com a EMFRm através de citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a concentração ideal utilizada nas células imunológicas deve ser igual

ou inferior a 25 µg/mL (Figura 3). Nesta concentração e abaixo da mesma, EMFRm não promoveu necrose ou apoptose significativa.

Figura 3. Efeitos do EMFRm na viabilidade nos esplenócitos de camundongos. O EMFRm apresentou maior apoptose somente em 50 µg/mL em relação ao controle (célula + meio). Sob 25 µg/mL, EMFRm pode ser usado com segurança em esplenócitos de camundongos.



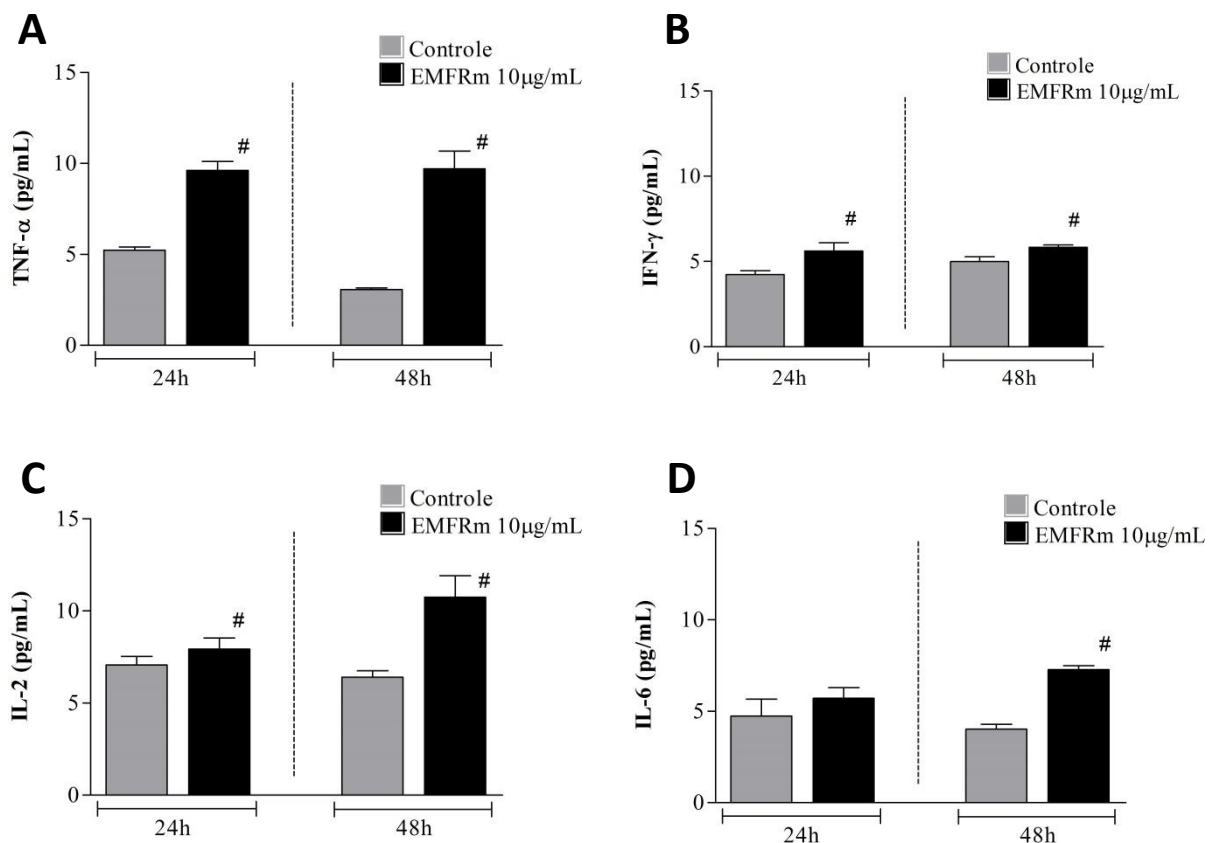
Fonte: O autor (2017). Legenda: As barras verticais representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. #p < 0,05.

6.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Após a análise de citotoxicidade, foram realizados ensaios imunológicos com EMFRm em 10 µg/mL de concentração e foram realizadas a proliferação de linfócitos, produção de citocinas e a liberação de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos tratados *in vitro* com EMFRm em 24h e 48h de incubação. Os resultados da produção de citocinas mostraram que a IL-4 foi produzida em concentrações inferiores, mas estatisticamente significativas (6,35 x 7,80 médias para controle e EMFRm, respectivamente) em 48 horas de ensaio. No entanto, IL-17 e IL-10 não foram produzidos em valores significativos por EMFRm em células tratadas.

Por outro lado, o EMFRm promoveu uma liberação significativa de citocinas pró-inflamatórias em relação ao controle. Em nossos resultados, observamos que EMFRm mostrou estimulação Th1 em linfócitos de camundongos em 24 e 48 horas de ensaio. De fato, TNF-α, IFN-γ, IL-2 e IL-6 foram produzidos em valores mais altos em relação ao controle em todos os tempos experimentais (Figura 4).

Figura 4. Perfil da produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-6 promovido por EMFRm em culturas de esplenócitos de camundongos em 24 e 48 horas de ensaio. **A** - TNF- α foi produzido em valores mais elevados em relação ao controle em ambos os tempos experimentais. **B** - IFN- γ e **C**-IL-2 também foram produzidos em valores mais elevados em relação ao controle em 24 e 48 horas de ensaio. **D** - EMFRm induziu maior produção de IL-6 apenas em 48 horas de estímulo em relação às células de controle.

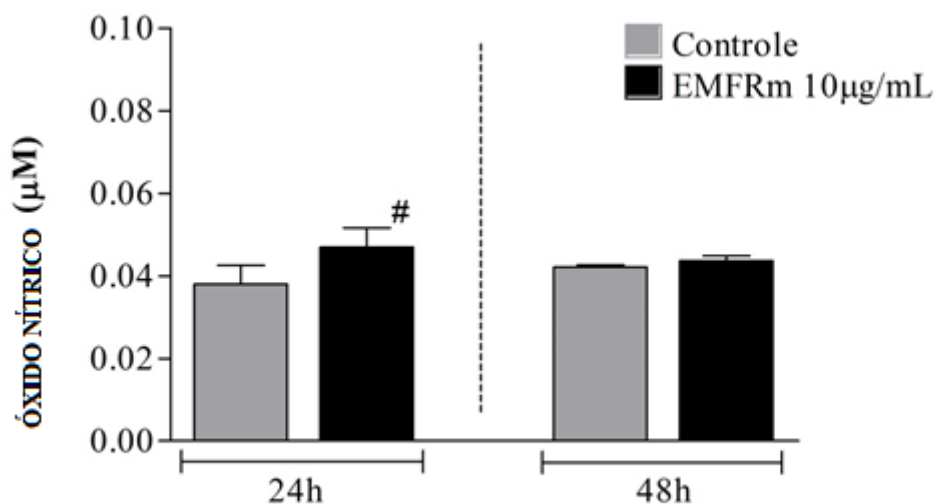


Fonte: o autor (2017). Legenda: As barras cinzas verticais representam culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com EMFRm em 10 μ g/mL. As barras verticais representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. #p < 0,05.

6.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico foi produzido em valores significantes por células estimuladas com EMFRm em 10 μ g/mL, apenas em 24 horas do ensaio, o que pode ser resultante da liberação controlada e similar do IFN- γ nos dois tempos experimentais (Figura 5).

Figura 5. Liberação de óxido nítrico promovida por EMFRm em culturas de esplenócitos de camundongos em 24 e 48 horas de ensaio. EMFRm induziu maior liberação de óxido nítrico em relação ao controle em 24 horas de ensaio.

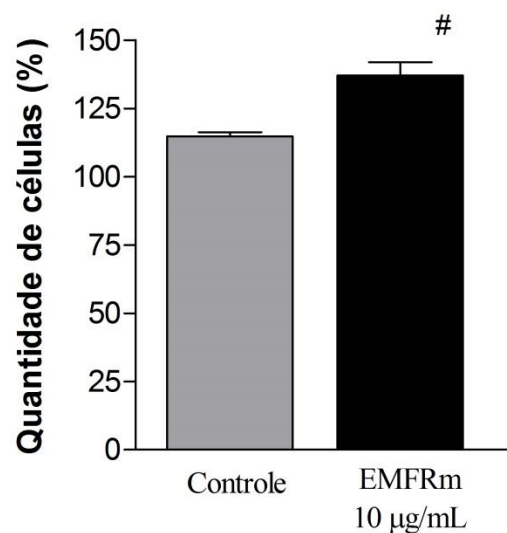


Fonte: o autor (2017). Legenda: As barras cinzas verticais representam culturas de controle (células + meio) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com EMFRm em 10 µg/mL. As barras verticais representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. #p <0,05.

6.6 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO *IN VITRO*

A presença de células imunes é fundamental para o processo de cicatrização, além disso, a alta produção de IL-2 e IL-6 observada nos resultados das citocinas nos levou à necessidade da investigação se EMFRm seria capaz promover o aumento da população de células imunes *in vitro*. Os resultados mostraram que o EMFRm induziu uma proliferação de esplenócitos nas culturas estimuladas com 10 µg/mL do extrato metanólico nas primeiras 24 horas de incubação. Os resultados deste estudo confirmam o perfil proliferativo induzido pelo extrato nas culturas avaliadas (Figura 6).

Figura 6. Índice de proliferação promovido pelo EMFRm a 10 µg/mL em culturas de esplenócitos marcados com CFSE. EMFRm induziu maior proliferação de linfócitos em 24 horas de incubação em relação às células de controle.



Fonte: o autor (2017). Legenda: As barras verticais representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. #p <0,05.

7 DISCUSSÃO

As propriedades farmacológicas das plantas estão intrinsecamente associadas aos seus compostos primários e secundários. Estes últimos, são geralmente classificados de acordo com suas vias biossintéticas, sendo os compostos fenólicos, terpenos e alcalóides considerados como três grandes famílias de moléculas potencialmente bioativas (BEHLING et al., 2004; PERERA; CARDOSO, 2012).

Alguns fatores fenotípicos fazem com que os metabólitos secundários sejam diretamente influenciados pelo local de ocorrência da planta, solo, temperatura, salinidade e poluição ambiental. (EDREVA et al., 2008; SILVA et al., 2010). Além disso, a utilização de solventes orgânicos ou inorgânicos extraem metabólitos com diferentes polaridades a partir de plantas medicinais, configurando diferentes atividades biológicas (SILVA et al., 2010; TAN et al., 2011). Estes compostos secundários são subdivididos nas classes: flavonas, flavonóides, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides. São compostos responsáveis pelo sabor, odor e cor de algumas espécies vegetais, sendo assim utilizados como flavorizantes e corantes de alimentos (TAN et al., 2011).

Marrero et al. (2006) demonstram que o extrato aquoso das cascas de *R. mangle* possui potencial anti-inflamatório *in vitro* a partir da inibição das ciclooxigenase-2 e fosfolipase A2, enzimas participantes do processo inflamatório. Esse trabalho aponta para os flavonóides como responsáveis pelas ações anti-inflamatórias relatadas dos testes *in vivo* e *in vitro*. Os flavonóides podem influenciar as funções de células ligadas a processos inflamatórios, agindo sobre as enzimas e vias envolvidas em processos anti-inflamatórios como, por exemplo, prostaglandina PGE₂, o TNF- α (MIDDLETON et al., 2000; REGALADO et al., 2016), em proteínas inflamatórias de macrófagos e a COX-2 (TALHOUK et al., 2007; OFORI-KWAKYE et al., 2011).

Já os terpenos apresentam atividades citotóxicas contra uma gama de microorganismos, como bactérias, fungos, alguns insetos vertebrados e vírus adsorvidos na membrana plasmática de células hospedeiras. Os terpenos são classificados em: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos. Entre os triterpenos se encontram os esteróides que são derivados de uma cadeia linear de 30 carbonos que derivam todos os triterpenos cíclicos (GARCÍA 2009). William em 1999,

isolou e caracterizou o taraxerol e cinnamoylupeol, dois triterpenóides a partir de folhas e caule de *R. mangle* L. Estes triterpenos são importantes na proteção das folhas contra herbívoros de *R. mangle* da Jamaica. A presença de triterpenos possui adjuvância com os efeitos gastroprotetor (PERTINO, et al. 2007) e anti-inflamatório (MEDEIROS, et al. 2007).

Estudos de extratos de caule de *Rhizophora racemosa*, de raiz de *Rhizophora apiculata* e *R. mucronata* mostraram a presença saponinas (UKOIMA et al., 2005; RAVIKUMAR et al, 2011; MATHEW et al 2012), e Hulchings et al. (1996) relatam que saponinas são usadas em indústrias farmacêuticas como agentes antimicrobianos, antifúngicos, anti-inflamatório e anti-oxidante, pois se ligam a sais biliares e colesterol no tubo digestivo, impedindo sua absorção. Possui também atividades antifúngicas (LACAILLE-DUBOIS & WAGNER, 1996; SCHENKEL et al., 2007) já que age nos lipídios da membrana celular. A presença de saponinas no extrato do caule da *R. mangle* L. reforça a ação antibacteriana desta planta.

Estudos demonstram o potencial antibacteriano dos extratos brutos da casca, folha e raiz da *R. mangle*, confirmando relatos da família Rhizophoraceae como interessante fonte de constituintes antibacterianos. Fernandez et al., 2002, avaliaram o poder cicatrizante do mercúrio-cromo e do extrato da *Rhizophora mangle* em feridas, onde o melhor resultado foi nos pacientes que foram tratados com o extrato. A película formada pela interação do extrato com as proteínas favorece o isolamento do tecido do meio externo, assim melhorando a cicatrização. O Gênero *Rhizophora*, por possuir compostos secundários como os taninos e os polifenóis, tem propriedade de formar complexos com íons metálicos como: ferro, vanádio, magnésio, alumínio e cálcio. Assim uma menor quantidade de íons para o metabolismo microbiano é capaz de interagir com compostos peptídeos formando aglomerados, explicando a formação da camada protetora (CRUZ, et al., 2015; FERREIRA, 2010).

Nossos resultados da atividade antibacteriana corroboram com Lim et al. (2006), que relatam que a ação anti-séptica e antimicrobiana de *R. mangle* está ligada em grande parte a presença dos taninos e nosso extrato metanólico não apresentou presença de taninos. Fatores como habitat, coleta, fases de crescimento e solventes podem ter influenciado na extração dos compostos secundários de nossa amostra vegetal coletada.

O extrato metanólico de *R. mangle* foi investigado neste estudo através de uma técnica ultrasensível, a citometria de fluxo. Os resultados do nosso estudo mostraram

que o extrato metanólico de *R. mangle* pode ser usado com segurança abaixo de 25 µg/mL em esplenócitos de camundongos e é capaz de induzir, *in vitro*, a proliferação de linfócitos, a produção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-6) e a liberação de óxido nítrico. Estes resultados são promissores porque, atualmente, os estudos sobre propriedade biológica promovidos por compostos naturais indicam que doses mais baixas devem ser suficientes para induzir atividades imunológicas ou antitumorais (LIU et al., 2010; ZHENG et al., 2016, DAT et al., 2015).

As citocinas são liberadas por diferentes células do hospedeiro para estimular e regular outras células através de receptores específicos que participam no controle de todos os eventos imunologicamente relevantes, como a ativação, diferenciação, maturação, proliferação e indução da apoptose (THOMAS, 1998). Estas proteínas imunes podem influenciar o resultado quantitativo, bem como qualitativo da resposta imune (AHER e WAHI, 2011).

Fernandez et al. (2002) e Perera et al. (2001) mostraram em seus resultados que o extrato aquoso de *Rhizophora mangle* foi capaz de promover a cura antiséptica de feridas e também foi capaz de promover o efeito antiulcerogênico. O perfil Th1 promovido pelo extrato metanólico de *R. mangle* neste estudo corroborou com este poder de cura de feridas. De fato, os compostos naturais (extratos ou moléculas isoladas) com potente efeito cicatrizante devem ser capazes de estimular o perfil pró-inflamatório inicial *in vitro* (AKEV et al., 2007; MELO et al., 2011). Outro fator a ser considerado foi a alta produção de TNF- α e início da produção de IL-6 em 48 horas de ensaio (associada ao início da produção de IL-4 nesta fase mais tardia), uma vez que TNF- α e IL-6 são citocinas pró-cicatrizantes e formadoras de colágeno em lesões de pele e a presença significativa de IL-4 em 48h de ensaio, começa a restaurar o quadro de ação anti-inflamatória necessário para as sucessivas fases proliferativas e de maturação de lesões (ZI-QING et al., 2003; ARRANZ-VALSERO et al., 2014; MELO et al., 2011b).

Semelhante a este estudo, foram investigadas atividades imunomoduladoras promovidas por outros compostos naturais. Ammon (2010), mostrou em sua revisão que extratos de *Boswellia serrata* e ácidos boswellicos mostraram, em vários ensaios, perfil imunomodulador através da desregulação de TNF- α e diminuição da produção de IL-1, IL-4 e IL-6. A resina secretada pela planta *Commiphora mukul* também

promoveu desregulação da produção de IL-2, TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico (MANJULA et al., 2006).

O perfil Th1 é muito interessante nas primeiras 48 horas de cicatrização de feridas quando o recrutamento de leucócitos é necessário na área da lesão. Nesta fase, chamada fase pró-inflamatória, o papel das células imunológicas e seus produtos químicos são fundamentais para a reparação eficiente (MELO et al., 2011b). Na verdade, muitos estudos têm demonstrado efeito de cura promovido por extrato de diferentes espécies da família Combretaceae. A pomada *Terminalia catappa* promove cicatrização significativa de feridas em ratos (KHAN et al., 2014), o extrato etanólico de *Terminalia chebula* acelera a cicatrização de feridas em queimaduras de ratos (NASIRI et al., 2015), a fração semi-purificada contendo ácido gálico de *T. Chebula* mostrou atividades anti-envelhecimento (MANOSROI et al., 2011) e o extrato etanólico de frutas desta mesma planta é um protetor farmacêutico eficaz da pele contra danos causados por raios UVB (YAKAEW et al., 2016).

Além disso, *Boswellia serrata* promoveu um aumento significativo nos subconjuntos de células T CD4 / CD8 (células de baço) e produção de citocinas (IL-2 e IFN- γ) (GUPTA et al., 2011). Os polissacarídeos isolados das folhas de *Combretum racemosum* induziram a produção de interleucina IL-1 β , IL-6 e TNF- α em células mononucleares de sangue periférico humano (SCHEPETKIN et al., 2013) e os extratos metanólicos e etanólicos de *Davilla elliptica* St. Hill. promoveu maior produção de TNF- α e óxido nítrico (CARLOS et al., 2005).

8 CONCLUSÕES

O extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* apresentou em sua composição flavonóides, fenilpropanoglicosídeos, triterpenos, saponinas, monoterpenos, proantocianidinas e leucoantocianidinas;

O extrato metanólico de folhas de *R. mangle* apresentou atividade antibacteriana principalmente contra bactérias gram-positivas *S. aureus* multiresistentes isoladas de feridas;

O teste de morte celular mostrou que a concentração igual ou inferior 25 µg/mL de EMFRm não promoveu necrose ou apoptose significativas;

EMFRm na concentração de 10 µg/mL foi capaz de promover proliferação e imunomodulação em esplenócitos de camundongos através da produção das citocinas TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- γ , bem como a liberação de óxido nítrico;

Este estudo demonstrou que o extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* L. possui em sua composição substâncias com potenciais propriedades farmacológicas. Além disso, mostrou ser um extrato com baixa atividade citotóxica, indutor de proliferação e imunomodulador em baixas concentrações de uso e em diferentes tempos experimentais em culturas de esplenócitos de camundongos. Estes achados proporcionaram uma compreensão inicial da resposta imunológica e do potencial efeito cicatrizante *in vitro* promovidos pelo extrato metanólico de *Rizophora mangle*.

REFERÊNCIAS

- AHER, V.; WAHI, A. 2011. Immunomodulatory activity of alcohol extract of *Terminalia chebula* Retz Combretaceae. *Tropical Journal of Pharmacology Research*. v.10, p.567-575.
- AKEV, N.; TURKAY, G.; CAN, A.; GUREL, A.; YILDIZ, F.; YARDIBI, H.; EKIZ, E. E.; UZUN, H. Tumour Preventive Effect of Aloe vera Leaf Pulp Lectin (Aloctin I) on Ehrlich ascites Tumours in Mice. *Phytotherapy Research*. v.21, p.1070–1075, 2007.
- AMMON, H. P. T. Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomedicine*. v. 17, 862–867, 2010. AMMON, H.P.T. Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomedicine*. v. 17, p.862-867, 2010.
- ANDRADE, J.P.A.; PIGNI, N.B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; GUO, Y.; BERKOV, S.; REYES-CHILPA, R.; AMRANI, A.E.; ZUANAZZI, J.A.S.; CODINA, C.; VOLADOMAT, F.; BASTIDA, J. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Rev. latinoam. Quím*, v.40, n.2, ago, 2012.
- ANNAPOORANI, A.; KALPANA, B.; MUSTHAFA, K.S.; PANDIN, S.K.P.; RAVI, A.V. Antipathogenic potential of *Rhizophora* spp. against the quorum sensing mediated virulence factors production in drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytomedicine*. v.20, p.956-963, 2013.
- ARAÚJO, J. A. P.; CASTELAN, T. T. T.; CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, D.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Linfócitos T: da imunobiologia aos imunobiológicos. *Revista Brasileira de Medicina*. v. 1, p. 3-19. 2008.
- ARCHANA, JATAWA, S.; PAUL, R.; TIWARI, A. A Rich Source of Natural Immuno-Modulator. *Indian Medicinal Plants. Internacional Journal Pharmacology*. v.7, n. 2, p. 198-205, 2011.
- ARRANZ-VALSERO, I.; SORIANO-ROMANÍ, L.; GARCÍA-POSADAS, L., LÓPEZ-GARCÍA, A.; DIEBOLD. Il-6 as a corneal wound healing mediator in na in vitro scratch assay. *Exp Eye Res*. V.125, p.183-192, 2014.
- BAE, H.; PARK, N.; KIM, Y.; HONG, M.; SHIN, M.; KIM, S.H.; KIM, J. The modulative effect of *Cyperus Rhizoma* on Th1/Th2 lineage development. *Cytokine*. v.51, n.3, 2010.
- BANDARANAYAKE, W.M. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*, v. 10, p. 421–452, 2002.

BARROS, H. M. B.; MACEDO, S. J.; LEÇA, E. E. et al. Gerenciamento Participativo de Estuários e Manguezais. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2000.

BASSO, L. A. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malária, tuberculosis and T-cell mediated diseases – A review. Mem Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. v.100, n.6, p. 575-606, 2005.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHEVIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology.v. 45, p. 493-496, 1966.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, H. D. C. Francescato. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. Alimentos e Nutrição. v.15, p. 285-289, 2004.

BEJTLICH, C. L. Integrity test for structures using acoustic emission. Milipore Investment Holdings Limited, 1996.

BENJAMINE, E.; COICO, R.; SUNCHINE, G. Imunologia. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 288, 2002.

BERENGUER, B.; SÁNCHEZ, L.M.; QUÍLES, A.; BARREIRO-LÓPEZ, M.; HARO, O.; GÁLVEZ, J.; MARTÍN, M.J. Protective and antioxidante effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID- induced gastric ulcers. Journal of Ethnopharmacology. v.103, n.2, p. 194-196, 2006.

BILLAH, M.; ISLAM, R.; KHATUN, H.; PARVIN, S.; ISLAM, E.; ISLAM, S. M. A.; MIA, A. A. Antibacterial, antidiarrhoeal, and cytotoxic activities of methanol extract and its fractions of *Caesalpinia bonducella* (L.) Roxb leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine* The official journal of the International Society for Complementary Medicine Research. v. 13, p. 101, 2013.

BOERSMA, H.H.; KIETSELAER, B.L.J.H.; STOLK, L.M.L.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G.A.K.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. Journal of Nuclear Medicine, v. 46, p. 2035-2050, 2005.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: diferente models of dying. Biochemistry, v. 70, n.2, p. 231-239, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf. Acesso em: junho. 2017.

BRASSEUR e ANGENOT. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate d'aminoethanol. J. Chromatogr. v. 400, p. 351-355, 1986.

BRENES, O.; ARCE, F.; GATJENS-BONICHE, O.; DIAZ, C. Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 61. p. 347-355, 2007.

BRÖKER, L.E.; FRANK, A.E.K.; GIUSEPPE, G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*, v.11, p. 3155-3162, 2005.

BROUJRAD, H.; GUBKINA, O.; ROBERT, N.; KRANTIC, S.; SUSIN, S. A.; AIF-Mediate Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. *Cell Cycle*, v.6, n.21, p. 2612-2619, 2007.

BURANELLI, R. C. Variabilidade populacional em manguezais: análises moleculares e morfológicas em caranguejos *Brachyura* (Crustacea: Decapoda). 2016. 188 f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Comparada), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto. 2016.

CALLAN JR. C. G.; MORA, T.; WALCZAK, A. M. Repertoire sequencing and the statistical ensemble approach to adaptive immunity. *Current Opinion in Systems Biology*. Current Opinion in Systems Biology. 2016.

CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C.B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO JUNIOR, C. M.; RINALDO, D.; CALVO, T. R.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 15, p. 44-50, 2005.

CARNEIRO, D.B.; BARBOZA, M. L.; MENEZES, M.P.M. Plantas nativas úteis na Vila dos Pescadores da Reserva Extrativista Marinha Caeté-Taperaçu, Pará, Brasil *Acta bot. bras.* v. 24, n.4, p. 1027-1033, 2010.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal, Chapecó: Argos. p. 47-75, 2001.

CHANDRAN, U.; PATWARDHAN, B. Network ethnopharmacological evaluation of the immunomodulatory activity of *withania somnifera*. *J. of Ethnoph.* Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/27487266/>>. Acesso em: fev. 2017.

CHEN, Y.; HOU, Y.; GUO, Z.; WANG, W.; ZHONG, C.; ZHOU, R.; SHI, S. Applications of Multiple Nuclear Genes to the Molecular Phylogeny, Population Genetics and Hybrid Identification in the Mangrove Genus *Rhizophora*. *PLoS One*. v.10, n.12: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145058>, 2015.

CHIPUK, J.E.; BOUCHIER-HAYES, L.; GREEN, D.R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death and Differentiation*, v. 13, p.8, p. 1396-1402, 2006.

CHTANOVA, T.; MACKAY, C.R.T. Cell effector subsets: extending the Th1/Th2 paradigm. *Advances in Immunology*, v.78, p. 233-66, 2001.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, pa. 23rd informational supplement, 2013.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Susceptibility test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods.. Doi:10.1128/9781555817381.ch71, p. 1253-1254, 2015.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). Journal of Ethnopharmacology, v.126, p.159-175, 2009.

COSTA, C.T.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; CASTRO, C.M.S; BRAGA, R.R.; OLIVEIRA, L.M.B. In vitro ovidical and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. Small Ruminant Research, v. 74, p. 284 - -287, 2008.

COSTA, G.L.; CARDOSO, K.C. BEM, L.E.V.; LIMA, A.C.; CUNHA, M.A.S.; CAMPOS-LEITE, L.; VICENTINI, R.; PAPES, F.; MOREIRA, R.C.; YUNES, J.A.; CAMPOS, F.A.P.; SILVA, M.J.S. Transcriptome analysis of the oilrich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. BMC Genomics, v. 11, n. 462, 2010.

COSTA, I. C. F. A Importância da atenção farmacêutica no uso de fitoterápicos emagrecedores contendo sene (*Cassia angustifolia* Vanh). Rev. Espec. On-line IPOG. v. 1, n. 10, p. 1-15, 2015.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. Cold Spring Harb Protoc. v. 11, p. 953-957, 2016.

CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Revista Brasileira Reumatologia. v.50, n.4, p.434-461, 2010.

CRUZ, S. M.; MARROQUÍN, N.; ALVAREZ, L. E.; CHANG, D. E.; Cáceres, A. Evaluation of Mangrove (*Rhizophora mangle* L.) products as coloring, antimicrobial and antioxidant agents. International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients. v. 2, p. 12, 2015.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. Diversitas Journal. v. 1, n. 2, p. 175181, 2016.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. Journal Immunological Methods, n.265, p. 49-72, 2002.

DAT, L.D.; THAO, N.P. TAI, B.H.; LUVEN, B.T.T.; KIM, S.; KOO, J. E.; KOH, Y.S.; CUONG, N.T.; THANH, N.V.; CUONG, N.X.; NAM, N.H.; KIEM, P. V.; MINH, C.V.; KIM, Y.H. Chemical constituents from *Kandelia candelwith* their inhibitory effects on

pro-inflammatory cytokines production in LPS-stimulated bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 25, p. 1412-1416, 2015.

DE-FARIA, MEIRA, F.; FERREIRA, L.; ANDERSON; SOCCA, R.; AUGUSTO, E.; ALMEIDA, A.; CRISTINA, A.; JOSE, D.R.; PAULO, M.L.; DA SILVA, M. A.; WAGNER, V.; LEITE, A.; HELENA., P,H. Effects of *Rhizophora mangle* on Experimental Colitis Induced by TNBS in Rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. New York: Hindawi Publishing Corporation. p. 11, 2012.

DOSKOCIL, I.; HAVLIK, J.; VERLOTTA, R.; TAUCHEN, J.; VESELA, L.; MACAKOVA, K.; OPLETAL, L.; KOKOSVA, L.; RADA, V. In vitro immunomodulatory activity, cytotoxicity and chemistry of some central European polypores. *Pharmac. Biol.* v. 54, n. 11, p. 2369-2376, 2016.

EDREVA, A.; VELIKOVA, V.; TSONEY, T.; DAGNON, S.; GUREL, A.; AKTAS, L.; GESHEVAL, L. E. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiol.*v. 34, p. 67-78, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, v. 35, p. 495-516, 2007.

FENG, H.; YAMAKI, K.; TAKANO, H.; INOUE, K.; YANAGISAWA, R.; YOSHINO, S.; Suppression of Th1 and Th2 immune responses in mice by Sinomenime, na alkaloid extracted from the chinese medicinal plant *Sinomenium acutum*. *Planta medicines*. v.72, n.15, p. 1383-1388, 2006.

FERNANDEZ, O.; CAPDEVILA, J.Z.; DALLA, G.; MELCHOR, G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*. v. **73**, p. 564–568, 2002.

FERREIRA, F. S.; SANTOS, S. C.; BARROS, T. F.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antibacteriana in vitro de extratos de *Rhizophora mangle* L. *Revista brasileira de Plantas Medicinais*. v.13, p. 305-310, 2010.

FULDA, S. Alternative Cell Death Pathways and Cell Metabolism. *International Journal of Cell Biology*. v. 36, p.1-4, 2013.

FULDA, S.; DEBATIN, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticâncer chemotherapy. *Oncogene*. v.25, p.4798-4811, 2006.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E.P. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. v.2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GAUR, K.; KORI, M.L.; NEMA, R.K. Comparative screening of immunomodulatory activity of hydro-alcoholic extract of hibiscus *Rosa sinensis* Linn. and ethanolic extract of *Cleome gynandra* Linn. *Global Journal Pharmacology*. v.3, n.2, p.85-89, 2009.

GOLDMAN, A.S.; PRABHAKAR, B.S. Immunology overview in Baron's Medical Microbiology. 4ed (online). Disponível em: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/toc.htm>, 2000.

GUPTA, A.; KHAJURIA, A.; SINGH, J.; SINGH, K. A.; SURI, G. N. Immunological adjuvant effect of *Boswellia serrata* (BOS 2000) on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice. International Immunopharmacology. v. 11, p. 968–975, 2011.

HARBORNE, J. B. 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall, Phytochemical Methods, 1998.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. Nature. v. 407, p. 770-776, 2000.

HULCHINGS, A.; SCOT, A. H.; LEWIS, A. B. Cunningham. Zulu Medicinal Plants. An Inventory University of Natal Press. Pietermaritzburg. p.53-54, 1996.

KHAN, A.A.; KUMAR, V.; SINGH, B.K.; SINGH, R. Evaluation of wound healing property of *Terminalia catappa* on excision wound models in Wistar rats. Drug Research. (Stuttg).v. 64, p. 225-228, 2014.

KIM, W.; PARK, W. B.; GAO, B.; JUNG, M. H. Critical role of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membrane Potential in Korean Mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. Molecular Pharmacology. v.66, n.6, p. 1383-1396, 2004.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KUIJTEN, G.A.; KEEHNER, R.M.; PALS, S.T.; VAN OERS, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood, v. 84, p.1415-1420, 1994.

KOURILSKY, P.; TRUFFA-BACHI. Cytokine fields and the polarization of the immune response. Trends in Immunology. v.22, p. 502-509, 2001.

KROEMER G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiology, v. 163, p. 87- 99, 2007.

KROEMER, G.; L. GALLUZZI. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ, v.16, n.1, p. 3-11, 2009.

LACAILLE-DUBOIS, M. A., WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine. v.2, p. 363-386, 1996.

LIM, S. H.; DARAH, I.; JAIN, K. Antimicrobial activities of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* barks. Journal of Tropical Forest Science. v. 18, p. 59-65, 2006.

LIN, B. F.; CHIANG, B. L.; LIN, J. Y. *Amaranthus spinosus* water extract directly stimulates proliferation of B lymphocytes in vitro . International Immunopharmacology. v.5, p.711-722, 2005.

LIU, B.; BIAN, H.; BAO, J. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*. v. 287, p. 1–12, 2010.

LULLI, M.; DI GESUALDO, F.; WITORT, E.; PESSINA, A.; CAPACCIOLI, S. Cell death: physiopathological and therapeutic implications. *Cell death dis.* v. 1, n. 30, 2010.

MANGINO, M.; ROEDERER, M.; BEDDALL, M. H.; NESTLE, F. O.; SPECTOR, T. D. Innate and adaptive immune traits are differentially affected by genetic and environmental factors. *Nature Communications*. v. 8, p. 1-6, 2017.

MANJULA, N.; GAYATHRI, K.S.; VINAYKUMAR, N.P.; SHANKERNARAYANAN, R.A.; VISHWAKARMA, A. Inhibition of MAP kinases by crude extract and pure compound isolated from *Commiphora mukul* leads to down regulation of TNF- α , IL-1 β and IL-2. *International Immunopharmacology*. v. 6, p.122-132, 2006.

MANOSROI, A.; JANTRAWUT, P.; AKIHISA, T.; MANOSROI, W.; MANOSROI, J. In vitro and in vivo skin anti-aging evaluation of gel containing niosomes loaded with a semi-purified fraction containing gallic acid from *Terminalia chebula* galls. *Pharmaceutical Biology*. v. 49, n. 11, p. 1190-1203, 2011.

MARQUES, M.A.A.M.; LIMA, D.A.; ANDREOTTI, C.E.; JUNIOR, A.G.; LOURENÇO, E.L.B. Caracterização das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para tratamento da osteoporose utilizados no Brasil. *Arq. Ciências Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 20, n.3, p.183-188, 2016.

MARRERO, E.; SÁNCHEZ, J.; ARMAS, E.; ESCOBAR, A.; MELCHOR, G.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.M.; MEGÍAS, J.; ALCARAZ, M.J. COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia*, v.77, p. 313-315, 2006.

MARTINS, M. C.; GARLET, T. M. B. Desenvolvendo e divulgando o conhecimento sobre plantas medicinais. *Rev. Elet. Gest., Educ. e Tecn. Amb.* v. 20, n. 1, p. 438-448, 2016.

MATHEW, M.; MARTIN XAVIER, K.A.; MATHEW, S.; ASHA, K. K.; ANANDAN, R.; KUMAR, A. Effect of *Rhizophora* Root Extracts on Wound Healing and Yeast – Induced Pyrexia in rats. *Fishery Technology*. v. 49, p. 161-166, 2012.

MEDEIROS R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B.(2007). Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyirin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology*. v.559, p. 227-235, 2007.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. JR. Innate immunity. *New Engl. Journal Med.* v. 3, n. 5 p.338-344, 2000.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. *Nature*. v. 407, p. 796-801, 2000.

MEHROTRA, S.; MISHRA, K. P.; MAURYA, R.; SRIMAL, R. C.; YADAV, V. S.; PANDEY, R.; SINGH, V. K. Anticellular and immunosuppressive properties of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome. *Internaconal Immunopharmacology*, Amsterdam. v.3, p.53-61, 2003.

MELCHOR, G.; ARMENTEROS, M.; FERNANDEZ, O.; LINARES, E.; FRAGAS, I. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* Bark. *Fitoterapia*. v.72, p. 689-691, 2001.

MELO, C. M. L.; PORTO, C. S.; MELO-JÚNIOR, M. R.; MENDES, C. M.; CAVALCANTI, C. C. B.; COELHO, L. C. B. B.; PORTO, L. F.; LEÃO, M. T. S. Correia. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 408, p. 113-119, 2011.

MIDDLETON, E. J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Review*. v.52, p. 673–751, 2000.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. Mechanisms of Apoptosis Induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Scienses*. v. 76. p.1439-1453. 2005.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, p.109-142, 1991.

NAGATO, L. A. F.; DURAN, M. C.; CARUSO, M. S. F.; BARSOTTI, R. C. F.; BADOLATO, E. S. G. Monitoramento da Autenticidade de Amostras de Bebidas Alcoólicas Enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. v. 21, p. 39-42, 2002.

NASCIMENTO, D.K.D. Toxicidade aguda de extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus*. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2014.

NASIRI, E.; HOSSEINIMEHR, S.J.; AZADBAKHT, M.; AKBARI, J.; ENAYATI-FARD, R.; AZIZI, S. The effect of *Terminalia chebula* extract vs. silver sulfadiazine on burn wounds in rats. *Journal of Complementary Integrative Medicine*. v. 12, p. 127-135, 2015.

O.FERNANDEZ, J.Z.; CAPDEVILA, G.; DALLA, G.; MELCHOR. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*. v. 73, p. 564–568, 2002.

OFORI-KWAKYE, K.; KWAPONG, A. A.; BAYOR, M. T. Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. *Afr J Tradit Complement Altern Med*.v. 8, p. 218-223, 2011.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.T.; ZHOU, T.T.; LIU, B.; BAO, J.K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, v. 45, p. 487-498, 2012.

PARHAM, P. O Sistema Imune. Porto Alegre: Artmed, p.372, 2001.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. Lancet. v. 375. p. 1777-1789. 2001.

PATWARDHAN, B.; MANISH, G.; Botanical immunodrugs scope and opportunities. Drug Discovery Today, Irvington. v.10, p.495-502, 2005.

PERERA, L. M. S.; PILOTO, J.; CANELSOTA, D.; PELZER, L. Further Pharmacological Evidence Supporting the Development of an Antiulcerogenic Drug Based on *Rhizophora mangle* L. Aqueous Extract. HPLC Method Proposed for Determinating a Chemical Marke. Open Access Library Journal.v. 3, p.1625, 2016.

PERERA, L. M. S.; RUEDAS, D.; GOMEZ, B. C. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. Journal of Ethnopharmacology. v. 77, p.1 – 3, 2001.

PERERA, L.M.S.; ESCOBAR, A.; SOUCAR, C.; REMIGIO, M.A.; MANCEBO, B. Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, v. 2, n.4, p. 56-63, 2010.

PERERA. L.M.S.; RUEDAS, D.; GÓMEZ, B.C. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. Journal of Ethnopharmacology, v. 77, p. 1–3, 2001.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.

PERTINO, M., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., RODRIGUEZ, J. A., THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the *Paraguayan crude drug* “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). Journal of Ethnopharmacology. v.111, p. 553-559, 2007.

PIL, M.W.; BOEGER, M.R.T.; MUSCHNER, V.C.; PIE, M. R.; OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. A. Postglacial North-South Expansion of populations of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) along the Brazilian coast revealed by microsatellite analysis. American Journal of Botany. v.98, n. 6, p. 1031-1039, 2011.

PLAEGER, S. F. Clinical immunology and traditional herbal medicines. Clin Diagnosy Immunology. V.10, p.337-338, 2003.

POLSTER, B.M.; FISKUM, G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. Journal of Neurochemistry, v. 90, n. 6, p.1281-1289, 2004.

PRASANNA, V. K.; VENKATESH, Y. P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. International Immunopharmacology. v.26, n.2, 2015.

PUTMAN, E.; VAN LOVEREN, H.; BODE, G. Assessment of the immunotoxic potential of human pharmaceuticals; a workshop report. *Drug Information Journal*. v.36, p.417-427, 2002.

RAVIKUMAR, S.; GNANADESIGAN, M. Hepatoprotective and Antioxidant Properties of *Rhizophora mucronata* Mangrove Plant in CCl₄ Intoxicated Rats. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. v. 4, p. 66-72, 2011.

REED, J.C. Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. *Nature Clinical Practice Oncology*, v. 3, n.7, p. 388-98, 2006.

REGALADO, A.I.; SÁNCHEZ, L.M.; MANCEBO, B. *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapêutico. v.4, n.1, p. 1-17, 2016.

RENAULT, T.T.; CHIPUK, J. E. Inter-organellar communication with mitochondria regulates both the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis. *Communicative e Integrative biology Journal*. v.6, doi: 10.4161/cib.22872, 2013.

REVATHI, P.; SENTHINATH, T.J.; Thirumalaikolundusubramanian, P.; PRABHU, N. Medicinal Properties of Mangrove Plants-an overview. *International Journal of Bioassays*. v.2, n.12, p.1596-1600, 2013.

ROBERTS, E. A. H., CARTWRIGHT, R. A., OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *Journal of the Science Food and Agriculture*. v. 8, p. 72-80, 1957.

ROSSATO, A. E.; CHAVES, T. R. C.; PIERINI, M. M.; AMARAL, P. A.; SANTOS, R. R.; CITADINI-ZANETTE, V. Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos. 1ª ed. Florianópolis: DIOESC, 2012.

SÁNCHEZ, J.; MELCHOR, G.; ESCOBAR, G.M.; FAURE, R. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*. v.77, p. 141–143, 2006.

SÁNCHEZ, J.; MELCHOR, G.; MARTÍNEZ, G. Protective effect of *Rhizophora mangle* bark on lipid peroxidation and erythrocyte hemolysis. *Pharmacognosy Magazine*, v. 1, p. 101-105, 2005.

SANTACROCE, S.; SIMONE, S.; BUCCI, R.; FARBER, E. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Internacional Journal Oncoly*. v. 21, p. 165-170, 2012.

SCHAEFFER-NOVELI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G. et al. Brazilian mangroves. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. v 3, p 561-570, 2000.

SCHEPETKIN, I. A.; KOUAKOU, K.; YAPI, A.; KIRPOTINA, L. N.; JUTILA, M. A.; Quinn, M. T. Immunomodulatory and Hemagglutinating Activities of Acidic Polysaccharides Isolated from *Combretum racemosum*. *International Immunopharmacology*. v.15, p. 628–637, 2013.

SHARMA, A.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of methanol extract of *Adansonia digitata* L. Trop. J. Pharm. Res. v. 15, n. 9, p. 1923-1927, 2016.

SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. Rev. Elet. Gest., Educ. e Tecn. Amb. v. 20, n. 1, p. 381-388, 2016.

SILVA, J. M.; MARTINS, M. B. G.; CAVALHEIRO, A. J. Anatomical characterization and chemical profiles of *Avicennia schaueriana* and *Rhizophora mangle* leaves from impacted and not impacted mangroves os São Paulo. Journal of Botany. v. 39, p. 14-33, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, p. 1104, 2010.

SPELMAN, K.; BURNS, J.; NICHOLS, D.; WINTERS, N.; OTTERSBERG, S.; TENBORG, M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. Alternative Medicine Ver. v.11, n.2, p.128-150, 2006.

STIASNY, E. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins. Collegium. p. 483-499, 1912.

TAKAHASHI, A.; MASUDA, A. et al. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). Brain Research Bulletin, v. 62, n. 6, p. 497-504, 2004.

TALHOUK, R. S.; KARAM, C.; FOSTOK, S.; EL-JOUNI, W.; BARBOUR, E. K. Antiinflammatory bioactivities in plant extracts. Journal of Medicinal Food. v.10, p. 1-10, 2007.

TAN, S. N.; YONG, J. W. H.; TEO, C. C.; GE, L.; CHAN, Y. W.; HEW, C. S. (2011). Determination of metabolites in *Uncaria sinensis* by HPLC and GC-MS after green solvent microwave-assisted extraction. Talanta. v. 83, p. 891-898, 2011.

TEXEIRA, P. J. Z., et al. Pneumonia associada à ventilação mecânica : impacto da multiresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. Journal Brasileiro de Pneumologia. v. 30, p. 540-548, 2004.

THOMAS, K. F. Immune modulating agents. Marcel Dekker, INC. Newyork. P.1-19, 1998.

TINARI, A.; GIAMMARIOLI, A.M.; MANGANELLI, V.; CIARLO, L.; MARLONI, W. Analyzing morphological and ultraestructural features in cell death. Methods in Enzimology. v. 442, p. 1-26, 2008.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 42, n. 2, p. 289-304, 2006.

UKOIMA, H. N.; IKATA, M.; PEPPE, G. A. Control of *Lasiodiplodia theobromae* (PAT) on *Rhizophora racemosa* using plants extracts. American Journal Biotechnology and Molecular Sciences. v.3, p. 1-7, 2005.

WAGNER, H., S. Bladt. Plant drug analysis-A thin layer chromatography atlas. Springer, 1996.

WENDEL, G.H.; TEVES, M.R.; PAREDES, J.D.; PERERA, S.; PELZER, L.E. Evaluation of the Antidiarrheal Activity of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). Latin American Journal of Pharmacy. v. 32, n.1, p.128-31, 2013.

WYKES, M. N.; STEPHENS, R.; COCKBURN, I. A. Adaptive Immunity to Plasmodium Blood Stages. Springer International Publishing Switzerland. 2017.

YAKAEW, S.; ITSARASOOK, K.; NGOENKAM, J.; JESSADAYANNAETHA, A.; VIYOCH, J.; UNGSURUNGSIE, M. 2016. Ethanol extract of Terminalia chebula fruit protects against UVB-induced skin damage. Pharmacology Biology. v. 54, p. 2701-2707, 2016.

YU, S.P.; CHOI D.W. Ions, cell volume, and apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. v. 97, p. 9360-9362, 2000.

ZI-QING, L.; TOSHIKAZU, K.; YUKO, I.; TATSURONI, T.; NAOFUMI, M. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6 deficient mice. Journal of Leukocyte Biology. v.73, p. 721, 2003.

ZHENG, Y. F.; ZHANG, Q.; LIU, X. M.; MA, L.; LAI, F. Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on Magnolia kwangsiensis Figlar & Noot. Carbohydrate Polymers.v. 142, p. 98–104, 2016.

ZHOU, C.; PAN, W.; WANG, X.P.; CHEN, T.S. Artesunate induces apoptosis via a Bax-mediated caspase-independent intrinsic pathway in human lung adenocarcinoma cells. Cell Physiology, v.227, p. 3778-3786, 2012.

ZHOU, X.; YUAN, D.; WANG, M.; HE, P. H₂O₂-induced endothelial NO production contributes to vascular cell apoptosis and increased permeability in rat venules. American Journal Physiology, v.304, p. 82-93, 2012.

ANEXOS

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

CA DRFB N° 120/2014

24 de outubro de 2014.

Ao Senhor

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

Prezado Senhor,

Cumprimentando Vossa Senhoria, nos reportamos ao Processo CPRH n° 013520/2014, referente ao requerimento para realização de atividades de pesquisa na APA de Santa Cruz e na APA Estuarina de Santa Cruz, sendo o local de coleta às margens do Canal de Santa Cruz e Rio Paripe, próximo a Vila Velha, Ilha de Itamaracá - PE.

Após análise da documentação apresentada vimos informar que o projeto "**Tecnologia Morfológica Aplicada à Inovação Terapêutica: Uma Perspectiva de Investigação de Produtos Naturais da Região de Mangue**" foi aprovado, estando autorizada a realização da citada pesquisa. No entanto, em caso de realização de atividades em áreas particulares, estas somente poderão ocorrer mediante a anuência do proprietário das terras. Salientamos ainda, que esta autorização permite as atividades de campo e coleta de material para estudo, entretanto, o acesso ao patrimônio genético deverá ser autorizado pelos órgãos competentes.

Informamos que a Unidade de Conservação APA de Santa Cruz possui sede e administração local, desta forma, caso haja necessidade de apoio para a realização das atividades de campo, faz-se necessário contato prévio com a equipe de gestão da Unidade.

Atenciosamente,



CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA

Diretoria de Recursos Florestais e Biodiversidade

ANEXO B- COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -CCB
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA



PARECER

Este parecer trata do Processo CEUA 0048-2016 submetido online pela Professora Cristiane Moutinho Lagos de Melo à Comissão de Ética no Uso de Animais para avaliação do uso de *Mus musculus* no projeto de pesquisa intitulado "INVESTIGAÇÃO IMUNOLÓGICA E ANTITUMORAL DE COMPOSTOS NATURAIS EXTRAÍDOS DE PLANTAS". Além do projeto foi anexado o FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM ENSINO E/OU PESQUISA. O projeto de pesquisa tem relevante importância acerca da necessidade de pesquisas que visem elucidar mecanismos de ação envolvidos com a resolução de patologias como o câncer.

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, os objetivos, os aspectos legais e o bem-estar animal, consideramos a solicitação de pesquisa científica COM PENDÊNCIAS. Abaixo, seguem as especificações:

- Falta a carta de apresentação com assinatura da responsável pelo projeto e respectivo chefe de departamento;
- Assinalar o item 9.6 como Grau de Invasividade 1.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/01/2017 - 04/01/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> – Linhagem Swiss e Balb/c
Nº de animais	32
Peso/Idade	25 - 40 gramas / 60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos

Recife, 13 de dezembro de 2016.

ANEXO C- NORMAS DA REVISTA

Submitting a manuscript to BiO

Click here to submit a manuscript

- [Terms of submission](#)
- [Online submission](#)
- [Transfer option](#)
- [Article publication charge](#)

Terms of submission

BiO considers for publication original research that has not been previously published. Submission to BiO implies that this is the case and that the submitted manuscript is not under consideration for publication elsewhere.

During the submission process, authors are asked to declare that the manuscript has been seen and approved by all authors. Submission also indicates that authors agree to abide by BiO's [publishing policies](#), including the declaration of any competing interests to the journal on submission of a manuscript.

BiO uses the [CRediT](#) Taxonomy to define author contributions to primary research papers and requires that the independent contributions of each author be provided during online submission. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that contributions are agreed on by ALL co-authors prior to manuscript submission. Please refer to [journal policies](#) for further information on our authorship policies.

BiO offers advance online posting of articles on its [Advance Articles](#) web site, which is updated weekly, and issues are published monthly online. It is also possible to post the accepted author manuscript within one week of acceptance. Please contact the [Editorial Office](#) if you wish to take up this option.

We support the Think.Check.Submit. initiative.

Online submission

New manuscripts

BiO is committed to making submission as easy as possible for authors. As part of this commitment, we have introduced **format-free submission**.

At first submission, authors are no longer required to format their manuscript according to journal guidelines. However, for the benefit of reviewers and editors, we do still encourage authors to make their manuscripts as easy to read as possible, and to use appropriate line spacing and line numbers.

For new submissions, we recommend that you submit your paper as **a single PDF file that contains all the necessary text, figures and tables.**

Our submission system converts submitted files (PDFs or individual files) into a PDF file for the review process. The corresponding author must check and approve the PDF to complete the submission process; if there are problems with figure resolution, please contact the [Editorial Office](#).

During the submission process, you will be asked to provide an email address for each author and suggested reviewer. When providing a non-institutional email address (e.g. gmail), an [ORCID identifier](#) is also required. Papers submitted using non-institutional email addresses and without ORCID iDs will require additional verification steps, which

may cause delays. All corresponding authors are also required to submit an ORCID iD and it is best practice to use an ORCID iD to identify each author.

As a service to our authors, and to facilitate rapid dissemination of research results, BiO offers two-way integration of our manuscript submission system with the bioRxiv preprint server (operated by Cold Spring Harbor Laboratory) – avoiding the need to re-enter information or upload files in multiple submission systems. During submission to BiO, authors can opt to deposit their article in bioRxiv through a simple one-click process. In addition, authors depositing a manuscript in bioRxiv can transfer their paper directly to BiO through their transfer portal. Once deposited in bioRxiv, either directly or through our deposition portal, the unrefereed manuscript will become free for anyone to read almost immediately and cannot be removed, regardless of the editorial decision made at BiO. It will be citable with a bioRxiv DOI, its usage can be tracked, and it can be updated. Please ensure that all co-authors agree to preprint deposition before uploading or transferring to bioRxiv. Consideration of your manuscript for review and/or publication by BiO is not influenced by whether you choose to post it on bioRxiv.

Revised and accepted manuscripts

For **revised submissions** and **accepted manuscripts**, please provide all the necessary text and figures as individual files.

For more information on suitable file formats, please see our manuscript preparation and figure preparation guidelines.

All revised manuscripts should adhere to our manuscript preparation guidelines and authors should complete and submit our submission checklist with their manuscripts. This form asks authors to confirm that they have followed best practice guidelines regarding experimental subjects, data reporting and statistics. The checklist is based on the NIH Principles and Guidelines for Reporting Preclinical Research and is intended to help ensure high standards for reporting and to aid reproducibility.

To help you meet your funder requirements, you will be asked to provide details of all funding sources from ALL authors. Please provide the full official funding agency name as listed on the Crossref Funder Registry, and all relevant grant numbers. See our manuscript preparation guidelines for more details.

Please note that revised manuscripts will be treated as a new submission if they are not submitted within 3 months of the date of the initial decision.

For more information on the types of articles that can be submitted to BiO, please visit our Article types page.

Transfer option

Papers rejected from Development, Disease Models & Mechanisms, Journal of Cell Science, Journal of Experimental Biology and eLife can be transferred to BiO, strictly with the authors' approval, for editorial consideration.

For authors who originally submitted to Development, Disease Models & Mechanisms, Journal of Cell Science and Journal of Experimental Biology, there is a simple one-click manuscript-transfer option in BenchPress should their paper not be accepted. Under this service, any existing referees' reports from the original peer review can also be passed to BiO, again with the authors' approval, for a more-rapid publication decision. Where necessary, additional peer review may be undertaken.

There is no need to reformat the article or resupply manuscript information.

We encourage authors to transfer their manuscripts to BiO following editorial rejection or rejection after peer review. The criteria for acceptance at BiO are very

different. Editors and Reviewers are asked to confirm that the experimental work is properly conducted and that the conclusions are adequately supported by the data. We do not require any assessment of the potential impact of a paper. The transfer of any existing reviews – even if negative – usually enables a rapid decision to be made without the need for further review, as this may help the BiO Editor to identify simple revisions that would allow a paper to be accepted (average time to first decision of 8.5 days for articles transferred with reviews).

For authors who made their original submission to eLife, please click [here](#) for more information. BiO also accepts the transfer of peer review reports from submissions to other, non-Company, journals.

Article publication charge

To provide Open Access, the costs of publication in BiO are covered in part by charging a fee to the authors or the research supporters for each accepted article. This Author Publication Charge is \$1495 (plus VAT if applicable) and covers peer review, journal production, online systems employed for the purposes of submitting, trafficking and hosting articles, and the cost of archiving significant volumes of data, including supplementary material files, in perpetuity.

BiO has a small budget for the complete or partial waiving of publication charges for authors in developing countries and others in genuine financial hardship. Corresponding authors based in the countries listed [here](#) will be granted a full waiver upon application. Funds for waivers are limited, however, as the journal would not be sustainable without income from author charges to cover its costs. Payment requests will be sent to the corresponding author following acceptance of their paper. As well as being paid in pound sterling, payments can be made in Euros or US dollars, and will be converted at the official HMRC currency exchange rate.

The decision to publish a paper in BiO is wholly independent of payment or ability to pay, and is based solely on the validity and supportability of the work detailed in each manuscript. Editors and reviewers do not have access to information regarding authors' financial contributions. BiO is published by the not-for-profit publisher The Company of Biologists, a charitable organisation run by scientists to support the research community.

ANEXO D- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA



Doutor Jeymesson Vieira (Author)
Queue Summary
Reviewer Area
Submit
Submission History
Help
FAQ
Feedback
Log Out

BIOLOPEN/2017/028597

Antibacterial, Cytotoxic and Immunomodulatory Activities of Rhizophora mangle Linnaeus (Rhizophoraceae)

Vanessa Silva de Almeida, Dayane Kelly Dias do Nascimento, Clarissa Oliveira Silva, Maria de Fatima Rodrigues, Lucimeri Paulino Machado Magalhaes, Rafael Matos Ximenes, Kesia Xisto da Fonseca Ribeiro, Thiago Henrique Napoleo, Virginia Maria Barros de Lorena, Marcia Vanusa da Silva, Maria Tereza dos Santos Correia Tereza dos Santos Correia, Wolfgang Harand, Cristiane Moutinho Lagos de Melo, and Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Date Received: 24 Jul 2017

Article Type: Research Article

Corresponding Author: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Keywords: Rhizophora mangle; antibacterial; cytokines; cytotoxicity; immunomodulatory; medicinal plants

Supplemental Files: 0

Found 1 paper

Sort History By: No Sort Sort

Manuscript Id	Current Corr. Author	Date of Original Submission	Current Version Status	Current Editor
BIOLOPEN/2017/028597	Jeymesson Raphael Cardoso Vieira	24 Jul 2017	Status: Under Review	None
PDF HTML References Source Files	Version: 1 Title: Antibacterial, Cytotoxic and Immunomodulatory Activities of Rhizophora mangle Linnaeus (Rhizophoraceae) Authors: Vanessa Silva de Almeida, Dayane Kelly Dias do Nascimento, Clarissa Oliveira Silva, Maria de Fatima Rodrigues, Lucimeri Paulino Machado Magalhaes, Rafael Matos Ximenes, Kesia Xisto da Fonseca Ribeiro, Thiago Henrique Napoleo, Virginia Maria Barros de Lorena, Marcia Vanusa da Silva, Maria Tereza dos Santos Correia Tereza dos Santos Correia, Wolfgang Harand, Cristiane Moutinho Lagos de Melo, and Jeymesson Raphael Cardoso Vieira Article Type: Research Article Keywords: Rhizophora mangle; antibacterial; cytokines; cytotoxicity; immunomodulatory; medicinal plants			

[\[Top\]](#)

APÊNDICE

APÊNDICE A- ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA

Antibacterial, Cytotoxic and Immunomodulatory Activities of *Rhizophora mangle* Linnaeus (Rhizophoraceae)

Vanessa Silva de Almeida¹, Dayane Kelly Dias do Nascimento¹, Clarissa de França Oliveira Silva², Maria de Fátima Rodrigues³, Lucimeri Paulino Machado Magalhães³; Rafael Matos Ximenes³; Kesia Xisto da Fonseca Ribeiro³, Thiago Henrique Napoleão², Virgínia Maria Barros de Lorena⁴, Márcia Vanusa da Silva², Maria Tereza dos Santos Correia², Wolfgang. Harand⁵, Cristiane Moutinho Lagos de Melo³, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira¹

1 Department of Histology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; 2 Laboratory of Glycoproteins – Biochemistry Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; 3 Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Brazil. 4 Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Pernambuco, Brazil; 5, Instituto Nacional do Semiárido – INSA, Campina Grande, 58434-700, Paraíba, Brazil.

* Corresponding author at: Department of Histology and Embryology, Postgraduate Program in Morphotechnology, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, 50670-901, Pernambuco, PE, Brazil.

E-mail address: jeymesson@gmail.com

Impact statement

The methanolic extract of *Rhizophora mangle* effectively contributed to the in vitro control of *Staphylococcus aureus* that are responsible for acquired infections frequently found on the skin. In addition, the extract promoted cell viability at concentrations of 25 µg / ml, not promoting necrosis or apoptosis. IL-2, IL-6, TNF-α, IFN-γ and nitric oxide were produced inducing the Th1 profile. Thus, this extract may be a promising therapeutic agent for healing treatments.

ABSTRACT

Rhizophora mangle L. (Rhizophoraceae) has been used in folk medicine for treatment of various diseases. However, the effects of *R. mangle* in immune system are largely unknown. The present study aimed to investigate antibacterial activity of methanolic extract of leaves of *R. mangle* (MELRm) in Gram-positive and negative bacteria and cytotoxic and immunomodulatory activities on mice splenocytes stimulated by MELRm. The plant material was collected in Vila Velha mangroves, located in Itamaracá, Brazil. MELRm has been produced from the Low Bubble Point method constant flow extraction. The phytochemical characterization of the extract was performed by the Thin Layer Chromatography test on silica gel plates to identify the secondary compounds. Gram- positive and negative bacteria assays were promoted by analyzing the disk diffusion and Minimum inhibitory and Concentration and minimum bactericidal Concentration parameters. Mice splenocytes (10⁶ cells) were treated with MELRm at 50, 25, 10 and 5 µg/mL. Cell viability analysis was performed by the annexin V-FITC test and staining with propidium iodide. Measurement of cytokine levels in the splenocyte supernatants by the Cytometric Beads Matrix System and in vitro nitrite analysis were performed for the immunological profile. Consent Form with the authorization of the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Brazil #1,870,360/2016). MELRm presented flavonoid, saponins, polymeric proanthocyanidins. MELRm showed antimicrobial activity mainly for gram-positive *Staphylococcus aureus* and gram- negative for *Pseudomonas aeruginosa*. The concentration of 25 µg/mL did not promote significant necrosis or apoptosis. IL-2, IL-6, TNF-α, IFN-γ and nitric oxide were produced in higher values by mice splenocytes stimulated by MELRm. From these findings, it can be concluded that *R. mangle* showed moderate antibacterial activity, did not show cytotoxic activity and presented immunomodulatory activity in mice splenocytes inducing Th1 profile and suggesting an alternative therapeutic potential of this plant for effective treatment of wounds.

KEYWORDS: *Rhizophora mangle*, antibacterial, cytokines, cytotoxicity, immunomodulatory, medicinal plants.

1. BACKGROUND

Mangrove is predominantly bordering margins of tropical coastlines around the world. The distribution of mangrove ecosystems in the Brazilian coast is directly associated with estuarine regions and major species belong of four genera: *Rhizophora*, *L.*, *Avicennia* *L.*, *Laguncularia* *C. F. Gaertn.*, and *Conocarpus* *L.* (Schaeffer-Novell et al., 2000; Pil et al., 2011). *Rhizophora mangle*, belonging to a widespread genus in the Americas, Africa, Asia, Madagascar and Australia (Menezes et al., 2006). Moreover, *Rhizophora mangle* *L.* (Rhizophoraceae), the red mangrove (due to the high content of polyphenolic compounds present in its shell), is one of the most prevalent species present in Brazilian ecosystem (Takara et al., 2008; Pil et al., 2011).

Mangrove extracts are widely known in folk medicine and exhibit antibacterial, antherpetic, and anthelmintic properties (Dat et al., 2015). *Rhizophora* genus also shows gastric antiulcer effect and antiviral activity (Perera et al., 2001; Annapoorani et al., 2013). Medicinal properties published with *Rhizophora mangle* *L.* are astringent, hemostatic, febrifuge, antifungal, antibacterial and healing activities (Melchor et al., 2001; Fernandez et al., 2002; Perera et al., 2001).

The majority presence of polyphenolic compounds such as flavonoids in this species, justify great anti-inflammatory and antioxidant activity in some pathologies. Marrero et al., 2006, showed that the aqueous extract of the bark of *R. mangle* possesses anti-inflammatory potential in vitro to the inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and phospholipase A2, enzymes participating of inflammatory process. Sanchez et al., 2006, showed that antioxidant activity attributed to this compound is the ability to chelate iron ions and indicated that the treatment with *R. mangle* extract in rats, under oxidative stress, increased glutathione peroxidase and superoxide dismutase, enzymes responsible for protection against oxidative damage and hemolysis (Sánchez et al., 2005; Berenguer et al., 2006).

In this study we evaluated the antibacterial activity of *R. mangle* in Gram-positive and negative multiresistent bacteria isolated from wounds and cytotoxic and immunomodulatory activities on mice splenocytes stimulated by this plant aiming to promotes initial molecular studies to provide safe and scientific basis through pre-clinical studies for its potential use in therapeutic means.

2. METHODS

2.1 Biological material (Plant)

R. mangle L. leaves were collected in adulthood in the flowering period (January 2016) in the mangroves of the municipality of Itamaracá, district of Vila Velha state of Pernambuco -Brazil, with 7°40' south latitude and 34°50' west longitude, green leaves were selected, visually pleasing appearance and avoiding degraded or damaged leaves. The botanical identification was carried out by biologist Marlene Barbosa and is in the Herbarium of the Federal University of Pernambuco (UFPE) (UFP. 69.655). The collection was authorized by Pernambuco Company of environment pollution and water management authorized by CA DRFB No 120/2014.

2.2 Preparation of the extracts

The methanolic extract of leaves of *R. mangle* (MELRm) was prepared in National Institute for the Semi-Arid - INSA, in Campina Grande, Paraíba, Brazil. For the preparation of the extract 1kg of fresh leaves of *R. mangle* was triturated in equipment Pulverisette 14 Classic Line (Fritsch), in which small leaves portions were inserted in the machine to obtain a final product sufficiently milled. The methanolic extract was produced from the Low Bubble Point method constant flow extraction (Bejtlich 1996). The plant material was inserted in duplicate in Dionex ASE 350 extractor (Thermo Scientific) (40°C) in stainless steel cells (19 cells), each with 30 g of crushed and 100 mL of methanol solvent (mobile phase) under hydrogen pressure (H₂). The methanolic extract was conducted to standardized 200 ml container placed in the machine's tray, generating a total of 7.6 L. The methanol extract was carried out using a rotary evaporator to in Genevac Rocket™ (Genevac), temperature 40.3°C and cooling temperature of 3.8 °C with a variation of 1.93°C 1h40min through cycles with a pressure of 72 mbar and 648 rpm. Each cycle generates methanol reconditioned making it possible its use in the extract of the production process and also producing the concentrated crude extract (Nagato et al., 2002).

2.3 Phytochemical screening

Phytochemical screening of the methanolic extract of leaves of *R. mangle* (MELRm) through thin layer chromatography was performed. Silica gel plates were used 20x20cm (0.25 mm thick) with suitable developers and development system employing chromatographic patterns as shown in table 1.

2.4 Antimicrobial assays

In the paper disk diffusion test, the Mueller Hinton Agar medium was used for bacteria. To evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), the culture medium used was Müller Hinton (MH) in broth and Agar, respectively (Bauer et al., 1966).

2.4.1 Microorganisms chosen for the antimicrobial test

Five clinical isolates were used for the antimicrobial test: three of *Staphylococcus aureus* and two of *Pseudomonas aeruginosa* all from purulent secretions (wounds) and obtained from the Microorganism Collection of the UFPE Department of Antibiotics - UFPEDA (table 2). Microorganisms that are resistant to two or more antimicrobial groups are considered multi-resistant (Texeira et al., 2004).

2.4.2 Inoculum Standardization

Bacterial suspensions were standardized according to the turbidity equivalent to 0.5 tube of the McFarland scale, corresponding to approximately 10^8 CFU / mL (CLSI, 2015). Six-mm diameter discs were soaked with 20 μ L of the MELRm under study, each disk being 2000 μ g, and placed on the surface of the medium previously seeded with standardized test microorganisms in Petri dishes. The plates were refrigerated for 20 minutes (to start diffusion before growth of the microorganism) and then incubated at 35°C for 24 hours (bacteria). The tests were performed in triplicate and the results, expressed in mm, were calculated by the arithmetic mean of the diameter of the inhibition halos formed around the disks in the three replicates. As a standard,

Kanamicina (eurofarma) was used for Gram-positive and Gram-negative bacteria (Bauer et al., 1966).

2.4.3 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

The determination of MIC was evaluated according to the criteria adopted by the Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI, 2013. Plates of 96 wells were enumerated from 1 to 12 horizontally and in alphabetical order, from A to H and were used vertically. The MELRm was completely dissolved in DMSO until a homogeneous 20.000 µg/mL mixture entitled stock solution was obtained, and a standard suspension of the microorganisms under study was made according to the 0.5 tube of the MacFarland scale. With the exception of the third column, 100 µl of the Müller Hinton broth medium was placed in the other columns, the first column being the negative control, ie containing only 100 µl of the Müller Hinton broth; In the second, 10 µl of the standardized microbial suspension was added to 100 µl of the Müller Hinton broth (positive control). In the third column, 180 µl of the Müller Hinton broth was added and then 20 µL of the stock solution of the crude extract was added. From this column serial dilutions of 1:2 were made, that is, 100 µl of the current column was withdrawn and added in the next column, to the twelfth column. To the wells of the dilutions were placed 10 µl of the suspension of the clinical isolates (Table 3). The plate was incubated for 18 hours and after the incubation period a developing dye (reassuring sodium) was applied, able to more accurately show whether there was turbidity in the well. The MIC value was determined in the concentration of the last well where there was no visible turbidity. From this well, seeds were made by exhaustion on plates with Mueller Hinton Agar medium, to establish MBC, which will be the concentration where there is no growth of colonies. All analysis was performed in triplicate (CLSI, 2013).

2.5 Animals

Female BALB/c mice (6–8 weeks old; 5 animals) were raised and maintained at the animal facilities of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory – LIKA located in Federal University of Pernambuco, Brazil. Mice were kept under standard laboratory conditions (20–22°C and 12 h day and night cycle) with free access to a standard diet

(Labina/Purina, Campinas, Brazil) and water. All experimental procedures were performed with accordance of Ethics Committee of Animal Use (CEUA) of Federal University of Pernambuco (protocol number: 0048/2016).

2.6 Preparation of splenocytes

This procedure was performed in accordance to Melo et al., 2011. After killing the animals with CO₂ gas, the spleen of each mouse was removed aseptically and placed in a Falcon tube containing RPMI 1640 with fetal calf serum (complete medium). In a vertical flow, each spleen was transferred to a Petri dish where they were soaked. The cell suspensions obtained from each spleen were transferred to Falcon tubes containing approximately 10 ml of incomplete medium. Spleen homogenates were overlaid onto a Ficoll-PaqueTM PLUS layer, with the density adjusted to 1.076 g/ml, and centrifuged at 1000 g at room temperature for 25 min. The interface cell layer containing immune cells was recovered by Pasteur pipette, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged twice at 500g for 10 min. Cells were counted in a Neubauer chamber, and cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%.

2.7 Analysis of cell viability by annexin V-FITC and propidium iodide staining

Mice splenocytes (10⁶ cells) were treated with MELRm at 50, 25, 10 and 5 ug/mL and were maintained in 24-well plates for 24 hours to analyze their cell viability. Untreated cells (control) were used as a negative control. Following this, splenocytes were centrifuged at 4 °C, 450g for 10 min. After discarding the supernatant, 1 ml of PBS 1X was added to the precipitate and this was then centrifuged at 4°C, 450g for 10 min. After discarding the supernatant, the pellet was resuspended in a binding buffer (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1.8 mM CaCl₂) and annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500) and propidium iodide (PI, 20 µg/mL) were added to each labelled cytometer tube. Flow cytometry was performed in a FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences) and analyzed using Cell Quest Pro software (Becton Dickinson). Result analysis was performed in graphs by dot plot. Annexin-FITC negative/PI positive cells were considered necrotic cells and Annexin-FITC positive/PI negative represented

splenocytes in the early stage of apoptosis. Double negatives were considered viable cells.

2.8 Measurement of cytokine levels in splenocytes supernatants by Cytometric Bead Array System (CBA)

Supernatant by culture of splenocytes were used by measure cytokine release by these immune cells. Cultures were treated with 10 µg/mL of MELRm and after 24 and 48 hours supernatants were collected by cytokine and nitric oxide assays. Cytokine assessment was carried out using human Th1/Th2 cytokine kit II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) for simultaneous detection of six cytokines IL-2, -IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), and interferon-gamma (IFN-γ) in culture supernatants samples. All data were acquired on FACSCalibur platform. The cytokine measurement was based on the principle of cytometric bead array (CBA) technology. CBA utilizes microparticles or beads labeled with discrete fluorescence intensity. The capture beads were labeled with allophycocyanin and were read at 650 nm or on parameters. The detection antibody specific for cytokines was labeled with phycoerythrin fluorochrome which emits at 585 nm on yellow parameters. The intensity of fluorescence of the yellow parameter is proportional to the amount of cytokine present in test samples. Briefly, test samples (50 µL) and phycoerythrin detection antibody were incubated with capture bead reagent for 3 h in the dark at room temperature. All unbound antibodies were washed (1.0 mL wash buffer) and resuspended in 300 µL before acquisition on FACSCalibur platform. All six cytokines had a single, well separated peak. Six individual cytokine standard curves (range, 0–5000 pg/mL) were run in each assay. The range of detection was between 3000 pg/mL and 5000 pg/mL in accordance with that provided by the manufacturer.

2.9 In vitro nitrite analysis

The same supernatants used for the cytokine evaluation was used in the Nitrite Oxide (NO) analysis. Culture media were carefully collected, in 24 and 48 hours, for subsequent measurement by the colorimetric Griess method (Ding et al., 1988). NO concentration was estimated by the standard curve (3.12–100 µmol/mL). The reading

was carried out in a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan FC, Waltham-USA) at 595nm.

2.10 Proliferation assay using CFSE staining

Same protocol to obtained splenocytes was used for proliferation assay using 5(6)- Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE). After lymphocytes obtainment, cell solution was centrifuged at 300 g at room temperature for 5 min with sterile PBS 1X added with SFB 5% (pH 7.2). After this, the cell solution was adjusted to 10×10^6 cels/mL and received 5mM of CFSE. Cells were incubated for 10 min at room temperature in the dark and centrifuged twice at 300 g/5 min with sterile PBS 1X. Stained cells were cultured for 24 hours with 10 μ g/mL of MELRm and only culture medium (negative control). After culture time cells were centrifuged (300 g/5 min), were carry to acquisition on FACSCalibur platform (Becton Dickinson Biosciences) and results were analyzed using Cell Quest Pro software (Becton Dickinson).

2.11 Statistical analysis

Data were analyzed using non-parametric tests. To detect the differences between groups, the Wilcoxon test was used. Student's t-test was used to analyze the results from cell viability assay. All results were expressed as mean $\pm$ SD and a value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. RESULTS

Phytochemical analysis of methanolic extract of leaves of *R. mangle* showed that MELRm have a many secondary metabolites with a higher concentration of flavonoids, saponins and polymeric proanthocyanidins (Table 3).

After phytochemical characterization, we performed antimicrobial investigation. According to Estevam et al., 2009, extracts of plants that formed zones of inhibition ≥ 10 mm are considered active. In paper disk diffusion test, MELRm showed activity against both Gram-positive *S. aureus* (719 strain) and Gram-negative *P. aeruginosa* (262 strain). As related in methodology, these strains are antibiotic resistant and from surgical wound secretion (Table 4).

MIC test with MELRm showed activity against all three evaluated strains (679,700 and 719) of *S. aureus* at 1000 µg/mL. However, for *P. aeruginosa* strains, MIC was greater than 2000 µg/mL. In addition, MELRm showed values above 2000 µg/mL in MBC test in both microorganisms. Summarizing these results, MELRm presented antimicrobial activity in paper disk diffusion and MIC tests against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* but no activity was observed against Gram-negative strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

After microbiological investigation, we investigated the cytotoxic activity promoted by MELRm against mice splenocytes through flux cytometry. Results showed that ideal concentration used on immunological cells is equal or less than 25 µg/mL (Figure 1). For this concentration, MELRm did not promote significant necrosis or apoptosis.

After cytotoxicity analysis we performed immunological assays with MELRm in 10 µg/mL concentration and we analyzed lymphocytes proliferation, cytokine release and nitric oxide production by splenocytes from mice treated in vitro with MELRm in 24 and 48 hours of incubation.

Results of cytokine production showed that IL-4 was produced in lower, but statistically significant concentration (6.35 x 7.80 averages to control and MELRm, respectively) in 48 hours of assay. However, IL-17 and IL-10 were not produced in significant values by MELRm in treated cells.

On the other hand, MELRm promoted a higher and significant release of pro-inflammatory cytokines in relation to control. In our results, we observed that MELRm showed Th1 stimulation in mice lymphocytes in 24 and 48 hours of assay. In fact, TNF- α , IFN-, IL-2 and IL-6 were produced in higher values in relation to control in all experimental times (Figure 2A-D).

Nitric oxide was produced in higher values by cells stimulated with MELRm in 10 µg/mL, but only at 24 hours of assay (Figure 3).

The presence of immune cells is fundamental to the healing process, thus it was investigated if MELRm was able to promote increase of the cell population in vitro. Results showed that MELRm induced higher lymphocytes proliferation when cultures were stimulated with 10 µg/mL of extract at 24 hours of incubation (Figure 4). This result was expected, because proliferative cytokines IL-2 and IL-6 were produced in higher values.

4. DISCUSSION

Rhizophora mangle is studied about your chemical property since many years ago (Rao et al., 1971). Many of these studies are about antioxidant and antimicrobial activities (Sánchez et al., 2006; Melchor et al., 2001). Moreover, Rhizophora mangle has been reported how potent wound healing agent (Perera et al., 2001; Fernandez et al., 2002). This latest ability promoted by R. mangle can be attributed by the presence of polyphenols as major active principles (Perera et al., 2001).

The pharmacological properties of plants depend on their secondary compounds (Behling et al., 2004; Billah et al., 2013; Perera et al., 2016) these are directly influenced by the place of occurrence, soil, temperature, salinity, environmental pollution and some phenotypic factors makes the same plant have different functions in different places (Edreva et al., 2008; Silva et al., 2010). In addition, the use of organic or inorganic solvents extracts metabolites with different polarities from medicinal plants, configuring different biological activities (Silva et al., 2010; Tan et al., 2011).

Marrero et al. 2006, demonstrate that the aqueous extract of R. mangle peels has anti-inflammatory potential in vitro from the inhibition of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. These studies point to secondary metabolites, such as flavonoids being responsible for the actions reported in the in vivo and in vitro tests. Flavonoids can influence the functions of cells linked to inflammatory processes by acting on enzymes and pathways involved in anti-inflammatory processes such as prostaglandin PGE2, TNF- α (Middleton et al., 2000; Regalado et al., 2016) in inflammatory proteins of macrophages (Talhouk et al., 2007; Ofori-Kwakye et al., 2011).

Williams 1999, isolated and characterized taraxerol and cinnamoylupeol, two triterpenoids from leaves and stem of R. mangle L. These triterpenes are important in protecting the leaves against herbivores of R. mangle from Jamaica. The presence of triterpenes has adjuvant effects with the gastroprotector effects (Pertino et a., 2007) and anti-inflammatory (Medeiros et al., 2007).

Studies of stem extracts from Rhizophora racemosa, from Rhizophora apiculata root and R. mucronata showed the presence of saponins (Ukoima et al., 2005; Ravikumar et al., 2011; Mathew et al., 2012) and Hulchings et al. 1996, report that saponins are used in pharmaceutical industries as antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory and anti-oxidant agents, since they bind to bile salts and cholesterol in the digestive tract, preventing its absorption. It also has antifungal activities

(Lacaille-Dubois et al., 1996; Wendel et al., 2013) as it acts on cell membrane lipids. The presence of saponins in the root extract of *R. mangle* L. reinforces the antibacterial action of this plant.

Studies have demonstrated the antibacterial potential of *R. mangle* bark, leaf and root extracts, confirming reports of the Rhizophoraceae family as an interesting source of antibacterial constituents. Fernandez et al., 2002, evaluated the healing power of mercury-chrome and the extract of *Rhizophora mangle* in wounds, where the best result was in patients who were treated with the extract. The film formed by the interaction of the extract with the proteins favors the isolation of the tissue from the external environment, thus improving the cicatrization. The *Rhizophora* genus has the property of forming complexes with metal ions such as iron, vanadium, magnesium, aluminum and calcium, resulting in a smaller amount of ions for microbial metabolism that are able to interact with peptide compounds forming agglomerates (Cruz et al., 2015; Ferreira et al., 2010).

Our results of the antibacterial activity did not show good performance, corroborating with Lim et al. 2006, which reports that the antiseptic and antimicrobial action of *R. mangle* is linked to a great extent the presence of the tannins and our methanolic extract did not show the presence of tannins. Factors such as habitat, collection, growth phases and solvents (not the most effective and suitable course for solvent preparation) may have influenced the secondary compounds.

Methanolic extract of *R. mangle* was investigated in this study through higher sensitive technique, the cytometry. Results of our study showed that methanolic extract of *R. mangle* can be used safely below 25µgmL on mice splenocytes and it is able to induce, in vitro, lymphocytes proliferation, cytokines production and nitric oxide release. These results are promising because, currently, studies about biological propriety promoted by natural compounds indicate that lower doses must be sufficient to induce immunological or antitumor activities (Liu et al., 2010; Zheng et al., 2016, Dat et al., 2015).

Fernandez et al. 2002 and Perera et al. 2001 showed in your results that aqueous extract of *Rhizophora mangle* was able to promote antiseptic and wound healing and it was also able to promote antiulcerogenic effect. Th1 profile promoted by methanolic extract of *R. mangle* in this study corroborate with this wound healing power. In fact, natural compounds (extracts or isolated molecules) with potent wound

healing effect must be able to stimulate initial pro-inflammatory profile in vitro (Akev et al., 2007; Melo et al., 2011).

Similar to this study, immunomodulatory activities promoted by other natural compounds were investigated. Ammon 2010, showed in his review that *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids showed, in various assays, immunomodulatory profile through downregulation of TNF- and decrease of IL-1, IL-4 and IL-6 production. Resin secreted by the plant *Commiphora mukul* also promoted downregulation of IL-2, TNF-, IL-1 β and nitric oxide production (Manjula et al., 2006).

However, in other immunomodulatory studies it was observed the same behavior related in this research, i.e., pro-inflammatory profile promoted by natural compounds. *Boswellia serrata* promoted a significant increase in the CD4/CD8 T cells subsets (spleen cells) and cytokine (IL-2 and IFN-) production (Gupta et al., 2011); polysaccharides isolated from the leaves of *Combretum racemosum* induced the production of interleukin IL-1 β , IL-6 and TNF- α in human peripheral blood mononuclear cells (Schepetkin et al., 2013); Methanolic and ethanolic extracts of *Davilla elliptica* St. Hill., promoted higher TNF- and nitric oxide production (Carlos et al., 2005) and onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) induced Th1-type immune response in murine macrophage cell line RAW264.7 (Prasanna et al., 2015).

5. CONCLUSION

Methanolic extract of *R. mangle* showed higher immunological modulation through induction of lymphocyte proliferation, TNF-, IFN-, IL-2, IL-6, IL-4 cytokines production and nitric oxide release. The popular use of *R. mangle* on healing activity seems to agree with our scientific findings.

Acknowledgements

This work was supported by Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. We also would like to thank for the Laboratory Immunoparasitology of Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Pernambuco, Brazil and, Instituto Nacional do Semiárido – INSA, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

Authors' contributions:

VSA: conception, design of the experiments, interpretation of data, drafting of the manuscript. DKDN: Microbiological tests and data interpretation. CFOSL: Design of the experiments. MFR: Microbiological tests and data interpretation. LPMM: Microbiological tests and data interpretation. RMX: Review of the manuscript and prepared the linguistic correction of the manuscript and development phytochemical tests. KXFR: Microbiological tests and data interpretation. THN: Supply of reagents and experimental design. VMBL: Supply of reagents and experimental design. MVS: Supply of reagents and experimental design. MTSC: Supply of reagents and experimental design. WH: Development phytochemical tests. CMLM: Conception, design of the experiments, interpretation of data, drafting of the manuscript. JRCV: Review of the manuscript and prepared the linguistic correction of the manuscript.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

REFERENCES

- Schaeffer-Novell, Y., Cintrón-Molero, G., Soares, M.L.G. (2000) Brazilian mangroves. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. 3, 561-570.
- Pil, M. W., Boeger, M. R., Valéria, C., Pie, M. M. R., Ostrensky, A., Boeger, W. A. Postglacial north– south expansion of populations of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) along the brazilian coast revealed by microsatellite analysis. *American Journal of Botany*. 98, 1031–1039.
- Menezes, N. L. (2006) Rhizophores in *Rhizophora mangle* L: an alternative interpretation of so-called “aerial roots”. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78, 213-226.
- Takara, K., Kuniyoshi, A., Wada, K., Kinjy, K., Iwasaki H. (2008). Antioxidative flavan-3-ol glycosides from Stems of *Rhizophora stylosa*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 72 , 2191-2194.

Dat, L. D., Thao, N. P., Tai, B. H., Luyen, B. T. T., Kim, S., Koo, J. E., Koh, Y. S., Cuong, N. T., Thanh, N. V., Cuong, N. X., Nam, N. H., Kiem, P. V., Minh, C. V., Kim, Y. H. (2015) Chemical constituents from *Kandelia candel* with their inhibitory effects on pro-inflammatory cytokines production in LPS-stimulated bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 25, 1412–1416.

Perera, L. M. S., Ruedas, D., Gomez, B. C. (2001) Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 77, 1 – 3.

Annapoorani, A., Kalpana, B., Syed, K. M., Pandian, S. K., Ravi, A. V. (2013) Antipathogenic potential of *Rhizophora* spp. against the quorum sensing mediated virulence factors production in drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytomedicine*. 20, 956– 963.

Melchor, M. Armenteros, O. Fernandez, E. Linares, I. Fragas. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*. 72 (2001) 689-691.

Fernandez, O., Capdevila, J. Z., Dalla, G., Melchor, G. (2002). Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*. 73, 564–568.

Marrero, E., Sánchez, J., Armas, E., Escobar, A., Melchor, G., Abad, M. J., Bermejo, P., Villar, A. M., Megías, J., Alcaraz, M. J., (2006). COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia*. 77, 313–315.

Sánchez, J., Melchor, G., Martínez, G., Escobar, A. (2006). Faure R. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*. 77, 141–143.

Sánchez, J., Melchor, G., Martínez, G. (2005). Protective effect of *Rhizophora mangle* bark on lipid peroxidation and erythrocyte hemolysis. *Pharmacognosy Magazine*. 1, 101-105.

Berenguer, B., Sánchez, L. M., Quíles, A., López- Barreiro, M., Haro, O., Gálvez, M. J. (2006). Martín. Protective and antioxidante effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID- induced gastric ulcers. *Journal of Etnopharmacology*. 103, 194-200.

Bejtlich, C. L. (1996). Integrity test for structures using acoustic emission. Milipore Investment Holdings Limited.

Nagato, L. A. F., Duran, M. C., Caruso, M. S. F., Barsotti, R. C. F., Badolato, E. S. G. (2002). Monitoramento da Autenticidade de Amostras de Bebidas Alcoólicas Enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. 21, 39-42.

Wagner, H., S. (1996). *Bladt. Plant drug analysis-A thin layer chromatography atlas*. Springer 2.

Brasseur and Angenot. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate d'aminoethanol. *J. Chromatogr*. 400(1986) 351-355.

Harborne, J. B., 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall, Phytochemical Methods. (1998) 3.

Roberts, E. A. H., Cartwright, R. A., Oldschool, M. (1957) Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. J Sci Food Agr. 8, 72-80.

Stiasny, E. (1912). The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins. Collegium. 483-499.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Shevis, J. C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology. 45, 493-496.

Texeira, P. J. Z., et al. (2004). Pneumonia associada à ventilação mecânica : impacto da multiresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. Journal Brasileiro de Pneumologia. 30, 540-548.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Susceptibility test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. (2015) 1253-1254. Doi:10.1128/9781555817381.ch71.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, pa. 23rd informational supplement. (2013) 23.

Melo, C. M. L., Porto, C. S., Melo-Júnior, M. R., Mendes, C. M., Cavalcanti, C. C. B., Coelho, L. C. B. B., Porto, L. F., Leão, M. T. S. (2011). Correia. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. International Journal of Pharmaceutics. 408, 113-119.

Ding, A. H., Nathan, C. F., Stuehr, D. J.(1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. Journal Immunol. 141, 2407-2412.

Estevam, C. S., Cavalcanti, A. M., Calumbi, E. V. F., Neto, V. A., Leopoldo, P. T. G., Fernandes, R. P. M., Araujo, B. S., Porfírio, Z., Santana, A. E. G. (2009). Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de Maytenus rígida Mart. (Celastraceae). Revista Brasileira de farmacognosia. 19, 299-303.

Rao, C. V. N., Heidelberger, W. P.(1971). Grosvenor. Immunochemical studies of Mangle gum (Rhizophora Mangle L). Immunochemtstry. Pergamon Press. 8, 657-663.

Behling, E. B., Sendão, H. D. C. (2004).Francescato. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. Alimentos e Nutrição. 15, 285-289.

Billah, M., Islam, R., Khatun, H., Parvin, S., Islam, E., Islam, S. M. A., Mia, A. A. (2013). Antibacterial, antidiarrhoeal, and cytotoxic activities of methanol extract and its fractions of Caesalpinia bonducella (L.) Roxb leaves. BMC Complementary and

Alternative Medicine The official journal of the International Society for Complementary Medicine Research. 13, 101

Perera, L. M. S., Piloto, J., D. Canelos, L. Pelzer, Manceb. (2016). Further Pharmacological Evidence Supporting the Development of an Antiulcerogenic Drug Based on *Rhizophora mangle* L. Aqueous Extract. HPLC Method Proposed for Determinating a Chemical Marke. Open Access Library Journal. 3, 1625.

Edreva, A., Velikova, V., Tsoney, T., Dagnon, S., Gurel, A., Aktas, L., Gesheval, L. E. (2008). Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. Gen Appl Plant Physiol. 34, 67-78.

Silva, J. M., Martins, M. B. G., Cavaleiro, A. J. (2010). Anatomical characterization and chemical profiles of *Avicennia schaueriana* and *Rhizophora mangle* leaves from impacted and not impacted mangroves os São Paulo. Journal of Botany. 39, 14-33.

Tan, S. N., Yong, J. W. H., Teo, C. C., Ge, L., Chan, Y. W., Hew, C. S. (2011). Determination of metabolites in *Uncaria sinensis* by HPLC and GC–MS after green solvent microwave-assisted extraction. Talanta. 83, 891-898.

Middleton, E. J., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Review. 52, 673–751.

Regalado, L. M., Sánchez, B. M. (2016). *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapêutico. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research. 4, 1-17.

Talhok, R. S., Karam, C., Fostok, S., El-Jouni, W., Barbour, E. K. (2007). Antiinflammatory bioactivities in plant extracts. Journal of Medicinal Food. 10, 1-10.

Ofori-Kwakye, K., Kwapong, A. A., Bayor, M. T. (2011). Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. Afr J Tradit Complement Altern Med. 8, 218-223 .

Williams, L. A. D. (1999). *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) Triterpenoids with Insecticidal Activity. Naturwissenschaften, 86, 450–452.

Pertino, M., Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J. A., Theoduloz, C. (2007). Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). Journal of Ethnopharmacology. 111, 553-559.

Medeiros R., Otuki, M.F., Avellar, M. C. W., Calixto, J. B. (2007). Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. European Journal of Pharmacology. 559, 227-235.

Ukoima, H. N., Ikata, M., Pepple, G. A. (2005). Control of *Lasiodiplodia theobromae* (PAT) on *Rhizophora racemosa* using plants extracts. American Journal Biotechnology and Molecular Sciences. 3, 1-7.

Ravikumar, S., Gnanadesigan, M. (2011). Hepatoprotective and Antioxidant Properties of *Rhizophora mucronata* Mangrove Plant in CCl₄ Intoxicated Rats. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 4, 66-72.

Mathew, M., Martin Xavier, K.A., Mathew, S., Asha, K. K., Anandan, R., Kumar, A. (2012). Effect of *Rhizophora* Root Extracts on Wound Healing and Yeast – Induced Pyrexia in rats. *Fishery Technology*. 49, 161-166.

Hulchings, A., Scot, A. H., Lewis, A. B. (1996). Cunningham. *Zulu Medicinal Plants. An Inventory* University of Natal Press. Pietermaritzburg. 53-54.

Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H. (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*. 2, 363-386.

Wendel, G. H., Teves, M. R., Paredes, J. D., Sanchez Perera, L. M., Pelzer, L. E. (2013). Evaluation of the Antidiarrheal Activity of *Rhizophora mangle* L. (*Rhizophoraceae*). *Latin American Journal of Pharmacy*. 32, 128-131.

Cruz, S. M., Marroquín, N., Alvarez, L. E., Chang, D. E., Cáceres, A. (2015). Evaluation of Mangrove (*Rhizophora mangle* L.) products as coloring, antimicrobial and antioxidant agents. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*. 2, 12.

Ferreira, F. S., Santos, S. C., Barros, T. F., Rossi-Alva, J. C., Fernandez, L. G. (2010). Atividade antibacteriana in vitro de extratos de *Rhizophora mangle* L. *Revista brasileira de Plantas Mediciniais*. 13, 305-310.

Lim, S. H., Darah, I., Jain, K. (2006). Antimicrobial activities of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* barks. *Journal of Tropical Forest Science*. 18, 59-65.

Liu, B., Bian, H., Bao, J. (2010). Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*. 287, 1–12.

Zheng, Y. F., Zhang, Q., Liu, X. M., Ma, L., Lai, F. (2016). Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on *Magnolia kwangsiensis* Figlar & Noot. *Carbohydrate Polymers*. 142, 98–104.

Akev, N., Turkay, G., Can, A., Gurel, A., Yildiz, F., Yardibi, H., Ekiz, E. E., Uzun, H. (2007). Tumour Preventive Effect of Aloe vera Leaf Pulp Lectin (Aloctin I) on Ehrlich ascites Tumours in Mice. *Phytotherapy Research*. 21, 1070–1075.

Ammon, H. P. T. (2010). Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomedicine*. 17, 862–867.

Manjula, N., Gayathri, B., Vinaykumar, K. S., Shankernarayanan, N. P., Vishwakarma, R. A., Balakrishnan, A. (2006). Inhibition of MAP kinases by crude extract and pure compound isolated from *Commiphora mukul* leads to down regulation of TNF-, IL-1 β and IL-2. *International Immunopharmacology*. 6, 122– 132.

Gupta, A., Khajuria, A., Singh, J., Singh, K. A., Suri, G. N.(2011). Immunological adjuvant effect of *Boswellia serrata* (BOS 2000) on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice. *International Immunopharmacology*. 11, 968–975.

Schepetkin, I. A., Kouakou, K., Yapi, A., Kirpotina, L. N., Jutila, M. A., Quinn, M. T. (2013). Immunomodulatory and Hemagglutinating Activities of Acidic Polysaccharides Isolated from *Combretum racemosum*. *International Immunopharmacology*. 15, 628–637.

Carlos, I. Z., Lopes, F. C. M., Benzatti, F. P., Carli, C.B. A., Marques, M. F., Jordão Junior, C. M., Rinaldo, D., Calvo, T. R., Santos, L. C., Vilegas, W. (2005). Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 15, 44-50.

Prasanna, V. K., Venkatesh, Y. P. (2015). Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. *International Immunopharmacology*

Figure 1. Effects of MELRm on mice splenocytes viability. MELRm showed higher apoptosis only at 50 $\mu\text{g/mL}$ in relation to control (cell + medium). Under 25 $\mu\text{g/mL}$, MELRm can be used safely on mice splenocytes. Vertical bars represent the average of three independent experiments performed in triplicate. # $p < 0.05$.

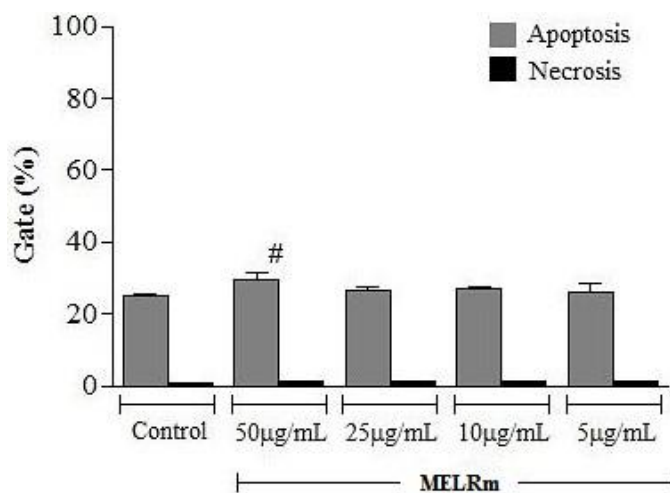


Figure 2. Profile of TNF- α , IFN- γ , IL-2 and IL-6 production promoted by MELRm on mice splenocytes cultures in 24 and 48 hours of assay. **A** – TNF- α was produced in higher values in relation to control in both experimental times. **B** – IFN- γ and **C** – IL-2 were also produced in higher values in relation to control in 24 and 48 hours of assay. **D** – MELRm induced higher IL-6 production only in 48 hours of stimulus in relation to control cells. Vertical gray bars represents control cultures (cells + medium) and vertical black bars represents cultures treated with MELRm in 10 μ g/mL. Vertical bars represent the average of three independent experiments performed in triplicate. # $p < 0.05$.

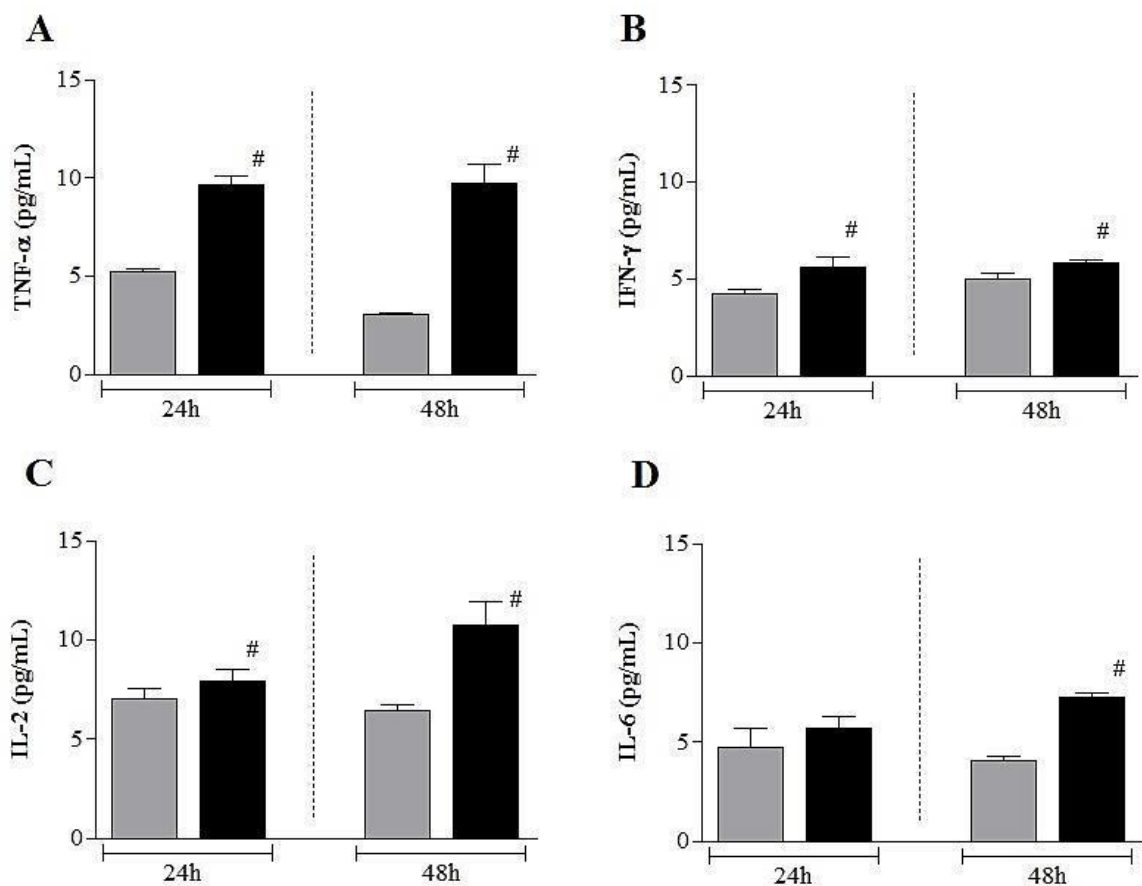


Figure 3. Nitric oxide release promoted by MELRm on mice splenocytes cultures in 24 and 48 hours of assay. MELRm induced higher nitric oxide release in relation to control in 24 hours of assay. Vertical gray bars represents control cultures (cells + medium) and vertical black bars represents cultures treated with MELRm in 10 $\mu\text{g/mL}$. Vertical bars represent the average of three independent experiments performed in triplicate. # $p < 0.05$.

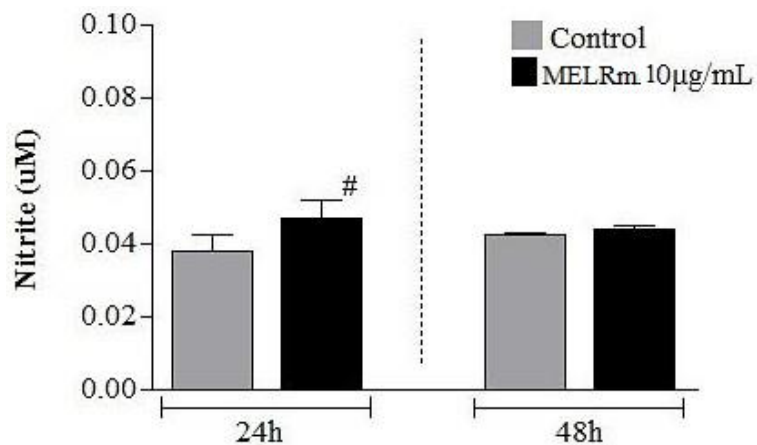


Figure 4. Proliferation index promoted by MELRm at 10 $\mu\text{g/mL}$ in cultures of splenocytes stained with CFSE. MELRm induced higher proliferation of lymphocytes in 24 hours of incubation in relation to control cells. Vertical bars represent the average of three independent experiments performed in triplicate. # $p < 0.05$.

