

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

ELIVÂNIA MARIA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FUNÇÕES  
BIOLÓGICAS DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *LAGUNCULARIA*  
*RACEMOSA* (L.) C.F.GAERTN**

Recife

2019

ELIVÂNIA MARIA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FUNÇÕES  
BIOLÓGICAS DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *LAGUNCULARIA*  
*RACEMOSA* (L.) C.F.GAERTN**

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.

**Área de concentração:** Morfologia e Inovações Tecnológicas.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup> Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivone Antônia de Souza

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Recife

2019

**Catálogo na fonte:**  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Silva, Elivânia Maria da

Caracterização fotoquímica, atividade antioxidante e funções biológicas do extrato aquoso das folhas de *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn / Elivânia Maria da Silva. – 2019.

94 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Ivone Antônia de Souza.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Moutinho Lagos de Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, 2019.

Inclui referências e anexos.

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

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 137

ELIVÂNIA MARIA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FUNÇÕES  
BIOLÓGICAS DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *LAGUNCULARIA*  
*RACEMOSA* (L.) C.F.GAERTN**

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.

Aprovada em: 14/02/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivone Antônia de Souza (Co-orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Maria Silva de Seixas Maia (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jane Sheila Higino (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este mestrado a mulher que me deu o melhor presente, a vida! Minha mãe, Olivia. Mulher rara, poderosa em essência e uma fortaleza de fé. Você me ajuda em forças e incentivo para seguir em meu propósito de vida.

Essa vitória dedico unicamente a você, com todo meu amor. Parabéns para nós!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço à professora Dr<sup>a</sup> Ivone, minha primeira orientadora, por me receber quando era uma aluna completamente desconhecida de Caruaru. Com tanto carinho, avaliou ideias, viu possibilidades e abriu as portas de um sonho que era ser mestre pela UFPE.

Agradeço ao professor Dr<sup>o</sup> Jeymesson, meu orientador final, pela paciência nas tentativas de ajustarmos o projeto ao mais viável possível e mais inovador. E deu certo!

Em especial, agradeço a professora Dr<sup>a</sup> Cristiane Moutinho, que me abriu as portas de seu laboratório (LAIA), de suas técnicas avançadas e de seu enorme conhecimento. Agradeço por tê-la conhecido! Estendo o meu agradecimento a toda a sua equipe: Iranildo, Vanessa, Dayane e aos demais. Vocês foram fabulosos comigo e não mediram esforços, esqueceram sábados ou feriados e ainda entraram noites a fio me ajudando para tornar esse sonho possível. Gratidão!

À todos os professores da pós-morfotec e também aos grandes mestres que conheci em minhas aulas no campus da UFPE – Vitória de Santo Antão. Agradeço pelos conhecimentos únicos e por colaborarem ao meu desenvolvimento técnico e humano. Assim como, agradeço as secretárias da pós-morfotec pela enorme atenção e cuidados valiosos.

Agora um bom momento para agradecer aos amigos, Rilvanessa e família. Jamais esquecerei das pausas em Pombos por estar exausta de dirigir ou ainda querendo apenas aconchego dos amigos. Pausas sempre regadas de ótimas conversas, abraços verdadeiros e amizade real. Eu os amo, profundamente!

Ainda falando sobre amizade, não seria possível concluir essa etapa sem contar com a ajuda e carinho dos colegas farmacêuticos que trocavam plantões e frequentemente alteravam suas jornadas de vida para me ajudar. E nessa loucura da vida, me encontrei nos desafios mentais e físicos de treinos desafiadores. Mauricio Pessoa, você me ajuda a superar obstáculos, arranca risos e lágrimas, “várias”, e me mostra que todos os desafios só são grandes dependendo da altura que enxergamos. Mau, és um irmão de vidas!!! Por fim e tão essencial quanto, Ilka e família, obrigada pelo cuidado com minha mãe em tantas ausências minhas. Vocês são um presente.

“Deus, obrigada por todo o crescimento.”

## RESUMO

*Laguncularia racemosa*, (Combretaceae), é conhecida como mangue branco, uma planta do mangue do Brasil. Popularmente suas folhas são utilizadas na forma de chás e infusões para tratar quadros diarreicos e febris. O presente estudo visa a caracterização fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *Laguncularia racemosa* (EALr). De modo a avaliar as atividades antioxidantes, antimicrobianas, bem como citotoxicidade e perfil imunomodulatório. Foram realizados ensaios de caracterização fitoquímica e o perfil antioxidante verificado pelos métodos de DPPH e antioxidantes totais. Para a atividade antimicrobiana utilizou-se os métodos de difusão em discos e diluição em caldos de crescimento. A citotoxicidade foi analisada nas concentrações de (50 – 3 µg/mL), por meio da marcação das células com anexina V e iodeto de propídio. A medição de citocinas ocorreu nas concentrações de 6 µg/mL e 3 µg/mL, utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA). Nessas concentrações, analisamos óxido nítrico pelo método de Griess e realizamos o ensaio de proliferação celular, por meio da marcação das células de esplenócitos de camundongos com o reagente 5(6) - éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). Os ensaios fitoquímicos do extrato aquoso de *Laguncularia racemosa* demonstraram presença de flavonoides e compostos fenólicos, com significativa atividade antioxidante, contudo baixa atividade antimicrobiana. Verificamos baixa citotoxicidade na concentração de 6 µg/ml e estimulação de proliferação celular, com perfil antiinflamatório. Esses achados sugerem ações contra doenças inflamatórias e no desenvolvimento cicatricial.

Palavras-Chave: *Laguncularia racemosa*. Extrato aquoso. Atividade antioxidante. Antibacteriana. Imunomodulador.

## ABSTRACT

*Laguncularia racemosa*, (Combretaceae), is known as the white mangrove, a Brazilian mangrove plant. Popularly its leaves are used in the form of teas and infusions to treat diarrheal and febrile pictures. The present study aims at the phytochemical characterization of the aqueous extract of the leaves of *Laguncularia racemosa* (EALr). In order to evaluate antioxidant activities, antimicrobial, as well as cytotoxicity and immunomodulatory profile. Phytochemical characterization tests and antioxidant profile verified by DPPH and total antioxidant methods were performed. For the antimicrobial activity the disc diffusion and dilution methods were used in growth broths. Cytotoxicity was analyzed at concentrations of (50-3  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) by labeling the cells with annexin V and propidium iodide. Cytokine measurements were performed at concentrations of 6  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and 3  $\mu\text{g} / \text{mL}$  using the Cytometric Bead Array (CBA) kit. At these concentrations, we analyzed nitric oxide by the Griess method and performed the cell proliferation assay by labeling the splenocyte cells of mice with the carboxyfluorescein diacetate (CFSE) 5-succinimidyl ester reagent. The phytochemical assays of the aqueous extract of *Laguncularia racemosa* showed the presence of flavonoids and phenolic compounds with significant antioxidant activity, but low antimicrobial activity. We verified low cytotoxicity at the concentration of 6  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and stimulation of cellular proliferation, with anti-inflammatory profile. These findings suggest actions against inflammatory diseases and cicatricial development.

**Keywords:** *Laguncularia racemosa*. Aqueous extract. Antioxidant activity. Antibacterial. Immunomodulator.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Representação da planta <i>Laguncularia racemosa</i> .....	21
<b>Figura 2 -</b>	Cladograma evolutivo da espécie <i>L. racemosa</i> (L.) C. F. Gaerth.....	37
<b>Figura 3 -</b>	Cromatograma representativo da análise UPLC-MS da solução aquosa extrato de <i>L. Racemosa</i> .....	41
<b>Figura 4 -</b>	Investigação de citotoxicidade contra esplenócitos de camundongos promovida por extrato de folhas de <i>L. racemosa</i> utilizando coloração com anexina V-FITC e iodeto de propídio em citometria de fluxo. <i>L. racemosa</i> induziu apoptose significativa em 50, 25 e 12,5 µg / mL concentrações em relação ao controle (célula + média). Barras verticais representam a média de duas expericias independentes realizadas em triplicado # $P \leq 0.05$ .....	43
<b>Figura 5 -</b>	Proliferação celular induzida por extrato aquoso de folhas de <i>L. racemosa</i> em esplenócitos de camundongos . Valores significativos foram observados na concentração de 6 µg / mL em relação controle (celular + médio). Barras verticais representam a média de dois experimentos realizados em triplicata # $P \leq 0.05$ .....	44
<b>Figura 6 -</b>	Citocinas produzidas em culturas de esplenócitos tratadas <i>in vitro</i> com 6 e 3 µg / mL do extrato aquoso de folhas de <i>L. racemosa</i> . Estas culturas foram realizadas em 24 horas de incubação. As culturas de controle foram (células + média). Extrato aquoso induziu supressão de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 e IL-2 não foram estimuladas, a IL-17 não foi considerada significante estatisticamente, já a IL-4 foi produzida em valores maiores em relação ao controle. Barras verticais representam dois experimentos independentes realizados em triplicata # $P \leq 0.05$ .....	45
<b>Figura 7 -</b>	Associação entre IFN- $\gamma$ e produção de óxido nítrico em cultura de esplenócitos estimuladas por 24 horas, com extrato aquoso de folhas de <i>L. racemosa</i> . As culturas de controle foram células + médias. Nenhum estímulo foi observado para esses dois parâmetros. As barras verticais representam dois experimentos independentes realizados em triplicata.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Microorganismos obtidos da coleção de Microorganismos do Departamento de Antibióticos e utilizados para o ensaio antimicrobiano.....	32
<b>Tabela 2 -</b>	Caracterização da biomassa de <i>L. racemosa</i> a partir de suas folhas.....	38
<b>Tabela 3 -</b>	Qualificação e quantificação de minerais presentes nas folhas da planta <i>L. Racemosa</i> .....	38
<b>Tabela 4 -</b>	Perfil fitoquímico de macromoléculas e compostos secundários do extrato aquoso de <i>L. Racemosa</i> .....	39
<b>Tabela 5 -</b>	Análise cromatográfica em UPLC-MS dos compostos encontrados no extrato aquoso das folhas de <i>L. Racemosa</i> .....	40
<b>Tabela 6 -</b>	Capacidade de sequestro de radicais livres promovida pelo extrato aquoso das folhas de <i>L. Racemosa</i> .....	41
<b>Tabela 7 -</b>	Teste de difusão em discos de papel realizado por meio do extrato aquoso das folhas de <i>L. Racemosa</i> .....	42
<b>Tabela 8 -</b>	Determinação da Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração bactericida mínima (MBC).....	42

## SIGLAS E ABREVIATURAS

EALr	Extrato aquoso de <i>Laguncularia racemosa</i>
L. racemosa	<i>Laguncularia racemosa</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
HCL	Ácido clorídrico
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumínio
P	Fósforo
Na	Sódio
K	Potássio
Mg	Magnésio
Ca	Cálcio
Fe	Ferro
Cu	Cobre
Zn	Zinco
Mn	Mangânes
Cr	Cromo
DNS	Dinitrosalicilato
HPLC	Cromatografia em camada líquida de alta eficiência
UPLC- MS	Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas
mg EAG/g	Miligrama equivalente de ácido gálico por grama
mg QE / g	Miligrama equivalente de quercetina por grama
mg/kg	Miligramas por quilo
mg/mL	Miligrama por mililitros
µL	Microlitros
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MBC	Concentração Bactericida Mínima
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
CFSE	Éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína
BSA	Albumina sérica bovina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1	OBJETIVOS.....	15
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
2.1	PRODUTOS NATURAIS.....	17
2.2	REGULAMENTAÇÕES BRASILEIRAS RELACIONADAS AOS PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL.....	17
2.3	PRODUTOS BIOTIVOS PROVENIENTES DO MANGUE.....	19
2.4	<i>LAGUNCULARIA RACEMOSA</i> (L.) C. F. GAERTN. – <i>COMBRETACEAE</i> ...20	
2.5	PRODUTOS NATURAIS MODULADORES NO SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	23
<b>3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	25
3.2	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	25
3.3	CASUÍSTICA.....	25
<b>3.3.1</b>	<b>Critérios de Inclusão.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Critérios de Exclusão.....</b>	<b>25</b>
3.4	OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	26
<b>3.4.1</b>	<b>Material Botânico.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Preparação do extrato aquoso das folhas de <i>Laguncularia racemosa</i> (EALr).....</b>	<b>26</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Perfil Taxonômico.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Caracterização química da Planta.....</b>	<b>27</b>
3.4.4.1	Hidrólise com ácido sulfúrico.....	27
3.4.4.2	Determinação de lignina insolúvel na fração sólida.....	27
3.4.4.3	Determinação de cinzas.....	28
3.4.4.4	Determinação de Metais da planta.....	28
<b>3.4.5</b>	<b>Caracterização Fitoquímica.....</b>	<b>28</b>
3.4.5.1	Determinação quantitativa de Taninos totais.....	28
3.4.5.2	Determinação de Saponinas.....	29
3.4.5.3	Determinação de açúcares redutores.....	29

3.4.5.4	Determinação de Proteínas totais.....	29
3.4.5.5	Determinação de Flavonoides totais.....	29
3.4.5.6	Determinação de Compostos fenólicos.....	30
3.4.5.7	Determinação de Proantocianidinas Totais.....	30
3.4.5.8	Determinação da Atividade Antioxidante.....	30
3.4.5.8.1	<i>Sequestro de radicais livres: Método DPPH</i> .....	30
3.4.5.8.2	<i>Atividade Antioxidante Total (TAA %)</i> .....	31
3.4.5.9	Screening fitoquímico - Condições em UPLC-MS (cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas).....	31
<b>3.4.6</b>	<b>Preparação dos testes Antibacterianos.....</b>	<b>32</b>
3.4.6.1	Ensaio de difusão em Disco de papel.....	32
3.4.6.2	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC).....	33
<b>3.4.7</b>	<b>Animais.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.8</b>	<b>Obtenção dos Esplenócitos.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.9</b>	<b>Análise da viabilidade Celular.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.10</b>	<b>Medição da produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA).....</b>	<b>35</b>
<b>3.4.11</b>	<b>Análise <i>in vitro</i> de nitritos presentes nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos de camundongos.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4.12</b>	<b>Ensaio de proliferação usando coloração com 5(6) - éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE).....</b>	<b>36</b>
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização taxonômica e evolutiva de <i>L. racemosa</i> (L.) C. F. Gaerth.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Composição da biomassa das folhas de <i>L. Racemosa</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Perfil fitoquímico e prospecção analítica por cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS).....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Atividade Antioxidante do extrato aquoso de <i>L. Racemosa</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Atividade Antibacteriana.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade através da viabilidade celular por anexina V e iodeto de propídio.....</b>	<b>43</b>
<b>4.7</b>	<b>Ensaio de proliferação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>44</b>

4.8	Produção de Citocinas.....	44
5	DISCUSSÃO.....	46
7	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	56
	ANEXO B - COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL.....	57
	ANEXO C – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTIFICO A REVISTA FOOD CHEMISTRY.....	58
	ANEXO D – ARTIGO CIENTIFICO SUBMETIDO A REVISTA FOOD CHEMISTRY.....	59

## 1 INTRODUÇÃO

Manguezal é um ecossistema de grande biodiversidade e um dos mais produtivos do mundo. É comum sua ocorrência em margens tropicais e subtropicais do equador e localiza-se entre as zonas de marés e costeira. A área de mangue tem como característica a variação de salinidade, escassez de oxigênio, além de propensão a chuvas intensas que favorecem aos altos níveis de nutrientes (ORGE et al., 2000). No Brasil, os principais gêneros de árvores encontradas em mangue são: *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*) (SCHAEFFER –NOVELLI et al., 2000; PIL et al., 2011).

*Laguncularia racemosa*, popularmente conhecida como mangue branco, pertencente à família *Combretaceae*, é comumente encontrada na Costa africana, Bahamas, Flórida, México, Américas e na costa do Brasil (TOMLINSON, 1986). Ocupa o segundo lugar em ocorrência entre os manguezais brasileiros com distribuição similar à *R. mangle* (SCHULER et al., 2000).

Trata-se de uma planta de fácil acesso populacional e em particular por populações ribeirinhas, contudo possui poucas investigações de suas potencialidades biológicas e citotóxicas. Por meio de conhecimentos etnofarmacológicos é sabido que a espécie *L. Racemosa* têm uso popular de suas folhas em preparações de chás e infusões para promoção de efeitos antitérmicos e antidiarréicos (BANDARANAYAKE, 2002; RODRÍGUEZ, 2007). São relatadas propriedades medicinais como adstringentes, inseticidas, antioxidantes, antimicrobianas e potencialidades na hemostasia humana. (RODRIGUES, 2015).

A atividade biológica têm sido correlacionada com a presença de metabólitos secundários da classe dos flavonoides e compostos fenólicos (EBADULLAH et al., 2016).

Tendo a relação entre flavonoides e a atividade antioxidante, algo já bem documentado e que gera grande interesse dadas as possibilidades farmacológicas. Pois, entende-se que o mecanismo de sequestro de radicais livres, promovidos por agentes antioxidantes, podem gerar benefícios na redução do estresse oxidativo e ações anticancerígenas. Más compreende-se que esses benefícios vão além, onde os flavonoides podem influir também em etapas na via de indução do sistema imunológico (ARON; KENNEDY, 2008; RIBEIRO et al., 2015).

Compreendemos que a utilização de plantas com finalidade terapêutica, fitoterapia, é uma prática muito comum e principalmente em países subdesenvolvidos. Contudo, entende-se que insumos derivados ou exclusivos de plantas requerem informações sobre concentrações

ideais, atividades biológicas, bem como citotoxicidade, tornando a administração segura e evitando casos nocivos e até mortais (SOUZA; FELFILI, 2006).

Em se tratando da planta *L. racemosa*, essa é de fácil acesso populacional e suas folhas são utilizadas para fins medicamentosos, contudo a planta possui escassa literatura sobre suas características químicas, suas atividades citotóxicas e biológicas. Ratificando a importância de nos propormos a investigarmos conhecimentos filogenéticos da planta *L. Racemosa* e promovermos a análise da biomassa das suas folhas. Através do extrato aquoso das folhas de *L. Racemosa*, realizarmos análises fitoquímicas, ensaios de atividade antioxidante e testes antimicrobianos. Além de avaliarmos o perfil citotóxico e imunomodulatório contra esplenócitos de camundongos, estimulados *in vitro* por 24h .

Com isso, nosso intuito é fornecer bases seguras e científicas sobre o material vegetal e com potencial terapêutico alternativo para o tratamento de processos inflamatórios, promoção cicatricial e possíveis ações como dermocosméticos, nutracêuticos e anticancerígenos.

---

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *Laguncularia racemosa* e avaliar sua capacidade antioxidante, ação antimicrobiana, bem como verificar citotoxicidade e potencialidades imunomodulatórias.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Traçar o perfil taxonômico e filogenético da planta de mangue *L. racemosa*.
- Determinar a composição da biomassa das folhas da planta.
- Caracterizar o perfil fitoquímico do extrato aquoso de *L. racemosa* (EALr).
- Verificar as ações antioxidantes do extrato.
- Avaliar ações antimicrobianas do EALr frente as bactérias (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritides*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*).
- Determinar a citotoxicidade do extrato em esplenócitos de camundongos.
- Investigar o potencial proliferativo de esplenócitos de camundongos;



- Estudar a capacidade imunomodulatória do extrato aquoso de *L. racemosa*, na indução de citocinas e liberação de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas de esplenócitos de camundongos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS

A utilização de plantas como fonte terapêutica é uma das formas mais antigas da humanidade para tratar, curar ou prevenir doenças e esse conhecimento, foi para muitas civilizações a sua forma exclusiva de terapia e bem-estar (MACIEL et al., 2002). A utilização desse recurso data de 5.000 a.C. sendo reconhecidos em registros chineses anotações de doses, concentrações e as indicações de plantas para tratamentos e vê-se que algumas dessas plantas são utilizadas nos dias atuais ou foram fontes de medicamentos que temos na atualidade como o Ginseng (*Panax spp.*), *Ephedra spp.*, *Cassia spp.* e *Rheum palmatum* L. (DUARTE, 2006). E para algumas civilizações, ainda nos dias atuais, a utilização de plantas é sua forma prioritária de terapia, prática comum na Medicina Tradicional Chinesa (SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2003).

Ao longo dos tempos, esses conhecimentos empíricos e culturais, do uso de plantas, tornaram-se bases para pesquisas científicas que voltaram as atenções em compreender o uso das plantas pelas populações e suas atividades biológicas. Nesse aspecto, ciências como a farmacognosia, a farmacobotânica, assim como a química medicinal. E com os avanços químicos tornou-se possível, caracterizar o metabólito, identificar, quantificar e isolar ativos, tendo possibilidade de elaborar novos produtos sintéticos e ou novos medicamentos fitoterápicos (SIMÕES et al., 2007).

Esse crescimento de medicamentos à base plantas, têm sido ascendente nos últimos trinta anos (1981 – 2010), considerando a quantidade de registros de novas entidades químicas naturais que correspondendo a cerca de 27 % e englobando (fitoterápicos ou ainda de matéria-prima originada de metabolismo microbiano) e apenas cerca de 2% de origem sintética (PIMENTEL et al., 2015).

### 2.2 REGULAMENTAÇÕES BRASILEIRAS RELACIONADAS AOS PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL

Dada a enorme utilização de fitoterápicos no Brasil e pelo entendimento de que plantas medicinais não apresentam apenas atividades farmacológicas possuindo também nível de toxicidade. O Ministério da Saúde implantou em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinas e Fitoterápicos (PNPMF), por meio do Decreto nº 5813, de 22 de Junho de 2006, visando

promover a regulamentação das áreas de cultivos das plantas medicinais, dar melhores subsídios técnicos à produtos e pesquisadores como fontes de novas trocas de informações e visando à estimulação das Indústrias Farmacêuticas às plantas medicinais (BRASIL, 2006).

A partir das ações da PNPMF, em 2009 foi criado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, objetivando nortear sobre princípios para a promoção do acesso da população às plantas medicinais e aos fitoterápicos. De maneira a corroborar, ainda em 2009, foi lançado pelo Ministério da Saúde, a Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), contendo aproximadamente 71 tipos de plantas, visando demonstrar plantas utilizadas pela população e permear pesquisas para tratamentos a partir desses insumos ativos (BRASIL, 2009).

E de maneira a organizar a sistemática de controles de produção e segurança de medicamentos fitoterápicos, foram elaboradas Resoluções com poder de lei, como a Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 13/13 dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos e estabelece os requisitos mínimos para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos e também a RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010, que trata sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos , com o objetivo de promover segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos desde a sua origem até o produto final, disponível para comercialização. Assegurando todas as etapas de fabricação, desde a estrutura fábri, corpo técnico apto e tendo como arcabouço de segurança um sistema de qualidade que assegure com eficiência de todas as etapas (BRASIL, 2010).

Então verifica-se que há respaldo de lei no Brasil, para a produção de medicamentos fitoterápicos, mas ainda é enorme utilização de forma livre pela população ou mesmo é comum a falta de orientações adequadas ao uso dos medicamentos. Algo verificado pelo aumento de reações adversas à medicamentos (RAM's) e intoxicações a medicamentos de matéria prima natural. E considerando o fato de que muitos profissionais de saúde desconhecem as reações adversas dos medicamentos naturais, vão ocorrendo sub-notificações e se torna ainda maior a urgência de mais informações sobre os efeitos tóxicos, concentrações, público-alvo e contraindicações. De maneira a informar à população e aos profissionais os riscos e benefícios do uso dos fitoterápicos (GALLO et al., 2000).

## 2.3 PRODUTOS BIOTIVOS PROVENIENTES DO MANGUE

Manguezal é um ecossistema de grande biodiversidade e um dos mais produtivos do mundo. Sendo comum sua ocorrência em margens tropicais e subtropicais do equador e localiza-se entre as zonas de marés e costeira. A área de mangue tem como característica a variação de salinidade, escassez de oxigênio, além de propensão a chuvas intensas que favorecem aos altos níveis de nutrientes (ORGE et al., 2000).

Trata-se de um ambiente rico em biodiversidade, sendo abrigo de peixes, crustáceos, aves e microorganismos, que dadas as exigências do ambiente necessitaram ao longo dos anos de se adaptarem ao meio para a permanência e sobrevivência de suas espécies (PINHEIRO et al., 2008).

Esse ecossistema, possui grandes variações de extensões por todo o território brasileiro. Considera-se que as regiões de mangues se estendem para cerca de 13 mil km<sup>2</sup>, a partir do Cabo Orange (ao norte) até o sul em Laguna, no estado de Santa Catarina. E correlacionando às regiões brasileiras, a região Norte do país é a que mais possui regiões de mangue com cerca de 80% , já a região Nordeste e Sudeste são as que possuem menores áreas de manguezais, tendo como fatores de crescimento das cidades e urbanização e déficit de conservação , como agravantes desse descréscimo (SPALDING et al., 2010). Considerando a região Nordeste, o estado de Pernambuco possui uma área de mangue que compreende 23.973 hectares e a maioria localizada 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).

Dentre as várias importâncias das regiões de manguezais têm-se que são o criadouro de crustáceos e moluscos, além da importante contribuição na redução de gases e do efeito estufa , devido a capacidade dos manguezais absorverem o carbono , utilizando-o na fotossíntese e armazenando-o na forma de carboidratos, como celulose e açúcares, metabólitos primários (AMARO & ROCHA JUNIOR, 2012). Além da importância faunística, tem-se também a relevância sócio-econômica, já que manguezais são a fonte de subsistência, seja pela obtenção de recursos próprios ou na comercialização dos recursos pescados (ACHARYA, G. 2002).

Em se tratando da flora de mangue, são catalogados no Brasil, quatro principais 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).

Dentre as principais atividades biológicas relacionadas as plantas de manguezais têm-se antibacterianas (BERENGUER et al., 2006), atividades cicatrizantes (FERNANDES et al., 2002), antioxidantes (SANCHEZ et al., 2006), antiinflamatória (MARRERO et al., 2006). Estudos demonstram atividades adstringentes, inseticidas, antioxidantes, antimicrobianas e potencialidades na hemostasia humana. (RODRIGUES, 2015; SILVA M.R.O et al., 2011).

E correlacionam-se as atividades biológicas a presença de compostos bioativos, sendo os metabólitos secundários os mais pesquisados. As plantas possuem diversas vias metabólicas e que podem originar variados tipos de metabólitos secundários. Consideram-se duas as principais vias de sínteses dos metabólitos secundários a via do ácido chiquímico e de acetato, embora ambas partem do metabolismo da glicose. A rota de síntese do ácido chiquímico origina compostos que tem em comum a presença de anéis aromáticos, quimicamente, cadeias fechadas, como os fenilpropanoídes, alcaloides e taninos e já pela via acetato melovonato derivam os aminoácidos que possuem quimicamente, cadeias abertas, como os terpenóides, esteroides, triglicerídeos e ácidos graxos (SIMÕES et al., 2007).

Dentre os metabólitos secundários destacam-se os flavonoides, um grupo de compostos químicos fenólicos, que tem como origem metabólica a via chiquimato e acetato. E se subdividem em classes: flavonóis (quercetina, kaempferol, miricitina, fisetina), flavonas (luteolina, apigenina), flavonoides glicosilados (astragalin, rutina), flavanas (catequina, epicatequina), aurones (leptosidin, aureusidin), isoflavonas (genesteína, daidzeína), antocianidinas (cianidina, delphinidina) e chalconas, (SINGH et al., 2014). São comuns nas plantas outros metabólitos secundários, como: alcaloides, saponinas e proantocianidinas (SANTOS & LANA, 2017). Ou ainda, compostos fenólicos, fenóis, terpenos e terpenóides (SIMÕES et al., 2010). Muito embora, os flavonoides sejam os metabólitos secundários que possuem maiores interesses em pesquisas, considerando sua capacidade antioxidantes e a influência em possíveis ações regressoras do câncer em estágios iniciais. Assim como possíveis ações na imunomodulação (ARON; KENNEDY, 2008).

## 2.4 LAGUNCULARIA RACEMOSA (L.) C. F. GAERTN. – COMBRETACEAE

*Laguncularia racemosa*, também conhecida pela sinonímia de mangue –branco , pertence a família *Combretaceae*, de gênero *Laguncularia* e espécie *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. Como parte da família das *Combretaceae*, têm-se a *Lumnitzera*, contudo suas duas espécies, não foram catalogadas na América (TOMLINSON, 1986). A *Laguncularia racemosa*, não é a única da espécie comumente encontrada nas regiões de manguezais brasileiros, tendo-

se também a planta *Conocarpus erectus* L., popularmente conhecida como botão de mangue (BANDEIRA, 2003).

Trata-se de uma planta de mangue, que possui uma altura mediana chegando a cerca de 10 metros de altura e que se desenvolve mais frequentemente em áreas limítrofes entre mangue e a terra firme (SCHULER et al., 2000). Apresenta folhas em formato oposto, com lâmina foliar elíptica arredonda em suas extremidades e com presença marcante de pecíolo avermelhado em cuja base apresentam um par de glândulas, também de formato arredondado, e que são os nectários extraflorais (RODRIGUES, 2007). Suas trocas gasosas ocorrem de maneira pneumotófora. O seu tronco pode apresentar cerca de 30 cm e tem característica de apresentar uma casca fibrosa (SILVA M. et al., 2010), (figura 1).

**Figura 1** - Representação da planta *Laguncularia racemosa*.



**Fonte:** Próprio autor

Popularmente, a madeira dessa planta é utilizada para emoldramento das estruturas de casas (SILVESTRE et al., 2012). Já no uso medicinal, são citadas a utilização das folhas em infusões e chás para tratar disenterias e febres (RODRIGUÉZ, 2007).

Sobre as atividades farmacológicas e tóxicas dessa planta, a literatura é escassa. Más entende-se que suas atividades biológicas têm sido correlacionadas com a presença de metabólitos secundários da classe dos flavonoides e compostos fenólicos (EBADULLAH et al., 2016). Pinho (2014), verificou a presença de 10 flavonoides glicosilados, a partir do extrato metanólico de *L. racemosa* e avaliou as atividades antiedematogênicas, antifolipásicas e antimiotóxicas induzidas pela enzima sPLA2, presente no veneno de *Bothrops jararacuçu*, e ressaltou que quando em maiores concentrações de flavonoides maiores as atividades antiedematogênicas e antifolipásicas, não sendo satisfatória a atividade antimiotóxica. Algo semelhante foi testado por Costa (2018), em que foram isoladas, enzimas serino proteases do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, para avaliar a eficiência dos flavonoides

Quercetina 3-0 arabinósido e a Quercetina 3-0 rhamnosideo, extraídos do extrato metanólico das folhas de *L. Racemosa*, de modo a avaliar as atividades miotóxicas e edematogênicas. Contudo o resultado demonstrou que os flavonoides isolados não foram capazes de inibir o edema e sugerem que se faz necessário maior nível de peroxidação lipídica e metabolismo de ácido araquidônico.

Estes achados reforçam que as possíveis ações antiinflamatórias e antioxidantes de extratos da planta podem estar correlacionadas a presença de metabólitos e em particular de flavonoides, mais concentrados nas folhas (RIBEIRO et al., 2015).

Para melhor compreensão dos componentes químicos das folhas da planta Pinho (2014), identificou, por meio de extrato metanólico, a presença de 10 flavonoides glicosilados pertencentes a classe dos flavonóis, miricetina e quercetina. E com presença de grupo galiol, derivado do ácido gálico. Esse trabalho veio a complementar a pesquisa de Shi e colaboradores (2010), onde foram identificados 4 flavonoides, sendo três pertencentes a classe das flavonas (crisina, luteolina, apigenina) e um a classe flavanonas (naringenina). Relata-se que na planta *L. racemosa*, há a presença de outros metabólitos secundários, como taninos e em particular os hidrolisáveis, bem como compostos fenólicos, com maior presença de ácido gálico (EBRAHIM et al., 2012; PINHO, 2014).

---

A atividade antimicrobiana voltada as ações antifúngicas foi testada a partir do extrato metanólico das folhas e das cascas de *L. racemosa*, relatando-se sensibilidade intermediária frente às leveduras *C. glabrata* e *T. pullulans* e bons resultados contra fungos dermatófitos, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, e *T. rubrum*. Este estudo demonstrou que nas folhas é de onde advém maior atividade biológica, já que houve ausência de atividade quando em testes a partir das cascas (SILVA M.R.O 2004). Esse conhecimento veio a corroborar com estudos de (SILVA M.R.O et al., 2011), que isolou cepas de fungos, a partir das folhas de *L. racemosa*. Onde o fungo *Mycelia Sterilia* (da classe dos *Agromycetescetes*), apresentou atividade frente às bactérias *S. Aureus*, *B. Subtilis*, *M. Luteus* como gram-positivos e *E. Coli* (gram-negativo). Contudo, baixa sensibilidade frente à *P. aeruginosa* (gram-negativa).

Pode-se verificar que há enorme riqueza na flora de manguezais, em que dada a complexidade do ambiente possuem metabólitos que são de interesse para nortear pesquisas biológicas e ou inovação terapêutica.

## 2.5 PRODUTOS NATURAIS MODULADORES NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Visando o entendimento de regulação do sistema imunológico, se faz necessário compreender que o organismo humano possui defesas, que são as barreiras que objetivam regular desordens e eliminar organismos estranhos. Essa regulação ocorre de forma dinâmica, agindo por meio da imunidade inata (barreira, química, física e biológica) e imunidade humoral ou adquirida (ABBAS et al., 2001).

Entendendo-se que a imunidade inata é a barreira inicial de contenção, onde ocorrem processos oxidativos e reações inflamatórias, com ativação de células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, leucócitos) ao local de inflamação ou lesão e quimiotaxia por liberação de quimiocinas. E que promovem alterações fisiológicas como: elevação da temperatura corporal, migração e infiltração celular ao local afetado e estímulos do arcabouço de defesas para eliminar e remover o agente estranho ou o desequilíbrio. Em caso de falha recorre-se ao sistema de imunidade adquirida ou resposta imune humoral (IMHOF & DUNAN, 1995).

Na imunidade adquirida, os mecanismos são mais sofisticados, envolvendo a produção de anticorpos pelos linfócitos B, que são moléculas imprescindíveis para a memória celular, se diferenciam em 5 diferentes tipos (IgG, IgA, IgM, IgE e IgD), variando segundo rearranjos genéticos (JANEWAY et al., 2002). Contudo, para que ocorra a estimulação de linfócitos B, se faz necessário que as células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, leucócitos), também chamados de células apresentadoras de antígenos (APC), expressem frações dos antígenos em sua superfície por meio do seu complexo de histocompatibilidade aos linfócitos T (TCD4+ e TCD8+), sendo os linfócitos T (CD8), chamados de matadores e T (CD4) de auxiliares. Para a diferenciação dos linfócitos T auxiliares têm-se a influência do tipo de citocina envolvida, variando em Th0, Th1, Th2 e Th17, sendo as respostas Th1 e Th2 (KOURILSKY e TRUFFA-BACHI, 2001).

A resposta Th1 produz citocinas relacionadas com a defesa mediada por células fagocíticas, contra agentes estranhos e são caracterizadas pela produção de IL -2, interferon gama (INF-  $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Além da ativação de células TCD8 que medeiam a citotoxicidade celular (ARAÚJO et al., 2008).

Já a resposta Th2 está associada com a imunidade humoral ou adquirida e é caracterizada pela produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL13. Que por sua vez agem atuando em quadro de infecções helmínticas e alérgicas, por meio da estimulação de mastócitos e eosinófilos. E compreende-se que a citocina IL4 consegue atuar como antiinflamatória, tendo grande importância na promoção da ativação de TH0 a se diferenciar em Th2, influenciando como citocina



que comanda quadros inflamatórios alérgicos. Sendo o principal estímulo para a produção de anticorpo IgE, que é uma imunoglobulina relevante nas reações de hipersensibilidade imediatas (PARKIN e COHEN, 2001).

Várias são as plantas que possuem pesquisas voltadas a verificar suas potencialidades na atividade de imunomodulação do sistema imune (MASIHI, 2000). A literatura relata atividade do óleo da casca de *Cedrus deodora*, atuando na redução de atividade de células fagocíticas e produzindo impactos na minimização da inflamação. Quando em testes celulares, foi também efetivo na diminuição da reação de hipersensibilidade retardada (RHR) (SHINDE et al., 1999). Essa capacidade de redução de hipersensibilidade também foi citada na pesquisa de (DAVIS & KUTTAN, 2000) quando testado o extrato metanólico da raiz da *Withania somnifera*.

Segundo a revisão de literatura foi possível verificar que estudos considerando extratos vegetais da raiz da *Withania somnifera* (DAVIS & KUTTAN, 2000) e do caule de *Tinospora cordifolia* (MATHEW & KUTAN, 1999), assim como o extrato etanólico da casca do caule de *Mangifera indica* (MAKARE et al., 2001) e os frutos de *Punica granatum* (ROSS et al., 2001), promoveram ação imunorregulatória positiva, aumentando o título de anticorpos circulantes e também da proporção de plasmócitos, logo influenciando a atividade de linfócitos T e ativação de linfócitos B.

Para verificação da regulação do sistema imune mediado por citocinas, foi testado o extrato etanólico da raiz *Boerhaavia diffusa*, sendo verificada a capacidade antagonista de síntese de IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-15, interferon- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10, moléculas importantes nas respostas inflamatórias (MEHROTRA et al., 2002). O que ratifica a importância de compreender que as pesquisas também estão voltadas a compressão de possibilidades de ações inibitórias quando em desequilíbrios do sistema imunológico.

Em se tratando das plantas de mangue, o efeito imunomodulatório foi analisado a partir do extrato das folhas de *Conocarpus erectus* (*Combretaceae*), verificando –se a ativação e estimulação da proliferação de linfócitos TDC8+, com presença de mediadores pró-estimulatórios (SANTOS et al., 2018). Algo semelhante, também evidenciado na espécie *Rhizophora mangle* L, que por meio do extrato metanólico das folhas foi possível avaliar a capacidade proliferativa de citocinas e liberação de óxido nítrico, tendo sugestiva ação farmacológica na imunorregulação (ALMEIDA, 2017).

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo pré-clínico, *in vitro*, para a caracterização fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *Laguncularia racemosa*. Visando avaliar sua atividade antioxidante e ações antimicrobianas. Além de analisar a citotoxicidade e potencialidades imunomodulatórias em esplenócitos de camundongos.

#### 3.2 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.

#### 3.3 CASUÍSTICA

##### 3.3.1 Critérios de Inclusão

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

##### 3.3.2 Critérios de Exclusão

Células isoladas de baço de camundongos com baixa viabilidade ou portadores de alguma patologia.

### 3.4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

#### 3.4.1 Material Botânico

As folhas de foram coletadas na fase adulta no período de floração (Janeiro 2018) 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: 83.827. 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).

#### 3.4.2 Preparação do extrato aquoso das folhas de *Laguncularia racemosa* (EALr)

Utilizando as instalações do laboratório de Biotecnologia do departamento de Antibióticos da UFPE, foram pesadas as folhas de *L. racemosa* 1 kg, que foram secas em lugar arejado e sob temperatura ambiente (15 ° a 30°), por 2 semanas . Após secagem as folhas de *L. racemosa* foram trituradas em liquidificador industrial, com pequenas porções de folhas e tempo variável. Ao final foram transferidas para peneira manual de 80µ. O resultante foi então pesado em balança semi-analítica, para obter 50 gramas. O solvente utilizado foi água destilada, sendo aferido o volume de 500 ml de água, por meio de proveta graduada e então foram misturados em um béquer de 1000 mL. Foi realizada uma extração aquosa durante 16 horas, sob agitação vigorosa em agitador magnético e isento de aquecimento e sob temperatura de (28° C). Após as 16 horas a suspensão foi então filtrada por meio de papel de filtro com porosidade de 3 µ, para então o extrato aquoso ser submetido a secagem no equipamento Speed Vac por 24 h.

#### 3.4.3 Perfil Taxonômico

Para análise dos grupos taxonômicos de *L. racemosa* (L.) C. F. Gaerth. Utilizou-se a base de dados pública UniProt Taxonomy (ID: 190524). Em seguida, os dados foram tratados pela base de dados pública de biodiversidade da Enciclopédia da Vida (PARR et al., 2014),

com hierarquia taxonômica para *L. racemosa* (L.) C. F. Gaerth. O software Notepad ++ foi usado para montar a base da programação para fazer o cladogram circular, a partir do script desta espécie de planta (PAGE, 1996 ; DON HO, 2003). A montagem da árvore filogenética foi realizada de acordo com Peterson et al. (2007), e foi utilizado o software TreeViemJ para montar o cladogram a partir do script escrito pelo software Notepad ++. Finalmente, a modelagem de árvore filogenética foi feita em forma circular através do software Dendroscope 3.

### 3.4.4 Caracterização química da Planta

#### 3.4.4.1 Hidrólise com ácido sulfúrico

Foi seguida a metodologia de Gouveia et al. (2009). Amostras de 2 g das folhas de *L. racemosa* foram (moídas a 20 mesh em moinho Wiley) em triplicata, foram pesadas com precisão de 0,1 mg foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado (Fisatom) a 45 °C por 7 min. As amostras foram transferidas quantitativamente para frascos erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água destilada. Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121°C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada. A solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF e lignina solúvel.

#### 3.4.4.2 Determinação de lignina insolúvel na fração sólida

O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel total, por meio do cálculo % Lki- Lignina Klason insolúvel; M<sub>k</sub> - massa de lignina insolúvel seca; M<sub>C</sub> - massa de cinzas; M<sub>A</sub> - massa da amostra seca.

#### 3.4.4.3 Determinação de cinzas

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, a mesma, juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada lentamente até 300 °C e mais 2 h a 800 °C, em uma mufla (Fornitec modelo MDS 15X15X30). Na determinação das cinzas totais, pesaram-se aproximadamente 2 g das folhas de *L. racemosa* em cadinho de porcelana previamente tarado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado pelo cálculo % cinzas (percentual em massa de cinzas) =  $M_c$  - massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio);  $M_a$  - massa da amostra base seca x 100.

#### 3.4.4.4 Determinação de Metais da planta

Foram analisados os metais (Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn e Cr) e determinados usando o equipamento Atomic Absorption Spectrophotometer, série: AA-6300, da marca Shimadzu. Já para o ensaio de sódio (Na) e potássio (K) foram realizados no equipamento Fotômetro de Chama, série: DM-61 e marca Digimed.

### 3.4.5 Caracterização Fitoquímica

#### 3.4.5.1 Determinação quantitativa de Taninos totais

Foi seguido o método de Seigler et al. (1986) e adaptações. O teor de taninos totais das folhas de *L. racemosa* foi obtido por dissolução da planta 250 mg em água destilada 500 mL. Em 2 mL dessa mistura acrescentou-se o reagente Folin-Denis 2mL e a solução restante foi agitada vigorosamente deixada em repouso por 3 min. Preparou-se uma solução de carbonato de sódio a 8% e 2 mL foi adicionada a mistura. Permanecendo em repouso por 2 horas e após esse tempo a amostra foi centrifugada a 2000 rpm para remoção completa de materiais suspensos. Para a quantificação de taninos totais foi preparada uma curva nas concentrações (0,01, 0,02, 0,14 e 0,16 g/mL), para obter a equação  $y=1,301x - 0,0394$ ,  $R^2 = 0,9912$ . A absorvância foi medida a 725 nm utilizando o equipamento espectrofotômetro Hewlett Packard, série 8453. Após realizou-se o cálculo de tanino, TTP (%) tanino total da planta= TEA (Teor de extrato total) X TTE (teor de tanino total do extrato) / 100.

#### 3.4.5.2 Determinação de Saponinas

Pesou-se 2g das folhas da *L. racemosa* e diluiu-se com 10 mL de água destilada. Por 3 minutos foi agitado manualmente e energicamente, no sentido vertical. Após isso, a solução foi deixada em repouso por 2 min. Onde foram marcadas as alturas iniciais e finais após a agitação. Sendo a reação positiva se apresentada espuma, negativa no desaparecimento de espuma e quantificada pelo volume total ocupado pela solução.

#### 3.4.5.3 Determinação de açúcares redutores

Para determinação dos açúcares redutores foi seguido o método de Miller (1959) e adaptado. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método de Dinitrosalicilato- DNS que quantifica glicose, frutose e manose nos tecidos vegetais. Retirou-se 0,5 mL do extrato aquoso de *L. racemosa* e adicionou-se 0,5 mL de DNS. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio, aquecidas por 5 min sob temperatura de 100 °C, esperou-se o resfriamento e após 2 min acrescentou-se 6,5 mL de água destilada, agitando vigorosamente até completa homogeneização. Foi preparada uma curva de calibração com o padrão glicose nas concentrações (0,180, 0,360, 0,540, 0,720, 0,900, 1,080, 1,260 g/L), fornecendo a equação  $y = 0,4362x - 0,0274$ ,  $R^2 = 0,9901$ . O branco foi preparado com as mesmas substâncias da amostra, mas sem o extrato aquoso. Seguindo para a leitura em espectrofotômetro UV visível no comprimento de onda de 540 nm.

#### 3.4.5.4 Determinação de Proteínas totais

Para a quantificação dos teores de proteínas solúveis totais foi empregado o método de Bradford (1976), com a utilização do corante *coomassie brilliant blue*, sob o comprimento de onda de 595nm. Tendo a albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Preparou-se uma curva de calibração nas concentrações de (0, 0,1 e 0,2 mg/ mL), fornecendo a equação  $Y = 6,9054x - 0,0202$ ,  $R^2 = 0,9981$ , com análises em triplicata.

#### 3.4.5.5 Determinação de Flavonoides totais

Os flavonoides totais foram analisados segundo o método de Ordonez (2006). Onde 0,5 mL da amostra de extrato aquoso de *L. racemosa* adicionou-se 0,5 mL de solução a 2 % de

álcool  $\text{AlCl}_3$ . Após uma hora à temperatura ambiente, a absorvância foi medida em 420 nm e uma cor amarela indicou a presença de flavonoides. Uma curva padrão com quercetina (0 - 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) foi realizada para obter a equação  $Y = 0,023 x + 0,1509$ ,  $R^2 = 0,9956$ . Os ensaios foram realizados em quintuplicado. Os flavonóides são expressos em equivalente de quercetina (mg QE / g de extrato).

#### 3.4.5.6 Determinação de Compostos fenólicos

Os conteúdos de fenóis totais foram determinados utilizando o método de Folin-Ciocalteu, descrito por Rocha et al. (2013), com algumas modificações. O extrato diluído 1 mg / mL foi dissolvido em água destilada. Em 0,02 ml de extrato diluído adicionado 0,1 ml de solução de Folin (1:10 v/v). Após incubação, protegido da luz, durante 3 minutos, adicionou-se 0,08 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (7,5%) As amostras foram incubadas protegidas da luz, à temperatura ambiente, durante 120 minutos. Após o tempo de incubação, a absorvância foi medida a 765 nm contra um branco (água destilada). Uma curva de calibração da representação gráfica da absorvância em função de foi preparada a concentração de ácido gálico (0 - 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) e a equação linear ( $y = 0,0048 x + 0,0016$   $R^2 = 0,9999$ ). Os fenóis são expressos em equivalente de ácido gálico (mg EAG / g de extrato).

#### 3.4.5.7 Determinação de Proantocianidinas Totais

A determinação da proantocianidina foi baseada na metodologia Sun et al. (1998), com adaptações. Um volume de 0,5 mL do extrato foi misturado a 3 mL de solução a 4% de vanilina-metanol e 1,5 mL de ácido clorídrico. Para o preparo do branco foram 3 mL da solução de vanilina-metanol a 4% e, 1,5 mL de ácido clorídrico. Uma curva padrão com quercetina (0 - 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) foi realizada para obter a equação  $Y = 0,023 x + 0,1509$ ,  $R^2 = 0,9956$ . As preparações ficaram em repouso durante 15 minutos e após foram lidas a 500 nm. Os conteúdos de proantocianidina foram expressos como catequina equivalentes ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 3.4.5.8 Determinação da Atividade Antioxidante

##### 3.4.5.8.1 Sequestro de radicais livres: Método DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), segundo Blois (1958). 2,5 mL da solução de DPPH • (1 mM e DO 517 =  $0,650 \pm 0,50$  nm) foram misturados em 0,2 mL de extratos, ácido ascórbico e hidroxitolueno butilado (BHT) (3,9 - 500  $\mu\text{g}$  / mL). Após 25 minutos, a absorvância foi lida a 517 nm. O controle foi adicionado DPPH a 0,2 mL de água. A porcentagem de radicais captadores de radicais livres (RSA) foi medida pela fórmula:  $\text{RSA [DPPH]} (\%) = [(Sa - Ca) / Ca] \times 100$ . Onde: Sa = Absorvância da amostra e Ca = Absorvância de controle. Uma curva de calibração foi preparada plotando a absorvância como uma função da concentração de DPPH (0 - 500  $\mu\text{g}$  / mL) e depois encontrando a equação linear ( $y = 0,00007x + 0,0106$   $R^2 = 0,9964$ ). O ensaio foi realizado em cinco repetições.

#### 3.4.5.8.2 Atividade Antioxidante Total (TAA %)

A atividade antioxidante total, seguindo Pietro et al. (1999), foi determinada em função do ácido ascórbico, composto considerado com 100% de atividade. 300  $\mu\text{L}$  de cada amostra e ácido ascórbico (1 mg / mL) foram adicionados a 3 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio) e incubados em água a 95 ° C por 90 minutos . Após o retorno à temperatura ambiente, as absorvâncias foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de solução de fosfomolibdênio e 0,1 mL de água). A atividade antioxidante total calculada pela fórmula  $\text{TAA} (\%) = [(Sa - Ca) / (Aaa - Ca)] \times 100$ , onde: Ca = Absorvância de Controle, Sa = Absorvância da Amostra e Aaa = Absorvância de Ácido Ascórbico. Uma curva de calibração do ácido ascórbico (0-0,5 mg / mL) foi realizada para obter a equação  $y = 0,019x + 0,0723$ ,  $R^2 = 0,9937$ . O ensaio foi realizado em cinco repetições.

#### 3.4.5.9 Screening fitoquímico - Condições em UPLC-MS (cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas)

A cromatografia foi realizada com um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) Acquity H-Class (Waters). Foi empregada uma coluna BEH 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,7 $\mu\text{m}$ . As fases móveis utilizadas consistiram de solução aquosa contendo 2% de MeOH, 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e solução metanólica contendo 0,1% de ácido fórmico (eluente B), que foram bombeadas a uma vazão de 0,3 mL/min. A eluição foi realizada em modo gradiente e a condição inicial (98% A/ 2% B) foi



mantida por 0,25 minutos. A proporção de B foi aumentando linearmente para 99% em 8,5 minutos, se mantendo em 99% de B por um minuto, seguida da imediata diminuição para 2% de B, onde foi mantida até 11 minutos. Dez microlitros de amostra foram injetados. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o auto injetor a 10 °C. O sistema UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa single quadrupolo SQ Detector 2 (Waters). A voltagem do capilar foi de 3,5 Kv, a voltagem do cone 30 V, a temperatura de dessolvatação foi de 450 °C, com fluxo de gás da fonte de 650 L/h. A aquisição dos dados foi feita em modo fullscan, buscando massas entre 100 e 1000 Da, em ionização negativa. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas foi feita através do software MassLynx™ (Waters).

### 3.4.6 Preparação dos testes Antibacterianos

#### 3.4.6.1 Ensaio de difusão em Disco de papel

O ensaio de difusão em disco de papel, descrito por Shan, Cai, Brooks e Corke, (2007), foi utilizado para determinar a inibição do crescimento de bactérias pelo extrato aquoso das folhas de *L. racemosa*. As cepas foram cultivadas em placa a 37 ° C. Após 24 horas, foi realizado um ensaio de difusão em placa utilizando para o teste microorganismos obtidos da Coleção de Culturas de Microorganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) (Tabela 1). As espécies incluídas foram: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritides*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*. O meio nutritivo (7 mL) foi adicionado as placas de Petri, sequenciado a 25 mL de meio de agar Mueller Hinton, bem como 10<sup>6</sup> células de cepas foram adicionados. Quatro buracos de 6 mm de diâmetro foram formados com a ajuda de um molde que forma os poços. Os Poços foram preenchidos com 20 µL de extrato a ser testado.

**Tabela 1** – Microorganismos obtidos da coleção de Microorganismos do Departamento de Antibióticos e utilizados para o ensaio antimicrobiano.

(Número da Coleção) *	Microorganismos
2	<i>Staphylococcus aureus</i>

224	<i>Escherichia coli</i>
396	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
412	<i>Shiguella flexneri</i>
415	<i>Salmonella enteritides</i>
438	<i>Enterococcus faecalis</i>

---

#### 3.4.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)

A atividade antimicrobiana foi determinada por microdiluição em placas de 96 poços, de acordo com os métodos prescritos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2017). O caldo Mueller Hinton foi distribuído em poços e o extrato teste foi adicionado em concentrações variando de 1.600 a 6.25 µg / mL. Em seguida, 10 µL de inóculo microbiano padronizado, contendo  $1,5 \times 10^6$  UFC / mL de *Escherichia coli*, *Shiguella flexneri*, *Salmonella enteritides*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, foram adicionados. As microplacas foram cultivadas a 37 durante 24 h. As microplacas foram então coradas com 0,03% de resazurina e incubadas de 1 a 4 horas para mudanças de cor. O valor de MIC foi determinado na concentração do ultimo poço onde não houve turbidez A concentração bactericida mínima foi determinada pelo estabelecimento da subcultura a partir deste poço em placas de Petri contendo meio Ágar Müeller Hinton, tendo o semeio do tipo esgotamento e seguido de incubação a 37 ° C por 24 h. Foi considerada a MBC (Concentração Bactericida Mínima), a concentração onde não houve crescimento de colônias. A análise foi realizada em triplicata (CLSI, 2017).

#### 3.4.7 Animais

Camundongos fêmeas BALB/c (6-8 semanas de idade, 5 animais) foram criados e mantidos nas 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).

### **3.4.8 Obtenção dos Esplenócitos**

Este procedimento foi realizado de acordo com Melo et al. (2011). Depois da eutanásia dos animais (gás CO<sub>2</sub>), 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-Paque TM 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 pélate. 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%.

### **3.4.9 Análise da viabilidade Celular**

Células de Esplenócitos ( $10^6$ ) foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações do EALr (50 a 3 µg/mL). As células tratadas e não tratadas foram então centrifugadas 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 ressuspenso em 300 µL de tampão de ligação (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM e CaCl<sub>2</sub> 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 de apoptose. Os duplos negativos foram considerados células viáveis.

#### **3.4.10 Medição da produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)**

Os sobrenadantes das culturas tratadas com EALr durante 24h, 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, IL 17, bem como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon-gama (IFN-  $\gamma$ ).

A medição de citocinas baseou-se no princípio da tecnologia Cytometric bead array (CBA) e todos os dados foram adquiridos na plataforma FACS Calibur. 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  $\mu$ L) 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 ressuspenso em 300  $\mu$ L 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.

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

Os sobrenadantes de culturas de células incubadas ou não com EALr a 6  $\mu$ g/mL e 3 mg/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  $\mu$ mol / mL). A leitura foi realizada num espectrofotômetro (Bio-Rad 3550, Hercules, CA) a 595 nm.

#### **3.4.12 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  $1 \times 10^6$  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 EALr 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).

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

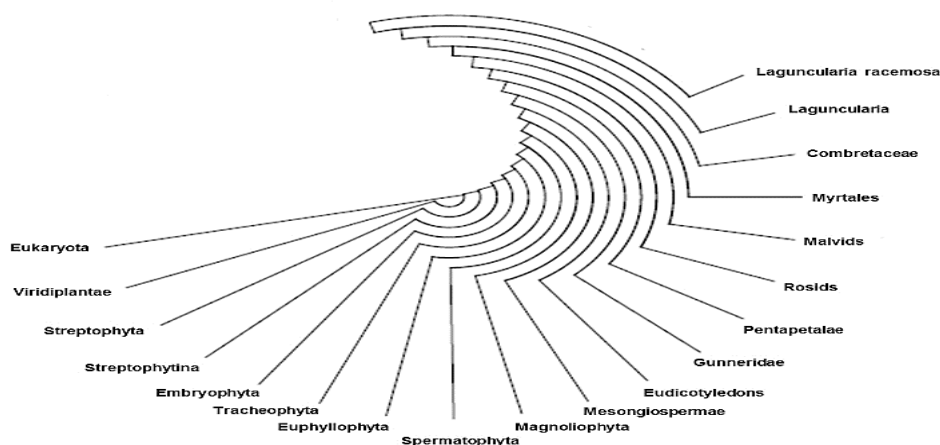
Os dados foram analisados no software Sigma, versão 2.23.03. A normalidade das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para detectar as diferenças entre os grupos, utilizou-se o teste de Wilcoxon. O teste *t*-Student foi utilizado para analisar os resultados do ensaio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

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização taxonômica e evolutiva de *L. racemosa* (L.) C. F. Gaerth

Este estudo investigou conhecimentos taxonômicos, filogenéticos e evolutivos sobre a planta de mangue *L. racemosa* (L.) C. F. Gaerth. Para isso, foi construído um cladograma circular que permite verificar a origem evolutiva da *L. Racemosa* (figura 2). No qual é possível observar que *L. racemosa* não é única espécie do seu gênero *Laguncularia*, e que pertencente à família *Combretaceae*, uma entre três classes consideradas predominantes em ecossistemas manguezais.

**Figura 2** - Cladograma evolutivo da espécie *L. racemosa* (L.) C. F. Gaerth.



**Fonte:** O software Notepad ++.

### 4.2 Composição da biomassa das folhas de *L. Racemosa*

Foi possível dividir a composição da biomassa em dois grupos: estruturais (macromoleculares que estruturam as paredes das folhas, sendo a holocelulose o polímero prioritário) e os componentes não estruturais, podendo ser extrativos e cinzas (tabela 2), identificados como minerais e expressos na (tabela 3). Dentre os minerais, com maior evidência para os íons potássio, zinco e manganês.

A presença de minerais de maneira tão evidenciada sugere que a utilização do extrato aquoso de *L. racemosa* pode ser uma fonte polivitamínica e antioxidante, com potencialidade nutracêuticas.

**Tabela 2** - Caracterização da biomassa de *L. racemosa* a partir de suas folhas

<i>Laguncularia racemosa</i>	Composição (%)
Holocelulose	57,65 ± 0,5
Lignina Total	24,65 ± 4,68
Extrativos	12,35 ± 0,04
Cinzas Totais	5,32 ± 0,10

**Tabela 3** - Qualificação e quantificação de minerais presentes nas folhas da planta *L. racemosa*.

Íons	Unid. de medida	Concentração
P		13,32 ± 9,35
Na		8,24 ± 0,75
K	mg/100g	257 ± 56,8
Mg		74,3 ± 7,85
Ca		119 ± 25,9
Fe		104 ± 27,7
Cu		78,9 ± 10,8
Zn	µg/100g	275 ± 100,1
Mn		256 ± 35,1
Cr		10,8 ± 3,0

### 4.3 Perfil fitoquímico e prospecção analítica por cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS)

Na avaliação dos metabólitos presentes no extrato aquoso das folhas de *L. racemosa* (EALr), foi possível verificar uma alta presença de flavonoides totais e compostos fenólicos, contudo também presentes, mas de forma minoritária proteínas totais, taninos e saponinas, como observado na (tabela 4).

**Tabela 4** - Perfil fitoquímico de macromoléculas e compostos secundários do extrato aquoso de *L. racemosa*.

Compostos	Unidades de medida	Extrato aquoso de <i>L. racemosa</i>
Proteínas totais	(mg/mL)	0,15 ± 0,02
Açúcares redutores	(g/L)	1,6 ± 0,1
Compostos fenólicos	(mg EAG/g)	92,81 ± 3,6
Flavonoides totais	(mg QE/g)	143 ± 0,19
Taninos totais	(%)	3,33 ± 0,008
Protoantocianidinas	(µg/mL)	62,71 ± 0,05
Saponinas	(%)	2,06

Os resultados da análise na UPLC-MS do EALr, identificaram a presença 11 compostos, entre ácidos fenólicos e flavonoides. Sendo majoritária a presença de flavonoides ao total de 9, onde 3 pertencem a classe das flavanas (Catequina, Gallocatequina, , Ourateacatequina), 6 pertencem a classe dos flavonóis ( Isoquercetina, Quercetina, Miricetina, Rutina, Quercitrina e Kaempferol) e 2 são ácidos fenólicos (Ácido caféico, ácido gentísico), sendo diferenciados de acordo com o tempo de retenção, fórmula molecular, peso molecular e massa negativa, estão resumidos na (tabela 5). Bem como expressos por meio do cromatograma (Figura 3).



**Tabela 5** - Análise cromatográfica em UPLC-MS dos compostos encontrados no extrato aquoso das folhas de *L. racemosa*.

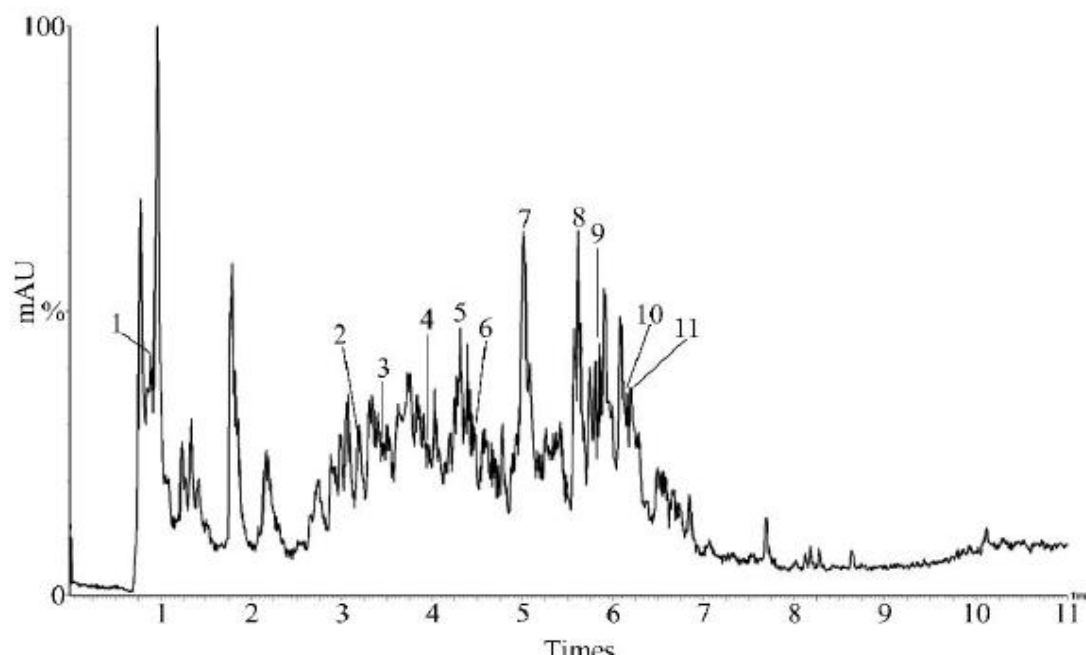
Número do composto	do Compostos	Tempo de retenção (min)	Fórmula molecular	Massa (Da)
1	Ácido cafeico <sup>b,c</sup>	0.91	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180.160
2	Ácido gentísico <sup>a</sup>	3.16	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154.026
3	Kaempferol	3.43	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.239
4	Catequina <sup>b,c</sup>	3.92	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.271
5	Gallocatequina <sup>b,c</sup>	4.31	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	306.270
6	Ouratea-catequina <sup>b,c</sup>	4.47	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	320.089
7	Rutina <sup>a</sup>	5.20	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610.153
8	Isoquercetina <sup>b,c</sup>	5.62	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464.095
9	Quercetina <sup>a</sup>	5.81	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302.042
10	Miricetina <sup>b,c</sup>	6.16	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	318.037
11	Quercitrina <sup>b,c</sup>	6.21	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448.100

a Confirmado por um padrão.

b Confirmado por uma referência.

c Confirmado por massa iônica usando banco de dados químico (Chemspider e PubQuem).

**Figura 3** - Cromatograma representativo da análise UPLC-MS da solução aquosa extrato de *L. Racemosa*.



Fonte: A autora.

#### 4.4 Atividade Antioxidante do extrato aquoso de *L. Racemosa*

A investigação da capacidade antioxidante do EALr, demonstrou que o extrato tem perfil antioxidante, quando confrontado com referências como ácido ascórbico e BHT, especialmente pelo método de DPPH (tabela 6).

**Tabela 6** - Capacidade de sequestro de radicais livres promovida pelo extrato aquoso das folhas de *L. Racemosa*.

Amostras	DPPH		TAA (%)
	(IC <sub>50</sub> - µg/mL)	(% in 0,5 mg/mL)	
<i>L. racemose</i>	96.82	74.33 ± 7.06	26.84 ± 0.11
Ácido ascórbico	19.15	90.04 ± 0.16	100
BHT	20.92	93.13 ± 0.58	4.12 ± 0.10

#### 4.5 Atividade Antibacteriana

Na sequência aos ensaios fitoquímicos foram realizados os ensaios antimicrobianos. E segundo a metodologia de Estevam et al. (2009), os extratos de plantas que promovem medições de halos de inibição  $\geq 10$  mm, são considerados ativos. Considerando o teste de difusão em disco de papel o EALr, foi ativo frente às cepas testadas (Tabela 7).

**Tabela 7** - Teste de difusão em discos de papel realizado por meio do extrato aquoso das folhas de *L. Racemosa*.

Microorganismos	Médias	
	Halos de inibição (mm)	DP
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	18	$\pm 0,00$
<i>Shigella flexneri</i>	18	$\pm 0,00$
<i>Salmonella enteritidis</i>	17,5	$\pm 2,12$
<i>Escherichia coli</i>	18	$\pm 4,95$
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	$\pm 0,00$
<i>Enterococcus faecalis</i>	19	$\pm 0,00$

Para o teste de MIC e MBC, verificou-se que se faz necessário uma concentração maior que 1600  $\mu\text{g/mL}$  para inibição do crescimento microbiano, no que se refere as cepas testadas (Tabela 7 ).

**Tabela 8** - Determinação da Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração bactericida mínima (MBC).

Microorganismos	CMI	CMB
	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$> 1.6$	$> 1.6$
<i>Shigella flexneri</i>	$> 1.6$	$> 1.6$

<i>Salmonella enteritidis</i>	> 1.6	> 1.6
<i>Escherichia coli</i>	> 1.6	> 1.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 1.6	> 1.6
<i>Enterococcus faecalis</i>	> 1.6	> 1.6

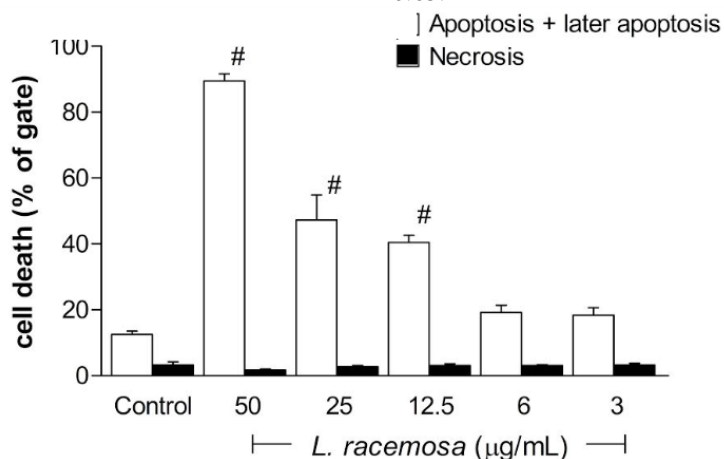
---

#### 4.6 Ensaio de citotoxicidade através da viabilidade celular por anexina V e iodeto de propídio

A viabilidade celular foi testada por meio de esplenócitos de camundongos tratados com EALr, pela técnica sofisticada de citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que o extrato poderia ser usado de forma segura apenas na concentração de 6 µg/mL. Acima dessa concentração o extrato promoveu apoptose em esplenócitos (figura 4). Bem como foram obtidos resultados proporcionais quando testadas as concentrações de 6 µg/mL e 3 µg/mL, não ocorrendo diferenças significativas entre necrose e apoptose.

O estudo demonstra possibilidades farmacotécnicas do extrato aquoso de *L. Racemosa* quanto ao desenvolvimento de formas farmacêuticas líquidas, na apresentação de solução oral. Bem como, para uso via epidérmica na apresentação de curativos, visando tratar úlceras e feridas abertas.

**Figura 4** - Investigação de citotoxicidade contra esplenócitos de camundongos promovida por extrato de folhas de *L. racemosa* utilizando coloração com anexina V-FITC e iodeto de propídio em citometria de fluxo. *L. racemosa* induziu apoptose significativa em 50, 25 e 12,5 µg / mL concentrações em relação ao controle (célula + média). Barras verticais representam a média de duas expericias independentes realizadas em triplicado #  $P \leq 0.05$ .

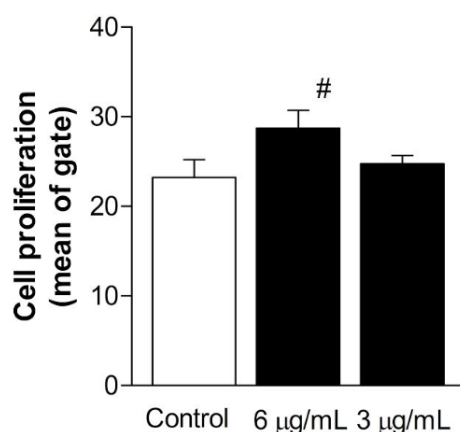


Fonte: A autora.

#### 4.7 Ensaio de proliferação *in vitro*

A proliferação celular é também um dos mecanismos de defesa do organismo para combater agentes externos e faz parte do processo cicatricial. Sendo um comportamento natural em um organismo e esse ensaio de grande relevância para avaliar se as células são ativas após estímulos externos. Foram realizados os ensaios imunológicos com EALr nas concentrações de 6 µg/mL e 3 µg/mL. Verificou-se que o EALr promoveu indução de proliferação de linfócitos em esplenócitos na concentração de 6 µg/mL (Figura 5).

**Figura 5** - Proliferação celular induzida por extrato aquoso de folhas de *L. racemosa* em esplenócitos de camundongos. Valores significativos foram observados na concentração de 6 µg / mL em relação controle (celular + médio). Barras verticais representam a média de dois experimentos realizados em triplicata #  $P \leq 0.05$ .

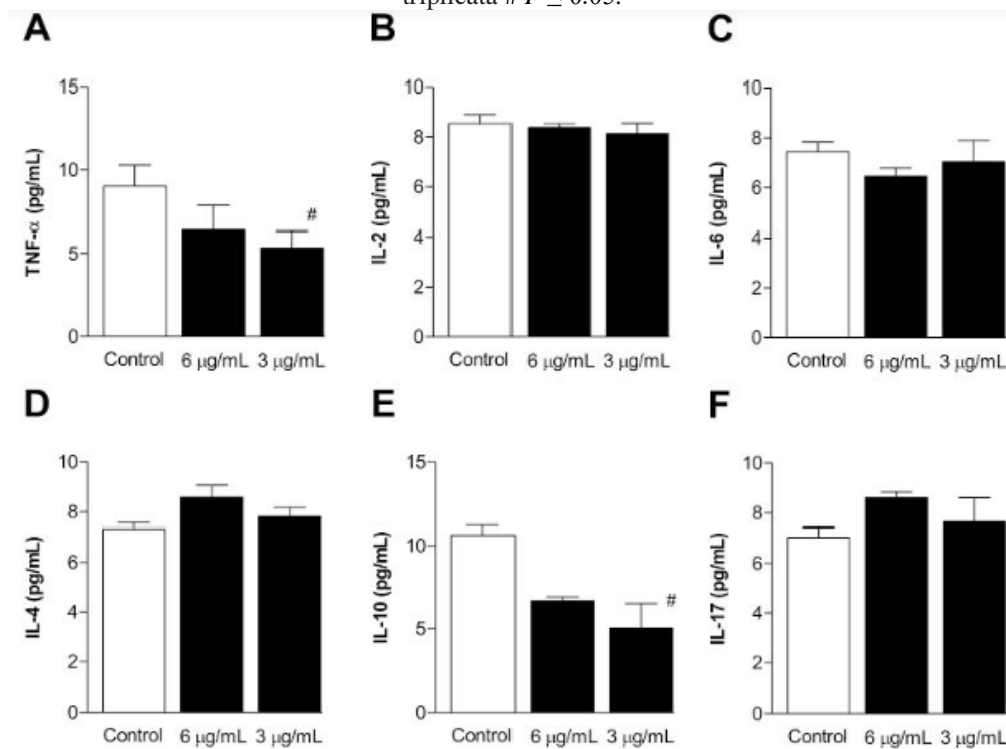


Fonte: A autora.

#### 4.8 Produção de Citocinas

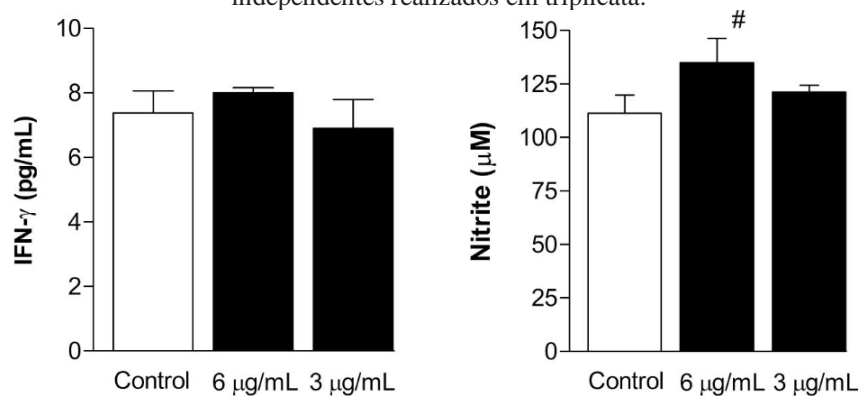
O perfil imunomodulador foi realizado por meio do sobrenadante obtidos de culturas estimuladas, por 24 horas, com concentrações de 6 e 3 µg / mL de extrato aquoso de *L. racemosa*. O perfil de citocinas obtido foi associado com menor estado pró-inflamatório (devido a uma diminuição de TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6). Estando o possível efeito antiinflamatório (associado à alta IL-4) (Figura 6). Além disso, a menor produção de IFN-γ pode estar associada à menor produção de óxido nítrico, já que a produção de óxido nítrico não foi significativa estatisticamente (Figura 7).

**Figura 6** - Citocinas produzidas em culturas de esplenócitos tratadas *in vitro* com 6 e 3  $\mu\text{g/mL}$  do extrato aquoso de folhas de *L. racemosa*. Estas culturas foram realizadas em 24 horas de incubação. As culturas de controle foram (células + média). Extrato aquoso induziu supressão de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 e IL-2 não foram estimuladas, a IL-17 não foi considerada significativa estatisticamente, já a IL-4 foi produzida em valores maiores em relação ao controle. Barras verticais representam dois experimentos independentes realizados em triplicata #  $P \leq 0.05$ .



Fonte: A autora.

**Figura 7** - Associação entre IFN- $\gamma$  e produção de óxido nítrico em cultura de esplenócitos estimuladas por 24 horas, com extrato aquoso de folhas de *L. racemosa*. As culturas de controle foram células + médias. Nenhum estímulo foi observado para esses dois parâmetros. As barras verticais representam dois experimentos independentes realizados em triplicata.



Fonte: A autora.

## 5 DISCUSSÃO

Os produtos derivados de plantas são de grande interesse para pesquisas devido à variedade de metabólitos ativos presentes nas plantas e também pela compreensão de melhor aceitação pela população quando um produto é de origem vegetal (BARREIRO E BOLZANI, 2009). Há vários estudos que contemplam atividades biológicas nas plantas de origem de mangue, como ações cicatriciais, antibacterianas, antiinflamatórias e imunológicas. Entretanto, há escassa literatura sobre a planta de mangue, *L. Racemosa*. O que torna nosso trabalho extremamente relevante em evidenciar potencialidades antioxidantes, avaliar a concentração segura e citotoxicidade, bem como o perfil de imunomodulação.

Com finalidade de identificação de compostos químicos, em nosso estudo os ensaios fitoquímicos, confirmaram a presença de flavonoídes totais e compostos fenólicos, de maneira majoritária. Sendo identificados 11 compostos e destes 9 eram flavonoides e 2 ácidos fenólicos. Esses resultados ressaltam a importância da planta como insumo ativo para novos nutracêuticos, dermocosméticos e medicamentos voltados ao tratamento do câncer. Considerando que os componentes encontrados, são bem relacionados na capacidade antiinflamatória e antioxidante, agindo no sequestro de radicais livres e minimização de danos celulares que poderiam mitigar o tempo de vida útil da célula.

Pinho (2014), analisou a partir do extrato metanólico das folhas de *L. racemosa*, e detectou a presença de 10 flavonoides pertencentes a classe das agliconas: Quercetina e Miricetina. A presença de flavonoides havia sido primeiramente evidenciada por Shi et al. (2010), onde foram isolados 4 flavonoides narigenina, apigenina, crisina e luteolina.

Combinando a presença de compostos da classe dos flavonoides a funções biológicas, Rodrigues (2015), identificou que na fase butanólica do extrato metanólico das folhas de *L. racemosa* havia a inibição significativa da atividade da trombina humana e coagulação do plasma. E que nessa partição, 2 flavonoides foram considerados os mais potentes gerando essa inibição, sendo eles a Quercetina 3-O arabinósido e a Quercetina 3-O rhamnosideo, e produzindo também efeitos na hemostasia. A presença de Quercetina e Miricetina foi detectada também em nosso estudo utilizando a fase aquosa do extrato de *L. racemosa*, o que indica que a diferença com relação as fases extrativas de outras pesquisas com solvente metanólico não impactou na identificação destes dois ativos. Sendo algo extremamente relevante, considerando que em nossa pesquisa analisamos a extração aquosa por ser a forma de extração utilizada pela população.

Com vistas na atividade antiinflamatória com funções antiedematogênicas e antifosfolipásicas. Pinho (2014), realizou o isolamento da enzima sPLA2 (fosfolipase A2), extraída do veneno da serpente *Bothrops jararacuçu* e tratou com extrato metanólico de *L. racemosa*, verificou uma maior atividade na inibição da enzima sPLA2 quando em maiores concentrações de flavonoides. Assim como, uma maior atividade antiedematogênica. Sugerindo que a ação dos flavonoides na atividade biológica poderia estar interligada a dose/resposta. Algo semelhante foi testado por Costa (2018), em que foram isoladas, enzimas serino proteases do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, para avaliar a eficiência dos flavonoides Quercetina 3-O arabinósido e a Quercetina 3-O rhamnosídeo, nas atividades miotóxicas e antiedematogênicas. Contudo o resultado demonstrou que os flavonoides isolados não foram capazes de inibir o edema e sugerem que se faz necessário maior nível de peroxidação lipídica e metabolismo de ácido araquidônico.

Por meio das análises antimicrobianas, verificamos em nossa pesquisa que o extrato aquoso de *L. Racemosa* foi considerado de baixa atividade. Diante das concentrações testadas, observamos que se faz necessário, concentrações superiores a 1600 µg/mL, para uma atividade antimicrobiana mais satisfatória, segundo os ensaios de CMI e MBC.

Ações na atividade antifúngica foram pesquisadas por Silva M.R.O (2004), que realizou ensaios comparativos a partir de extratos metanólicos das cascas e folhas de *L. racemosa* para determinar as sensibilidades contra leveduras e fungos dermatófitos. Revelou que a partir das folhas de *L. Racemosa* o extrato metanólico foi considerado de intermediária atividade contra as leveduras (*T. Pullulans* e *C. glabrata*) e não houve atividade antimicrobiana quando utilizando as cascas. Também obteve resultado satisfatório frente a fungos dermatófitos (*C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), mas sem atividades quando com extrato a partir das cascas. Silva M.R.O et al. (2011), avaliou que a cepa *Mycelia Sterilia*, extraída das folhas de *L. Racemosa* apresentou resultados satisfatórios contra as bactérias (*S. Aureus*, *B. Subtilis*, *M. Luteus*), como gram-positivos e *E. Coli* (gram-negativo).

Foi possível observar, de maneira bastante satisfatória, o perfil antioxidante do extrato aquoso de *L. Racemosa*, ainda mais quando pelo método de sequestro de radicais livres, DPPH. O que veio a corroborar com o entendimento de que a atividade antioxidante correlaciona-se com as concentrações de compostos fenólicos (VALENTÃO et al., 2003). E segundo a literatura essa correlação entre compostos fenólicos e a redução de radicais livres advém da possibilidade de interações químicas com espécies reativas, podendo também ocorrer por quelatação de íons livres, ou ainda por interagir na inibição de enzimas envolvidas na geração de radicais livres (CROFT, 1998; PARR e BOLWELL, 2002; YANG et al., 2002).



Compreende-se que a atividade antioxidante é a mais pesquisada e atribuída a presença de flavonoides. E essa atividade de sequestro de radicais livres tem sido alvo de pesquisas voltadas aos benefícios da redução do estresse oxidativo e ações anticancerígenas, principalmente em estágios iniciais. Más entende-se que esses benefícios vão além, onde os flavonoides podem influir em demais etapas na via de estimulação do sistema imunológico, como as ações na via regulação de sinais, na indução de proliferação celular e permear ações imunomodulatórias (ARON; KENNEDY, 2008; RIBEIRO et al., 2015).

Em se tratando das potencialidades imunomodulatórias das plantas de mangue. Santos et al. (2018), analisou a partir das folhas de *Conocarpus erectus* (Combretaceae), planta de mesma família da *L. Racemosa*, seu o perfil imunomodulatório e citotóxico a partir de células de esplenócitos de camundongos. Verificou presença de perfil imunomodulatório da planta e baixa toxicidade, revelando que o extrato aquoso das folhas induziu a proliferação de linfócitos TCD8+, produção de citocinas (IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ ) e síntese de óxido nítrico. Almeida (2017), pesquisou as potencialidades do extrato metanólico das folhas de *Rhizophora mangle* L. e quanto a imunomodulação verificou que o extrato foi também, capaz de promover proliferação celular e imunomodulação em esplenócitos de camundongos através da produção das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- $\gamma$ ), bem como a liberação de óxido nítrico. Levantando a hipótese de que as potencialidades imunomodulatórias sejam comuns as plantas de manguezais brasileiros.

Em nosso estudo verificamos o potencial de imunomodulador do extrato aquoso de *L. Racemosa*, por meio da baixa citotoxicidade, (concentração de 6  $\mu\text{g/mL}$ ), indução de proliferação celular e também estimulação da produção de citocina (IL-4), sugerindo um perfil antiinflamatório. Estando esta citocina IL-4, intimamente ligada com quadros inflamatórios alérgicos (PARKIN e COHEN, 2001). Nossos resultados sugerem potencialidades do extrato aquoso de *L. racemosa*, quando na apresentação medicamentosa oral, voltadas a redução de quadro alérgicos respiratórios e também alimentares. Assim como possibilidades para via epidérmica como indutor cicatricial (curativos), voltados a feridas abertas com foco em minimizar inflamações e estimular cicatrização.

## 7 CONCLUSÕES

- Nosso estudo confirmou que a planta de mangue *L. racemosa* (L.) C. F. Gaerth, pertence à família *Combretacea*.
- Possui em sua biomassa presença de compostos estruturais como celulose e ligninas e não estruturais, com riqueza de minerais, dentre eles Potássio, Zinco e Manganês.
- A partir do extrato aquoso das folhas de *Laguncularia racemosa*, foram realizados os ensaios fitoquímicos, que confirmaram a presença de flavonoídes totais e compostos fenólicos, de maneira majoritária. Sendo identificados 11 compostos e destes 9 eram flavonoides e 2 ácidos fenólicos.
- Verificou-se a atividade antioxidante do extrato aquoso e de maneira bastante pronunciada pelo método de DDPH.
- Quanto aos ensaios antimicrobianos, pode-se avaliar baixa atividade antimicrobiana. Sugerindo que uma melhor atividade antimicrobiana possa ser alcançada quando em concentrações superiores a 1600 µg/mL, segundo os ensaios de CMI e MBC.
- A concentração segura e eficaz do extrato foi 6 µg/mL, onde ocorreram menores níveis de apoptose e necrose. Algo equivalente fora obtido também na concentração de 3 µg/mL. Nessas concentrações o extrato apresentou indução de proliferação celular e liberação de citocina (IL-4) por células de esplenócitos de camundongos, in vitro. Estando relacionada a um perfil antiinflamatório.
- O extrato aquoso das folhas de *Laguncularia racemosa*, possui compostos ativos capazes de promover atividade antioxidante, proliferação celular, liberação de mediador antiinflamatório e com baixa citotoxicidade. Tendo possibilidades farmacológicas que podem medear pesquisas voltadas a formulações de nutracêuticos, dermocosméticos, indutores cicatríciais (curativos). Bem como, medicamentos anticancerígenos, principalmente em estágios iniciais.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular emolecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- ACHARYA, G. Life at the margins: the social , economic and ecological importance of mangroves. **Madera y Bosques**, p. 53-60, 2002.
- ALMEIDA, V. S. Investigação da atividade citotóxica, antibacteriana e imunomoduladora do extrato metanólico de *Rhizophora mangle linneus (rhizophoraceae)*, Recife- PE, 2017.
- AMARO, V. E. & R.-J. J. M. Avaliação ecológico-econômica do manguezal na foz do rio Açu/RN: o sequestro de carbono e a importância da aplicação de práticas preservacionistas. **Revista de Geologia- Hidrosema**, UFRN, n. 25, p. 71-84, 2012.
- ARAÚJO, J. A. P. et al. Linfócitos T: da imunologia aos imunobiológicos. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 1, p. 3-19, 2008.
- ARON, P. M. . K. . J. A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Mol. Nutr. Food**, p. 79-104, 2008.
- BANDARANAYAKE, W. M. Bioactivities compounds and chemical constituents of mangrove plants. **Wetlands Ecology and Management**, v.10: p. 421-52, 2002.
- BANDEIRA, A. R. G. Estudo Fitoquímico e a Atividade Biológica de *Conocarpus erectus L.* (Mangue Botão), Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco , 2003. p.86.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade : fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, n. 32 (3), p. 679-88, 2009.
- BARROS, H. M. B.; MACEDO, S. J.; LEÇA, E. E. E. A. **Gerenciamento Participativo de Estuários e Manguezais, Recife**. [S.l.]: Editora Universitária da UFPE, 2000.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHEVIS, J. C. . T. M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BERENGUER, B. et al. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle L.* against NSAID- induced gastric ulcers. **Journal Ethnopharmacology**, n. 103, p.194-200, 2006.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature** , n. 181:, p.1199-2000, 1958.
- BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantitations of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** p. 248-254, 1976.
- BRASIL. DECRETO Nº 5813, D. 2. D. J. D. 2. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 23 jun, p. Seção I. 2006.

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC ANVISA/MS 17, D. 1. D. A. D. 2. **Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.** [S.l.]. 2010.

COSTA, C. R. D. C. Avaliação de compostos polifenólicos da *Laguncularia racemosa* sobre a atividade enzimática e farmacológica de serino proteases de *Crotalus durissus terrificus*, São Vicente, p. p.69, 2018.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, n. 854, p. p. 435-442., 1998.

DAVIS, L.; KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 193-200., 2000.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production.. **J. Immunol**, n. 141, p.2407, 1988.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência.**, n. 7., 2006.

EBADULLAH, A.; MAJID ABDOUSS, R. M. L. N. E. . J. N. W. A. S. A.-. In vitro / in vivo study of novel anti-cancer , biodegradable ccross-linked tannic acid for fabrication of 5-fluorouracil- targeting grug delivery nano-device based on a molecular imprinted polymer. **RSC Adv**, 2016.

EBRAHIM, W. et al. Decalactone Derivatives from *Corynespora cassiicola*, an Endophytic Fungus of the Mangrove Plant *Laguncularia racemosa*.. **European Journal of Organic Chemistry** , p. 3476–84., 2012.

ESTEVAM, C. S. E. A. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (*Celastraceae*). **Rev. Bras Farmacognosia**, n. 19, p. 299–303,,2009.

FERNANDEZ, O. et al. Efficacy or *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of pen surgical wounds. **Fitoterapia** , n. 73, p. p.564-568., 2002.

FROELICH, C. J.; DIXIT, V. M.; YANG, X. Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. **Immunology Today**, v. v. 19, p. p. 30-36., 1998.

GALLO, M. et al. Pregnancy outcome following gestational exposure to Echinacea: a prospective controlled study. **Arch Intern Med**, n. 160, p. p.3141-3143., 2000.

GOUVEIA, E. R. et al. **Química Nova**.

HO., D. **Source Forge. Notepad++**. [S.l.]. 2003.

IMHOF, B. A.; DUNON, D. Leukocyte migration and adhesion. **Advances in Immunology**, v. 58, p. p. 345-416, 1995.

JANEWAY, C. et al. **IMUNOBIOLOGIA**: o sistema imune na saúde e na doença. 5a. edição. ed. São Paulo: Artmed editora, 2002.

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

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia**: bases científicas e tecnológicas. 1.Ed. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

M100-S2., C. (. A. L. S. I. S. N. C.-. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing., 2017.M100-S27., (. A. L. S. I. S. N. C.-. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing., n. 27th ed., 2017. ISSN [Online]. Available from: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2017-M100-S27pdf>.

MACIEL, M. A. M. E. A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25,n. 3, p. 429-438, 2002.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica L.* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 133-137, 2001.

MARRRERO, E. E. A. COX- 2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). **Fitoterapia**, v. 77, p. 313-5.

MASIHI, K. N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. *International Journal of Antimicrobial Agent*, v. 14, p. 181-191, 2000.

MATHEW, S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumour activities of *Tinospora cordifolia*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 35-43, 1999.

MEHROTRA, S. et al. Immunomodulation by ethanolic extract of *Boerhavia diffusa* roots. **International Immunopharmacology**., v. 2, p. 987-996, 2002.

MELO, C. M. L. . P. C. S. . M.-J. M. R. . M. C. M. . C. C. C. B. . C. L. C. B. B. . P. L. F. . L. M. T. S. C. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 113-119, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428.

ORDENEZ, A. A. L. et al. **Food Chem**, v. 97, n. 452, 2006.

ORGE, M. D. R. E. A. Assessment of oil refinery waste on *Rhizophora mangle L.* seedling growth in mangroves of todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Aquatic Ecosystem Health & Management** , Canadá, v. 3, n. 4, p. 471-477, 2000.

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

PARR, A. J. . B. J. P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. **J. Sci. Food Parr Agric**, n. 80, p. 985-1012, 2002.

PARR, C. S. . N. . W. P. . L. K. S. . S. K. . L. L. . W. J. A. . H. A. . G. J. . R. M. . S. J. T. G. . H. A. R. J. C. J. The Encyclopedia of Life v2: Providing Global Access to Knowledge About Life on Earth.. **Biodiversity Data Journal 2: e1079**, doi:10.3897/bdj.2.e1079., 2014.

PARR, R. D. M. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, n. 12, p. 357-358, 1996.

PETERSON, M. W. A. M. E. C. T. An application for viewing and analyzing phylogenetic trees. **Source Code Biol Med**, v. 2, n. 1, p. 7, 2007.

PIETRO, P. . P. M. . A. M. Spectrophotometric quantification of antioxidante capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E.. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999.

PIL, M. W. et al. Postglacial north– south expansion of populations of Postglacial north-south expansion os populations of *Rhizophora mangle* (*Rhizophoraceae*) along the brazilian coast revealed by microsatellite analysis. **American Journal of Botany**, v. 98, p. 1031-1039, 2011.

PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES** , v. 43, p. 41-89, 2015.

PINHEIRO, M. A. A. et al. Biodiversidade e conservação dos manguezais: importância biológica e econômica. São Vicente:Universidade Estadual Paulista- Campus Experimental do Litoral Paulista: [s.n.], 2008.

PINHO, M. V. T. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica de extratos obtidos de *Laguncularia racemosa* e atividade inibitória sobre SPLA2 extraída de *Bothrops jararacuçu*., Campinas, SP , v. s.n, 2014.

RENISUS., B. M. D. S. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais..** [S.l.].

REVILLARD, J. P. et al. Apoptosis:potential for disease therapies. **Immunology Today**, v. 19, p. 291-293, 1998.

RIBEIRO, D. et al. Proinflammatory Pathways: The modulation by Flavonoids. **Med Res Rev**, v. 35, p. 877-936, 2015.

ROCHA, M. S.; FIGUEIREDO, R. W. . A. M. A. M. A.; MOREIRA-ARAUJO, R. S. R. Physical and chemical characterization and antioxidant activity (*in vitro*) of fruit of the Piaui savanna. **Rev. Bras. Frutic.**, p. 35, 2013.

RODRIGUES, C. et al. Evaluation of Potential Thrombin Inhibitors from the white mangrove ( *Laguncularia racemosa*). **Mar Drugs**, v. 13, p. 4505-419, 2015.

RODRÍGUEZ, A. V. **Producción forestal – Fundamentos** –. 1ª ed. p. 224. ed. San José, C.R: EUNED, 2007.

ROSS, R. G.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits – a preliminary study.. **J. Ethnopharmacol**, Orlando, v. 78, n. 1, p. 85-87.

SÁNCHEZ, J. et al. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 141-143, 2006.

SANTOS, D. K. D. N.. A. V. S..A. D. R. C.. H. W..S. A. K. A.. M. L. R.. E. A. Evaluation of cytotoxic, immunomodulatory and antibacterial activities of aqueous extract from leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus (*Combretaceae*). **J. Pharm Pharmacol** **70** (8), p. 1092-1101, 2018.

SANTOS, N. M. & L. P. Present and past uses of mangrove wood in the subtropical Bay of Paranaguá (Paraná, Brazil). **Ocean & Coastal Management**, v. 148, p. 97-103.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre: UFSC, 2003.

SCHULER, C. A. B. . A. V. C. & S. D. S. O. M. C. E. E. 2.-3. I. B. H. M.; ESKINAZI-LEÇA, E.; MACEDO, S. J. & L. T. (. ). Gerenciamento Participativo de Estuários e Manguezais. Recife (PE): Ed. Universitária da UFPE, 2000. Cap. 3, p. 252.

SEIGLER, D. S. E. A. Tannins from Four Common Acacia Species of Texas and Northeastern Mexico.. **Journal Science Food Agriculture**, v. 29, p. 778-794, 1986.

SHAN, B. . C. Y. Z. . B. J. D. & C. H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal Food Microbiology**, p. 112-119, 2007.

SHI, C. et al. Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 435-42., 2010.

SHINDE, U. A. et al. Preliminary studies on the immunomodulatory activity of *Cedrus deodara* wood oil.. **Fitoterapia**, v. 70, p. 333-339, 1999.

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.

SILVA, M. R. O. Detecção de Atividade antifúngica de extratos de plantas de manguezal de Vila Velha de Itamaracá (PE)., Recife (PE), 2004.

SILVA, M. R. O. et al. Endophytic fungi from Brazilian mangrove plant *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (*Combretaceae*): their antimicrobial potential.. **Sci Microbial Path: Comm Curr Res Technol Adv.** **2** , p. 1260-1266, 2011.

SILVA, M.; MARTINS, M. B. G. & C. A. J. Caracterização anatômica e perfil químico da lâmina foliar de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn, de manguezais impactados e não impactados do litoral de São Paulo. **Iheringia**, v. 65, n. 2, p. 9, 2010.

SILVESTRE, L. C.; BARROS, S. C. A. & X. S. R. S. Utilização dos recursos vegetais pelos moradores da aldeia Camurupim em área de proteção ambiental.. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 11, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. ed. Florianópolis: UFSC, 2007. 1101 p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre :editora da UFRGS , 2010. 5 p.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 7, 2006.

SPALDING, M.; KAINUMA, M. & C. L. world atlas of mangroves.. **Earthcan**, p. 319, 2010.

SUN, S. S. M.; HANG, C. **Acta Horticulturae**. [S.l.], p. 23. 1998. (467).

TIZARD, I. R. **Imunologia básica – uma introdução**. 5º. ed. São Paulo: Roca Ltda, 1998. 12 p.

TOMLINSON, P. B. The Botany of Mangroves. **Cambridge University Press**, p. 1, 1986.

VALENTÃO, P. . F. E. . C. F. . A. P. B. . S. R. M. . B. M. L. Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (*Centaurium erythraea*) infusion. A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). **Phytomedicine**, v. 10, p. 5, 2003.

Y., S.-N.; G., C.-M.; SOARES, M. L. G. Brazilian mangroves.. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3, p. 561-570., 2000.

YANG, C. S. . L. J. M. . M.-T. . H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu. Rev. Nutr**, v. 21, p. 25, 2002.



**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 – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTIFICO A REVISTA  
FOOD CHEMISTRY**

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Investigation of nutritional contents, antioxidant and  
immunostimulatory activities of aqueous extract from leaves of

*Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: *L. racemosa*; Phenolic compounds; cytokines; anti-inflammatory

Corresponding Author: Dr. Cristiane Moutinho Lagos de Melo, Dr.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pernambuco

First Author: Elivânia da Silva

Order of Authors: Elivânia da Silva; Vanessa Almeida; Dayane Santos;Iranildo Cruz-Filho;  
Gláucia Lima; Daniel Araújo; Fabiane Batista;Jeymesson Vieira; Cristiane Moutinho Lagos de  
Melo, Dr.

Abstract: One of the four most incident species in mangrove is the

*Laguncularia racemosa*, plant widely used in popular medicine against inflammation and fever. Here, *L. racemosa* was investigated in relation to their phytochemical profile, antioxidant activity and antimicrobial effect. Moreover, a cytotoxicity assay was performed in vitro using splenocytes of Balb/c mice to evaluate the safety dose of aqueous extract obtained from leaves as well as the immunostimulatory effects. *Laguncularia racemosa* showed the presence of ions, proteins,carbohydrates, vitamins and high concentration of phenolic compounds.Antioxidant activities were promoted by aqueous extract, especially in DPPH and NO assays. From 6 µg/mL the extract did not induce significant cell death, stimulated the cell proliferation and the production of IL-4. Beyond, decreases of IFN-γ, TNF-α and IL-6 were found. The presence of essential nutrients, significant antioxidant activity and immunestimulation confirm the use of this plant in folk medicine against inflammation.

## ANEXO D – ARTIGO CIENTIFICO SUBMETIDO A REVISTA FOOD CHEMISTRY

### Investigation of nutritional contents, antioxidant and immunostimulatory activities of aqueous extract from leaves of *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn

3

4

5 Elivânia Maria da Silva<sup>1</sup>, Vanessa Silva de Almeida<sup>2</sup>, Dayane Kelly Dias do Nascimento<sup>2</sup>, Iranildo  
6 José da Cruz Filho<sup>2</sup>, Gláucia Manoella de Souza Lima<sup>2</sup>, Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo<sup>3</sup>,  
7 Fabiane Rabelo da Costa Batista<sup>3</sup>, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira<sup>1</sup>, Cristiane Moutinho Lagos 8  
de Melo<sup>2\*</sup>.

9

10

11 1 Department of Histology and Embryology, Biosciences Centre, Universidade Federal de  
12 Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;

13 2 Department of Antibiotics, Biosciences Centre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 14  
Pernambuco, Brazil;

3 Semiarid National Institute, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

19 Corresponding author: Cristiane Moutinho Lagos de Melo, Department of Antibiotics,  
20 Biosciences Centre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

21 Tel: +558121268866

22 E-mail: cristianemout@gmail.com

## Abstract

One of the four most incident species in mangrove is the *Laguncularia racemosa*, plant widely used in popular medicine against inflammation and fever. Here, *L. racemosa* was investigated in relation to their phytochemical profile, antioxidant activity and antimicrobial effect. Moreover, a cytotoxicity assay was performed *in vitro* using splenocytes of Balb/c mice to evaluate the safety dose of aqueous extract obtained from leaves as well as the immunostimulatory effects. *Laguncularia racemosa* showed the presence of ions, proteins, carbohydrates, vitamins and high concentration of phenolic compounds. Antioxidant activities were promoted by aqueous extract, especially in DPPH and NO assays. From 6 µg/mL the extract did not induce significant cell death, stimulated the cell proliferation and the production of IL-4. Beyond, decreases of IFN-γ, TNF-α and IL-6 were found. The presence of essential nutrients, significant antioxidant activity and immune stimulation confirm the use of this plant in folk medicine against inflammation.

**Keywords:** *L. racemosa*, Phenolic compounds; cytokines; anti-inflammatory.

## 1. Introduction

Mangroves are productive and diverse ecosystems that provide large amounts of organic matter (Nagelkerken et al., 2008; Sebastianes et al., 2012a). Australia, Indonesia and Brazil have the greatest abundance of mangroves in the world with different species of invertebrates, animals, plants and microorganisms (Sebastianes et al., 2012b).

Four major plant species are prevalent in mangroves environment, *Conocarpus erectus*, *Rizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* and *Laguncularia racemosa*. These plants are different in morphology (vegetal anatomy), in resistance to environmental stress (different salinity fluctuations) and in survival adaptive mechanisms (growth in various substrates like sand, peat, volcanic lava and carbonate sediments) (Arrivabene et al., 2014). Furthermore, the composition of secondary metabolites present in these species can be change in accordance with seasonality, rain and dry months, presence of pollution and accumulation of heavy metals (Pan and Wang, 2012; da Souza et al., 2014).

*Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn., popularly known as white mangrove, belongs to Combretaceae family and it is present in Pacific and Atlantic coasts and tropical southern Asia (Shi et al., 2010). Many popular stories affirm different ethnomedicinal actions promoted by aqueous and organic extracts obtained from the plant, as well as, bark infusion associated with astringent action, and use against dysentery, aphthae, inflammation, fever and scurvy.

Few studies were published until now proving the biological potential by the plant. A previous publication showed action in different targets induced by phenolic compounds isolated from *L. racemosa*, as insecticidal activity and cancer-related protein kinase inhibition (Shi et al., 2010). Moreover, hydroalcoholic extracts exhibited molluscicidal action (Mendes et al., 2017) and leaves inserted in dietary of laying hens promoted a decreasing of lipid and cholesterol in the yolk of eggs and on hen's plasma (Al-Harthi et al., 2009). Aiming to evaluate the ethnomedicinal use, here we investigated the presence of secondary metabolites and nutrient compounds present in leaves of *L. racemosa* and the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and immunostimulatory effects promoted by aqueous extract obtained from leaves of the plant.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Plant material and collection location

Adult leaves of *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn were collected in April 2018 in Itamaracá Island mangrove, Pernambuco, Brazil (7°40' S, 34°50' W). Healthy leaves with green and showy aspects, visually intact, free of bugs, diseases or altered color were selected. A voucher specimen was identified and deposited in Geraldo Mariz Herbaria at Universidade Federal de

Pernambuco under the number 83.827. Plant collection was authorized by the State Environmental Agency, Recife, Pernambuco, under number CA DFRB N. 120/2014.

## 2.2 Chemical structure analysis of *L. racemosa* leaves

The chemical composition of leaves in terms of holocellulose, lignin, extractives and ash was obtained according to Santos et al. (2018). For total ashes, the metals ions were detected and quantified using the Atomic Absorption Spectrophotometer, AA-6300 series, Shimadzu brand. For sodium (Na) and potassium (K), assays were performed in the Flame Photometer, DM-61 series and Digimed brand.

## 2.3 Aqueous extraction from leaves of *L. racemosa*

After collection, the leaves were kept at room temperature for 4 days drying. The dried leaves were crushed in Reverse Black Oster and the pulverized material (20g) was diluted in 0.15 M NaCl (200 mL) in the proportion of 10 % (w/v). Therefore, using an orbital and alternative incubator shaker (Lab Companion™ IS-971) the material was kept under agitation (400 rpm) in constant temperature (28 °C) for 16 hours. After the stirring time, the material was filtered using filter paper and centrifuged (15 min, 10,000 x g). The supernatant was collected and called aqueous extract of *Laguncularia racemosa* leaves. The extract was lyophilized and 6.92 g of crude material was obtained. Material was stored at -20 °C until use.

## 2.4 Determination of total protein and carbohydrates

Total proteins content was measured according to Bradford method (1976), with Coomassie brilliant blue dye, using absorbance of 595 nm. Bovine serum albumin (BSA) was used as standard. The standard curve was performed in different concentrations (0, 0,1 e 0,2 mg/mL) to obtain the equation ( $y = 6.9054x - 0.0202$ ;  $R^2 = 0.9981$ ). To determine the reducing sugars present in aqueous extract from leaves of *L. racemosa* an analysis with 3,5 Dinitrosalicylic Acid (DNS) second Miller et al. (1959) and Snehal et al. (2012) with adaptations was performed. Aliquots of 0.5 mL of extract were added to 0.5 mL of DNS. The system was heated to 100 °C for 5 min. After this, 6.5 mL of distilled water were added to samples and were read in spectrophotometer (Hewlett-Packard, model 8453) in 540 nm. Distilled water was used like blank. The sugar concentration was determinate by equation ( $y = 0,4362x - 0,0274$ ;  $R^2 = 0,9901$ ) and glucose (0.02-1.2 g/L) was used as standard.

112 Assays were performed in triplicate.

## 113 2.5 Investigation of total phenolic and flavonoid contents

114 Total phenolic and flavonoid content assays were performed in accordance with Santos et al. (2018).  
 115 Folin-Ciocalteu method was used to measure total phenols content and a calibration curve was prepared by  
 116 plotting the absorbance as a function of the gallic acid concentration (500 to 3.9  $\mu\text{g/mL}$ ) and then finding the  
 117 linear equation ( $y = 0.0048x + 0.0016$ ;  $R^2 = 0.9999$ ). Absorbance was measured at 765 nm. Phenols contents  
 118 are expressed in gallic acid equivalent (mg/g GAE). To determine the total flavonoids, a standard quercetin  
 119 curve (500 to 3.9  $\mu\text{g/mL}$ ) was performed to obtain the equation ( $y = 0.023x + 0.1509$ ;  $R^2 = 0.9956$ ).  
 120 Absorbance was measured at 420 nm. Flavonoid content is expressed as quercetin equivalent (mg/g QE).  
 121 Each investigation was performed in five replicates and absorbances were read using spectrophotometer  
 122 Hewlett Packard, 8453 series.

## 123 2.6 Investigation of tannins and protoantocyanidines contents

125 The total tannins content was obtained according to Seigler et al. (1986) with modifications. Dried  
 126 leaves (250 mg) were dissolved in distilled water (500 mL). The reagents Folin-Denis and sodium carbonate  
 127 8% were added to this mixture (2 mL each), the solution was stirred and incubated for 2 hours. After this  
 128 time, solution was centrifuged and for total tannins quantification a standard curve of tannic acid in different  
 129 concentrations (0.01, 0.02, 0.14 e 0.16 g/mL) was performed to obtain the equation ( $y = 1.301x - 0.0394$ ;  $R^2$   
 130  $=0.9912$ ). The absorbance was measured in 725 nm using spectrophotometer Hewlett Packard, 8453 series.  
 131 Protoantocyanidin investigation was performed according to Sun et al. (1998), with modifications. Aqueous  
 132 extract (0.5 mL) was mixed with vanillin-methanol 4% and chloridic acid (1.5 mL). Blank was prepared with  
 133 vanillinmethanol solution 4% and chloridic acid (1.5 mL). The reading absorbance was 500 nm. A standard  
 134 curve with quercetin (0 - 500  $\mu\text{g/mL}$ ) was performed to obtain the equation ( $Y = 0.023x + 0.1509$ ;  $R^2 = 0.9956$ ).  
 135 Both assays were performed in triplicate.

## 137 2.7 Phytochemical analysis and investigation of the presence of vitamins by High performance liquid 138 chromatography

139 Phytochemical compounds and vitamins investigation was performed with the by HPLC 1200 Infinity  
 140 Series chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The HPLC is equipped with quaternary  
 141 pump, auto sampler, column oven, and diode array detector. Separation was performed on a RP 18 column  
 142 (Zorbax SB-C18, 4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Agilent Technologies). The sample (5  $\mu\text{L}$ ) was subjected to the following  
 143 linear gradient of 0.3% acetic acid in water (A) plus acetonitrile (B) at a flow rate of 2.4 mL/min and 30  $^{\circ}\text{C}$ :



98% A (0 min) - 90% A (10 min) - 15% A (27 min). Analyzes with standard for secondary metabolites and vitamins were also performed. Each assay was performed in two independent assays.

## 2.8 Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS)

Chromatography was performed with an Acquity H-Class (Waters) ultra-performance liquid chromatograph (UPLC). A BEH 2.1 x 100 mm column and a 1.7  $\mu$ m particle size were employed. The mobile phases used consisted of aqueous solution containing 2 % MeOH, 5 mM ammonium formate and 0.1 % formic acid (eluent A) and methanolic solution containing 0.1 % formic acid (eluent B), which were pumped at a flow rate of 0.3 mL/min. Elution was performed in gradient mode and the initial condition (98 % A / 2 % B) was maintained for 0.25 minutes. The B ratio increased linearly to 99 % in 8.5 minutes, remaining at 99 % B for one minute, followed by immediate decrease to 2 % B, where it was maintained for up to 11 minutes. Ten microliters of sample were injected. The column temperature was maintained at 40 °C and the auto injector at 10 °C. The UPLC system was coupled to a single quadrupole mass spectrometer SQ Detector 2 (Waters). The capillary voltage was 3.5 Kv, the voltage of the 30 V cone, the desolvation temperature was 450 °C, with gas flow from the source of 650 L/hr. The data acquisition was done in fullscan mode, searching for masses between 100 and 1000 Da, in negative ionization. Chromatograms and mass spectra were acquired through MassLynx™ software (Waters). The eluted compounds were identified based on their retention time and accurate masses, compared with corresponding standard compounds (sinapic acid, quinic acid, gentisic acid, rutin, quercetin, 3-Oglucoside caffeic acid, coniferaldehyde, kaempferol-rutinoside, salicylic and curcumin) and reference.

## 2.9 Antioxidant investigation

### 2.9.1 TAA, DPPH and ABTS assays

Investigation on antioxidant activity were performed according to Cruz-Filho et al. (2018). Total antioxidant activity (TAA), DPPH free radical sequestration and ABTS radical cation elimination activity were chosen to measure the antioxidant activity. For all assays ascorbic acid was used as standard molecule and it was considered with 100% activity. TAA was measured through reaction between aqueous extract and phosphomolybdenum solution (600 mM sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The absorbance was measured in 695 nm and values were calculated by the formula  $TAA (\%) = [(Sa - Ca)/(Aaa - Ca)] \times 100$ , where: Ca = Control absorbance, Sa = Sample absorbance and Aaa = Ascorbic acid absorbance. A calibration curve of ascorbic acid (500 to 3.9  $\mu$ g/mL) was performed to obtain the equation ( $y = 0.019x + 0.0723$ ;  $R^2 = 0.9937$ ). Free radical sequestration was performed through DPPH radical.

DPPH solution was mixed with aqueous extracts in different concentrations (500 to 3.9  $\mu\text{g/mL}$ ) to find the  $\text{IC}_{50}$  of extract. After 25 min of incubation, the absorbance was read at 517 nm and values obtained were inserted in the formula:  $\text{DPPH (\%)} = [(S_a - C_a)/C_a] \times 100$ . Where:  $S_a$  = Sample absorbance and  $C_a$  = Control absorbance. The concentration of the sample required to inhibit 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) of DPPH was calculated by calibration curve prepared by plotting the absorbance as a function of DPPH concentration (500 to 3.9  $\mu\text{g/mL}$ ) and then finding the linear equation ( $y = 0.00007x + 0.0106$ ;  $R^2 = 0.9964$ ). The  $y$  value was substituted by 50 to obtain  $\text{IC}_{50}$ . ABTS radical cation elimination activity was performed through mixing stock solution of ABTS (ABTS 7mM, ethanol and potassium persulfate solution 140mM) and different concentrations of aqueous extracts (500 to 3.9  $\mu\text{g/mL}$ ). The absorbance was measured in 734 nm and percentage of inhibition was calculated by the formula  $\text{ABTS (\%)} = [(A_c - A_s)/(A_c)] \times 100$ .  $A_c$  = Absorbance of the ABTS solution without sample,  $A_s$  = Sample Absorbance. All assays were performed in five replicates. The equipment used in reads was the spectrophotometer Hewlett Packard, 8453 series.

### 2.9.2 Nitric oxide radical scavenging assay

The nitric oxide radical scavenging assay was performed according to Barapatre et al. (2016) with modifications. Aqueous extract (1 mg/mL) and sodium nitrite reagent (1mM) were mixed in phosphate buffer saline (20 mM, pH 7.4) and incubated for 2 hours in room temperature ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). After incubation, 1.5 mL of Griess reagent (containing 1% sulphanilamide, 0.1% N-1naphtyl-ethylenodiamine and 5%  $\text{H}_3\text{PO}_3$ ) was added to samples. The absorbance was 570 nm and represented as the  $\text{IC}_{50}$  concentration of extract. Ascorbic acid was used as a standard. This assay was performed in triplicate and read in spectrophotometer Hewlett Packard, 8453 series.

### 2.9.3 Lipid peroxidation assay

The lipid peroxidation promoted by aqueous extract was determined using the ferric thiocyanate method described by Shigh (2001). The emulsion of linoleic acid was prepared by homogenizing 35.1mg of linoleic acid and 50mL of ethanol. Aliquots of the extract, with a concentration of 1mg/mL, were individually mixed with 2.5 mL of the linoleic acid emulsion and 2.5 M phosphate buffer (pH 7.0), packed in glass vials with a screw cap, and incubated in circulation oven at  $50^\circ\text{C}$ . Every 24 hours of assay, 50 $\mu\text{L}$  of this solution was withdrawn and added to 50  $\mu\text{L}$  of 75% (v/v) ethanol, 50 $\mu\text{L}$  of 30% ammonium thiocyanate and 50 $\mu\text{L}$  of chloride solution of 0.02 M iron in 3.5% HCl. After 3 minutes at room temperature, the absorbance at 500 nm was measured in ELISA microplate reader (Polaris Ceter $\square$ ). The degree of inhibition of linoleic acid peroxidation was calculated using the algebraic expression:  $\% \text{ inhibition} = (\text{final mean absorbance of control} - \text{final mean absorbance of the sample}) / \text{final mean absorbance of control} \times 100$ . Assays were performed in triplicate.

## 209 2.10 Antimicrobial assays

### 210 2.10.1 Plate-hole diffusion assay

211 The plate-hole diffusion assay described by Shan, Cai, Brooks and Corke, (2007), with changes, was  
 212 used to determine the growth inhibition of bacteria by aqueous extract of *L. racemosa* leaves. Strains were  
 213 cultivated in plate at 37 °C. After 24 hours, a plate-hole diffusion assay was performed using microorganism  
 214 strains test obtained from the Microorganism Culture Collection of Antibiotics Department of Universidade  
 215 Federal de Pernambuco (UFPEDA). Species included for testing were: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*  
 216 *faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*. Nutrient  
 217 medium (7 mL) was added to the petri dishes, after refining, 25 mL of Mueller Hinton agar medium containing  
 218  $10^6$  cells of strains were added. Four 6 mm diameter holes were formed with the aid of a mold forming the  
 219 wells. Wells were filled with 20  $\mu$ L of extract to be tested.

220

### 221 2.10.2 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration 222 (MBC)

223 Antimicrobial activity was determined by microdilution in plates of 96 wells, according to the  
 224 methods prescribed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (2017). Mueller Hinton broth was  
 225 distributed in wells and extract was added at concentrations ranging from 1,600 to 6.25  $\mu$ g/mL. Then, 10  
 226  $\mu$ L of standardized microbial inoculum, containing  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL of *Staphylococcus aureus*,  
 227 *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*  
 228 *enteritidis*, was added. Microplates were cultured at 37 °C for 24h. Microplates were then stained with 0.01  
 229 % resazurin and incubated from 1 to 4 hours to observe color changes. The minimum bactericidal  
 230 concentration was determined by establishing subculture wells on Petri dishes containing the Mueller Hinton  
 231 agar and incubating at 37 °C for 24 h.

232

## 233 2.11 Immunomodulatory analysis in Balb/c mice splenocytes

### 234 2.11.1 Animals, ethical considerations and splenocytes obtainment for cultures

235 Female BALB/c mice (6–8 weeks old; 5 animals) were raised and maintained at the animal facilities  
 236 of the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami - LIKA located in Universidade Federal de Pernambuco,  
 237 Brazil. Mice were kept under standard laboratory conditions (20–22°C and 12 h day and night cycle) with free  
 238 access to standard diet (Labina/Purina, Campinas, Brazil) and water. All experimental procedures were  
 239 performed according to the Ethics Committee of Animal

240 Use of the Universidade Federal de Pernambuco (protocol number: 0048/2016). Mice were  
 241 anesthetized with 2% xylazine (10 mg/kg) and 10% ketamine hydrochloride (115 mg/kg), followed by cervical

242 dislocation, and the spleens were removed aseptically and placed in a conical centrifuge tube containing  
 243 RPMI 1640 medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) with fetal calf serum. The spleens were obtained  
 244 through separation in Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) with density adjusted to  
 245 1.077 g/mL second Cruz-Filho et al. (2018). Cell viability was determined by the trypan blue exclusion method  
 246 and were used only when viability was 98%.

247

#### 248 2.11.2 Cytotoxic investigation on mice splenocytes

249 Cells ( $10^6$ /well) were incubated in plates of 24 wells for 24 hours with different concentrations (50 to  
 250 3  $\mu$ g/mL) of aqueous extract of *L. racemosa* leaves. The analysis of cell viability was performed using Annexin-  
 251 V-FITC and Propidium iodide-PE fluorescent dyes to cytometry. The assay was performed according to Melo  
 252 et al. (2011). Flow cytometry was performed in 10,000 events, in triplicate and in a FACS Calibur (Becton  
 253 Dickinson Biosciences) and analyzed using Cell Quest Pro software (Becton Dickinson). Result of the analysis  
 254 was performed in graphs by dot plot. Annexin-FITC negative/PI positive cells were considered necrotic cells  
 255 and Annexin-FITC positive/PI negative represented splenocytes in the early stage of apoptosis.

256 Double negatives were considered viable cells.

257

#### 258 2.11.3 Proliferative investigation on mice splenocytes

259 After splenocytes obtainment, cell solution was centrifuged at 300  $\times$ g at room temperature for 5 min  
 260 with sterile PBS 1X added with SFB 5% (pH 7.2). The cell solution was adjusted to  $10^7$  cells/mL and received 5  
 261 mM of 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE). Cells were incubated for 10 min at room  
 262 temperature in the dark. Cells were centrifuged twice at 300  $\times$ g for 5 min with sterile PBS 1X. Cells stained  
 263 were cultured for 24 hours with 6 and 3  $\mu$ g/mL of aqueous extract of *L. racemosa* leaves or only in culture  
 264 medium (sample used as negative control). After culture time, cells were centrifuged (300  $\times$  g/5 min) carried  
 265 to acquisition on FACS Calibur platform (Becton Dickinson Biosciences) in 10,000 events and results were  
 266 analyzed using Cell Quest Pro software (Becton Dickinson).

267

#### 268 2.11.4 Investigation of immunomodulation on mice splenocytes

269 The immunomodulatory effect was evaluated through Th1/Th2/Th17 cytokines production and nitric  
 270 oxide release. Cells were incubated for 24 hours with 6 and 3  $\mu$ g/mL of aqueous extract and centrifuged (1800  
 271 rpm / 10 minutes) to collect supernatants. The supernatants were used to measure the cytokines production  
 272 by flow cytometry and nitric oxide release by spectrophotometer. Cytokines were measured by cytometric

beads assay (CBA - Becton Dickinson) in 1800 events in FACS Calibur platform (Becton Dickinson Biosciences) according to fabricant instructions. Nitric oxide was measured through nitrite analysis by the colorimetric Griess method (Ding et al., 1988) using a standard curve (3.12–400.0  $\mu\text{mol/mL}$ ) and a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan GoW/Curvette, Waltham) at 595 nm.

### 3. Results

Phytochemical investigation on *Laguncularia racemosa* leaves showed a high content of ions, especially K, Ca, Zn, Mn and Fe (Table 1).

The phytochemical profile of aqueous extract of *L. racemosa* leaves showed the presence of proteins, carbohydrates and a high prevalence of phenolic compounds (Table 2). The results were confirmed by HPLC chromatogram analysis identifying two phenolic compounds, rutin and ellagic acid (Table 3 and Figure 1). Rutin corresponds to 0.91% of extract, with retention time of 21:49 min and absorption spectrum similar to the standard analyzed with  $\lambda_{\text{max}} = 256; 356 \text{ nm}$ . Ellagic acid corresponds to 8.15% of *L. racemosa* extract, identified in the retention time of 22:45 m, exhibiting a maximum absorption in the range of 254 to 368 nm, similar to the spectrum of the standard to which it was compared (Figure 2). UPLC-MS analyse identified 11 compounds, 8 of them by interpreting mass spectra and using previously reported in scientific literature and database. The identity of the rest 3 compounds was confirmed by comparing their retention times with available standards and fitting the measured accurate masses with formulas available in different databases (Table 4). Representative chromatogram in Figure 3). Furthermore, HPLC chromatogram analysis also showed the presence of three vitamins B1, B3 and B6 (Figure 4).

Studies about antioxidant action promoted by aqueous extract showed high potential induced by extract. Results, showed in Table 5, indicates special antioxidant action associated by elimination of ABTS radical cation ( $\text{IC}_{50} = 59.60 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ ).

Biological tests using aqueous extract of *L. racemosa* was divided into two targets, microbiological action and safety use against animal cells. Moreover, the possible immunological stimulus *in vitro* was also performed on these cell cultures. Inhibition wells above 10 mm promoted by aqueous extract of *L. racemosa* leaves showed activity against tested strains (Table 6). However, the results associated with  $\text{MIC}_{50}$  and MBC showed weak antibacterial action (Table 6).

The cytotoxicity against animal cells was performed using Balb/c mice splenocytes with the technique of separation through Ficoll gradient. In this technique, only lymphocytes and monocytes present in spleens of mice are recovered and cultivated in plates. The goal of this assay was to evaluate if the aqueous extract is toxic against animal cells and if this compound is able to promote immunostimulation *in vitro*. Results

showed that the aqueous extract of *L. racemosa* leaves could be used only under 6 µg/mL (Figure 5). Above this concentration, the extract promotes apoptosis in splenocytes.

After cytotoxicity evaluation, all immunomodulatory assays were performed only in two concentration, 6 and 3 µg/mL. A proliferative assay was performed to evaluate if aqueous extract was able to induce clonal expansion in lymphocytes. This behavior naturally occurs in an organism and this assay is very important to confirm if immune cells are active after an exogenous stimulus.

Results showed that aqueous extract induced proliferative status in splenocytes in 6 µg/mL (Figure 6).

The immunomodulatory profile was performed with supernatant cultures obtained from stimulated cultures, for 24 hours, with 6 and 3 µg/mL of aqueous extract. Cytokines profile obtained was associated with lower proinflammatory status (due to a decrease of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6, see Figure 7 and 8) and possible anti-inflammatory effect (associated with high IL-4 production, see Figure 7). Moreover, lower IFN- $\gamma$  production can be associated with lower nitric oxide production observed in our results (Figure 8).

#### 4. Discussion

Studies on biological properties promoted by *L. racemosa* are not commonly found in literature. Furthermore, up to now studies evaluating the biomedical potential from that plant have been not found but only with isolated metabolites. Our study aimed to reach different targets to respond the use of *L. racemosa* in folk medicine. The leaves were evaluated in their physiological and nutritional contents. We investigated the antioxidant activity and the safe use for animal cells associating with immunological stimulation.

In our results, high concentrations of sugars, protein and ions were found and the presence of some B-complex vitamins. According to Bourre (2006), the human physiology, especially brain, requires essential nutrients found in diet, like vitamins, ions (Ca, K, Mg, Na, Zn), fatty acids and essential amino acids. Moreover, the Dietary Reference Intakes (DRI), used in this study to evaluate the perceptual of nutrients in *L. racemosa*, shows the great necessity of the daily intake of those compounds (Padovani et al., 2006).

B-complex vitamins acts in essential processes, as production of energy, maintenance of temperature, synthesis of fat and protein metabolism in human organism (Spinas et al., 2015). Moreover, researchers have shown the importance of those vitamins for the nervous and immune systems functions. The high dose of B1 Vitamin stimulates the angiogenesis by inducing proliferation of human endothelial progenitor cells and inhibiting apoptosis (Saghiri et al., 2017). B3 Vitamin also stimulates the angiogenesis in human endothelial cells and may play an important role in increasing absolute neutrophil count in healthy rat (Saghiri et al., 2017; Yang et al., 2014). B6 Vitamin act in different manners stimulating the immune system. Its absence in diet can promotes reduction in lymphocyte proliferation, alter the cytokine profile,

337 decreased the number and mitogen response of blood lymphocytes, as T-helper cells (Spinass et al., 2015;  
338 Ueland et al., 2017).

339 Antioxidant foods are also recommended in Dietary Reference Intakes because their properties  
340 reduce the adverse effects promoted by reactive oxygen and nitrogen species. The recommendation is the  
341 consumption of 2000 mg per day of Vitamin C, for example (Amaya-Farfan et al., 2001). The aqueous extract  
342 of *L. racemosa* leaves showed high antioxidant activity in all performed assays. Those results were higher  
343 than other studies using different mangrove plants. Recent publication from our group with three organic  
344 fractions obtained from leaves of *Conocarpus erectus* (also Combretaceae) showed values of 2.55%, 10.89%  
345 and 9.17% of TAA for hexanic, ethyl acetate and ethanolic fractions, respectively (Santos et al., 2018). In the  
346 present study we obtained 26.84% of total antioxidant activity with aqueous extract of *L. racemosa*. Similar  
347 to our results, the high activity of DPPH free radical sequestration was found in other mangrove species as  
348 *R. mangle* and *K. candel* that exhibited  $IC_{50}$  of 89.831 and 93.51  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Zhang et al., 2010).  
349 Moreover, different organic fractions obtained from *Avicennia marina*, at 800 $\mu\text{g/mL}$  of concentration  
350 showed a rate of 93.24% to 54.80% of scavenging activity on ABTS (Lincy et al., 2013).

351 These antioxidant properties can be associated with a high presence of phenolic compounds,  
352 especially ellagic acid and rutin, identified in the aqueous extract. Ellagic acid participates in antioxidant redox  
353 reactions and is present in many plants (Ríos et al., 2018). Some studies associated the ellagic acid with  
354 ascorbic acid in relation to its antioxidant property (Ratnam et al., 2006). Furthermore, ellagic acid has been  
355 reported to be effective in inhibiting lipid peroxidation and can exert potent anti-inflammatory activities  
356 (Priyadarsini et al., 2002; Mishra and Vinayak, 2014; Ríos et al., 2018). Rutin is a flavonol glycoside also present  
357 in various vegetables with many pharmacological actions, antioxidant and antitumor, proven by scientific  
358 reports (Deschner et al., 1991; Ahmed et al., 2010; Alam et al., 2017).

359 Antimicrobial assays showed small activities against investigated strains. According to Estevam et al.  
360 (2009) extracts of plants that form zones of inhibition  $\geq 10$  mm are considered active. Moreover, Vieitez et  
361 al. (2018) and Santos et al. (2018) affirm that extracts of plants can be classified, in accordance with MIC, as  
362 strong inhibitors ( $MIC_{50} \leq 0.5$  mg/mL), moderate inhibitors ( $MIC_{50}$  between 0.6 and 1.6 mg/mL) or weak  
363 inhibitors ( $MIC_{50} > 1.6$  mg/mL). Correlating these informations with our results, the antimicrobial action  
364 promoted by aqueous extract from leaves of *L. racemosa* was active but weak.

365 Similar to the action mechanism induced by ellagic acid, immunological assays performed in this study  
366 showed the trend of the anti-inflammatory profile. After investigation of *in vitro* safety dose, Balb/c  
367 splenocytes were stimulated, in low concentrations of aqueous extract, to proliferate and to produce high  
368 amounts of IL-4 and few amounts of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-6. These latest cytokines are related with  
369 proinflammatory status in immunological response and IL-4 is required for the development of airway  
370 inflammatory response in asthma (Ray and Cohn, 1999). Maybe, besides secondary metabolites found, the

immunological stimulus is also related to the presence of B-complex vitamins previous discussed in this section. Similar investigation was proposal by Santos et al. (2018b) investigating the immunostimulatory profile promoted by aqueous extract from leaves of *Conocarpus erectus* (also from Combretaceae family). However, different to our findings, these authors indicated the pro-inflammatory profile of extract with production of the IL2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  cytokines, nitric oxide release and lymphocyte T CD8 activation. *Terminalia arjuna* (Combretaceae) also showed immunomodulatory effect when used as adjuvant therapy in coronary artery disease (Kapoor et al., 2015). Similar to our results, leaf extract from *Withania somnifera* decreased the production of the TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL6 as well as ROS via downregulation of NF $\kappa$ B in inflamed primary microglial cells (Gupta and Kaur, 2016) and Ginseng–*Panax quinquefolius* induced neuroprotective mechanism may be mediated by the downregulation of nitric oxide, superoxide, and TNF- $\alpha$  expression (Ke et al., 2014).

## 5. Conclusion

*L. racemosa* showed a high presence of essential nutrients, significant antioxidant activity and immunological stimulation inducing an anti-inflammatory profile. These findings are associated with neuroprotective action, cicatricial development, asthma and against inflammatory diseases, confirming some rational uses in folk medicine. This study may contributes to future investigations in the evaluation of the nutritional and biomedical potentials of mangrove plants.

**Declarations of interest:** none

## Acknowledgments

The authors thank the Nucleus of Technological Platforms (NPT-1) located at Aggeu Magalhães Institute (IAM) for the access to the flow cytometer and to the Semiarid National Institute located at Paraíba (Brazil) in relation to the phytochemical analysis performed.

## References

Ahmed, O. M., Moneim, A. A., Yazid, I. A. & Mahmoud, A. M. (2010). Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects and the probable mechanisms of action of *Ruta graveolens* infusion and rutin in nicotinamide- Streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia Croatica*, 39, 15–35.



- 401 Alam, P., Mohamed, F., Ahmed, H. A., Mohammad, K. P., Nasir, A. S., Saleh,, I. A., Adnan J. A. M. S. A. & Omer  
 402 A. B. (2017). Comparative study of antioxidant activity and validated RP-HPTLC analysis of rutin in the leaves  
 403 of different Acacia species grown in Saudi Arabia. *Saudi*  
 404 *Pharmaceutical Journal*, 25, 715-723. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.10.010>.
- 405 Al-Harthi, M. A., El-Deek, A. A., Attia, Y. A., Bovera, F. & Qota, E. M. (2009). Effect of different dietary levels  
 406 of mangrove (*Laguncularia racemosa*) leaves and spice supplementation on productive performance, egg  
 407 quality, lipid metabolism and metabolic profiles in laying hens. *British Poultry Science*, 50, 700-8.  
 408 <https://doi.org/10.1080/00071660903202948>.
- 409 Amaya-Farfan, J., Álvares, S. M. & Padovani, R. M. (2001). Recommendations for dietary antioxidants. *Revista*  
 410 *Nutrição*, 14(1): 71-78.
- 411 Arrivabene, H.P., Souza, I., Có, W. L. O., Rodella, R.A., Wunderlin, D.A. & Milanez, C. R. (2014). Functional  
 412 traits of selected mangrove species in Brazil as biological indicators of different  
 413 environmental conditions. *Science of the Total Environment*, 476–477.  
 414 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.032>.
- 415 Barapatre, A. S., Meena, S., Mekala, A. & Das, H. (2016). In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic  
 416 activities of lignin fractions extracted from Acacia nilotica. *International Journal of Biological*  
 417 *Macromolecules*, 86, 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.109>.
- 418 Bourre, J. M. (2006). Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update  
 419 on dietary requirements. *The Journal of nutrition, health & aging*©, 10, 377-385.
- 420 Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein  
 421 utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.  
 422 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- 423 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Standard No. CLSI - M100-S27. Performance standards for  
 424 antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. 2017. [Online]. Available from: [http://www.facm.ucl.ac.be/](http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2017-M100-S27pdf)  
 425 [intranet/CLSI/CLSI-2017-M100-S27pdf](http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2017-M100-S27pdf). [Accessed 12 May 2018].
- 426 Cruz Filho, I. J., Barros, B. R. S., Aguiar, L. M. S., Navarro, C. D. C., Ruas, J. S., Lorena, V. M. B.,  
 427 Rocha, G. J. M., Vercesi, A. E., Melo, C. M. L. & Maior, A. M. S. (2018). Lignins isolated from Prickly pear  
 428 cladodes of the species *Opuntia ficusindica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller  
 429 induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production. *International*  
 430 *Journal of Biological Macromolecules*.

- 431 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.120>.
- 432 Deschner, E. E., Ruperto, J. & Wong, G. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced  
 433 colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, *12*, 1193–1196.  
 434 <https://doi.org/10.1093/carcin/12.7.1193>.
- 435 Ding, A.H., Nathan, C.F. & Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen  
 436 intermediates from mouse peritoneal macrophages, comparison of activating cytokines and evidence for  
 437 independent production. *Journal of Immunology*, *141*, 2407–2412.
- 438 Estevam, C. S., Cavalcanti, A. M., Cambui, E. V. F., Neto, V. A., Leopoldo, P. T. G., Araujo, B. S., Porfírio, Z. &  
 439 SantAna A.E.G. (2009). Phytochemistry and microbiological assay of the bark extracts of *Maytenus rigida*  
 440 Mart. (Celastraceae). *Revista Brasileira Farmacognosia*, *19*, 299–303. [http://dx.doi.org/10.1590/S0102-](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200020)  
 441 [695X2009000200020](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200020).
- 442 Gupta, M. & Kaur, G. (2016). Aqueous extract from the *Withania somnifera* leaves as a potential anti-  
 443 neuroinflammatory agent: a mechanistic study. *Journal Neuroinflammation*, *13*, 193.  
 444 <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0650-3>.
- 445 Jayaprakasha, G. K., Singh, R.P. & Sakariah. K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*)  
 446 extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, *49*, 5489-5493. [https://doi.org/10.1016/S0308-](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00298-3)  
 447 [8146\(00\)00298-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00298-3).
- 448 Kapoor, D., Trikha, D., Vijayvergiya, R., Kaul, D. & Dhawan, V. (2015). Short-term adjuvant therapy with  
 449 *Terminalia arjuna* attenuates ongoing inflammation and immune imbalance in patients with stable coronary  
 450 artery disease: in vitro and in vivo evidence. *Journal Cardiovascular Translational Research*, *8*, 1173–1186.  
 451 <https://doi.org/10.1007/s12265-015-9620-x>.
- 452 Ke, L. N., Guo, W., Xu, J. W., Zhang, G. D., Wang, W. & Huang, W. H. (2014). Ginsenoside Rb1 attenuates  
 453 activated microglia induced neuronal damage. *Neural Regeneration Research*, *9*, 252–  
 454 259. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.128217>.
- 455 Liang-Liang, Z., Yi-Ming, L., Hai-Chao, Z., Shu-Dong, W., Jia-Hong, C. (2010). Condensed Tannins from  
 456 Mangrove Species *Kandelia candel* and *Rhizophora mangle* and Their Antioxidant Activity. *Molecules*, *15*,  
 457 420-431. <https://doi.org/10.3390/molecules15010420>.
- 458 Lincy, M. P. & K Paulpriya, V. R. (2013). In vitro antioxidant activity of *Avicennia marina* (Forssk) Vierh  
 459 *pneumatophore* (Avicenniaceae). *Science Research Reporter*, *3*, 106-114.
- 460 De Melo, C.M., Melo, H., Correia, M. T., Coelho, L. C., da Silva, M. B. & Pereira, V.R. (2011). Mitogenic response  
 461 and cytokine production induced by Cramoll 1, 4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Journal of*  
 462 *Immunology*, *73*, 112–121. <https://doi.org/10.1111/j.13653083.2010.02490.x>.

- 463 Mendes, R. J. A., Filho, A. A. P. A., Nogueira, A. J. L., K. R. F. Araújo, C. R. C. França, N. M. L. & Silva R. I.G.  
 464 (2018). Evaluation of molluscicidal activity of three mangrove species (*Avicennia schaueriana*, *Laguncularia*  
 465 *racemosa* and *Rhizophora mangle*) and their effects on the bioactivity of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818.  
 466 *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 60.  
 467 <https://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201860007>.
- 468 Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar.  
 469 *Analytical Chemistry*, 31, 426-428. Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for  
 470 Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.  
 471 <https://doi.gov/10.1021/ac60147a030>.
- 472 Mishra, S. & Vinayak, M. (2014). Ellagic acid inhibits PKC signaling by improving antioxidant defense system  
 473 in murine T cell lymphoma. *Molecular Biology Reports* 41, 4187–4197. Mishra, S., & Vinayak, M. (2014).  
 474 Ellagic acid inhibits PKC signaling by improving antioxidant defense system in murine T cell lymphoma.  
 475 *Molecular Biology Reports*, 41(7), 4187–4197.  
 476 <https://doi.gov/10.1007/s11033-014-3289-0>.
- 477 Nagelkerken, I., Blaber, S. J. M., Bouillon, S., Green, P., Haywood, M., Kirton, L. G., Meynecke, J.  
 478 O., Pawlik, J., Penrose, H. M. & Sasekumar, A. P. J (2008). The habitat function of mangroves for terrestrial  
 479 and marine fauna: a review. *Aquatic Botany*, 89, 155–185.  
 480 <https://doi.gov/10.1016/j.aquabot.2007.12.007>.
- 481 Padovan, R. M., Amaya-Farfán, J., Colugna, F. A. B. & Domene, S. M.A (2006).  
 482 Dietary reference intakes: application of tables in nutritional studies. *Revista de Nutrição*, 19, 741760.  
 483 <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732006000600010>.
- 484 Pan, K. & Wang, W-X. (2012) Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in  
 485 China. *Science of the Total Environment*, 16, 421–422.  
 486 <https://doi.gov/10.1016/j.scitotenv.2011.03.013>.

- 487 Priyadarsini, K. I., Khopde, S. M., Kumar, S. S. & Mohan, H. (2002). Free radical studies of ellagic acid, a natural  
488 phenolic antioxidant. *Journal Agricola Food Chemistry*, 50, 2200–2206. <https://doi.gov/10.1021/jf011275g>.
- 489 Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana D. K. & Kumar, M. N. (2006). Role of antioxidants in  
490 prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal Controle Release*, 113, 189–207.  
491 <https://doi.gov/10.1016/j.jconrel.2006.04.015>.
- 492 Ray, A. & Cohn, L. 1999. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of  
493 airway inflammation. *Journal Clinical Investigation*, 104, 985-993.  
494 <https://doi.gov/10.1172/jci8204>.
- 495 Ríos, J. L., Giner, R. M., Marín M. & Recio, M. C. (2018). A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta*  
496 *Medica*, 84, 1068–1093. <https://doi.gov/10.1055/a-0633-9492>.
- 497 Saghiri, M. A., Ershadifar, A. A. S., Moghadam M. M. & Sheibani, N. (2017). Vitamins and regulation of  
498 angiogenesis: [A, B1, B2, B3, B6, B9, B12, C, D, E, K]. *Journal of Fuctional Foods*,  
499 v.38, 180-196. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.005>.
- 500 Santos, D. K. D. N., Almeida, V. S., Araujo, D. R. C., Harand, W., Soares, A.K.A., Lorena, V. M. B., Moreira, L.  
501 R., Magalhaes, L. P. M., Ximenes, R. M., Sena, K. X. F. R., Melo, C. M. L., Napoleao, T. H., Lima, C. S. A., Yara,  
502 R. & Vieira, J. R. C. V. (2018). Evaluation of cytotoxic, immunomodulatory and antibacterial activities of  
503 aqueous extract from leaves of *Conocarpus erectus Linnaeus* (Combretaceae). *Journal of Pharmacy and*  
504 *Pharmacology*, 70(8), 1092–1101.  
505 <https://doi.gov/10.1111/jphp.12930>.
- 506 Santos, D. K. D. N., Melo, W. H. O., Lima, A. M. N. O., Cruz Filho, I. J., Lima, G. M. S., Silva, T.  
507 D., Moura, M. C., Nascimento, M. S., Maior, A. M. S., Napoleão, T. H. & Melo, C. M. L.(2018). *Conocarpus*  
508 *erectus* L., a plant with a high content of structural sugars, ions and phenolic compounds, shows antioxidant  
509 and antimicrobial properties promoted by different organic fractions. *Asian Pacific Journal of Tropical*  
510 *Biomedicine*, 8, 463-470. <https://doi.gov/10.4103/22211691.242292>.
- 511 Sebastianes, F. L. S., Cabedo, N., Aouad, N. E., Angela, M. M. P., Lacava, P. T., Azevedo, J. &  
512 Cortes, D. (2012). 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial Agent from Endophytic Fungi *Diaporthe*  
513 *phaseolorum*. *Current Microbiology* 65, 622–632. <https://doi.gov/10.1007/s00284-0120206-4>.

- Sebastianes, F. L. S., Lacava, P. T., Rodrigues, M. B. C., Araujo, W. L., Azevede, J. L. & Pizzirani Kleiner A. A. (2012). Genetic transformation of *Diaporthe phaseolorum*, an endophytic fungus found in mangrove forests, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Genetics*, 58, 21–33. <https://doi.gov/10.1007/s00294-011-0362-2>.
- Seigler, D. S., Seilheimer, S., Keesy, J. & Huang, H. F. (1986). Tannins from Four Common *Acacia* Species of Texas and Northeastern Mexico. *Journal Science Food Agriculture*, 29, 778 – 794. <https://doi.gov/10.1007/bf02859146>.
- Singh, R. P. & Sakariah. K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 49, -5493. [https://doi.gov/10.1016/s03088146\(00\)00298-3](https://doi.gov/10.1016/s03088146(00)00298-3).
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D. & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal Food Microbiology*, 117, 112-119. <https://doi.gov/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.003>.
- Shi, C., Min-Juan Xu, A., Mirko, B., Zhi-Wei, D., Michael, H. G., Kubbutat, W. W., Peter, P. & Wen-Han, L. (2010). Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*. *Phytochemistry*, 71, 435–442. <https://doi.gov/10.1016/j.phytochem>.
- Snehal, P. A. N. D. E. & Madhukar, K. H. E. T. M. A. L. A. S. (2012). Quantitative estimation of biochemical content of various extracts of *Stevia rebaudiana* leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, 115-117.
- Souza, I., Bonomo, M. M., Morozesk, M., Rocha, L. D., Duarte, I. D., Furlan L. M., Arrivabene, H. P., Monferra, M. V., Matsumoto, S. T., Milanez, C. R. D. & Fernandes M. N. (2014). Adaptive plasticity of *Laguncularia racemosa* in response to different environmental conditions: integrating chemical and biological data by chemometrics. *Ecotoxicology*, 23, 335–348. <https://doi.gov/10.1007/s10646-014-1191-0>.
- Spinas, E., Saggini, A., Kritas, S.K., Cerulli, G., Caraffa, A., Antinolfi, P., Pantalone, A., Frydas, A., Tei, M., Speziali, A., Saggini, R., Pandolfi, F. & Conti, P. (2015). Crosstalk between vitamin b and immunity. *Journal of biological regulators & homeostatic agents*, 29, 283-288.
- Sun, S. S. M. & Hang, C. (1998). Broadening the genetic diversity of vegetable crops through molecular approach. *Acta Horticulturae*, 467, 23. <https://doi.gov/10.17660/ActaHortic.1998.467.2>. Ueland, P. M., McCann, A., Midtum, O. & Ulvik, A. (2017). Inflammation, vitamin B6 and related pathways. *Molecular Aspects of Medicine*, 53, 10 -27. <https://doi.gov/10.1016/j.mam.2016.08.001>. Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I. & Alborés, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *Journal Supercrit Fluids*, 133, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>.

547 Yang, H., Lan, D., Wang, M., Li, X., Gao, Z. & Li, L. (2014). Effect and mechanism of high-dose  
548 Vitamin B3 on granulopoiesis in normal rat. (2014). *Europe PubMed Central*, 35, 931-5.  
549 <https://doi.gov/10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.10.013>.

550

## 551 Figure and Table Captions

552 **Table 1:** Biomass characterization and ion quantification obtained from leaves of *L. racemosa*.

553

554 **Table 2:** Phytochemical profile of primary and secondary compounds present in aqueous extract from leaves  
555 of *L. racemosa*.

556

557 **Table 3:** Phenolic compounds identified in the aqueous extract from leaves of *L. racemosa* by  
558 HPLC-UV.

559

560 **Figure 1:** HPLC Chromatogram of aqueous extract from leaves of *L. racemosa*. Rutin and Ellagic acid were  
561 found in HPLC analysis.

562

563 **Figure 2:** Absorption spectrum of molecules identified in the aqueous extract from leaves of *L.*  
564 *racemosa*.

565

566 **Table 4:** Compounds identified in aqueous extract from leaves of *L. racemosa* by Ultraperformance liquid  
567 chromatography coupled to mass spectrometry.

568

569 **Figure 3:** Chromatogram representative of the UPLC-MS analysis of the aqueous extract from  
570 leaves of *L. racemosa*.

571

572 **Figure 4:** HPLC Chromatogram of aqueous extract from leaves of *L. racemosa*. Vitamins B1, B3 and B6 found  
 573 in HPLC analysis.

574

575 **Table 5:** Antioxidant activity promoted by aqueous extract from leaves of *L. racemosa*.

576

577 **Table 6:** Inhibition wells, Minimum Inhibitory Concentrations (MIC<sub>50</sub>) and Minimal Bactericidal  
 578 Concentrations (MBC) of aqueous extract from leaves of *L. racemosa*.

579

580 **Figure 5:** Citotoxicity investigation against mice splenocytes promoted by aqueous extract from leaves of *L.*  
 581 *racemosa* using annexin V-FITC and propidium iodide-PE staining in flow cytometry. *L. racemosa* induced  
 582 significant apoptosis in 50, 25 and 12.5 µg/mL concentrations in relation to control (cell + medium). Vertical  
 583 bars represent the average of two independent experiments performed in triplicate. #  $P \leq 0.05$ .

584

585 **Figure 6:** Cell proliferation induced by aqueous extract from leaves of *L. racemosa* in mice splenocytes.  
 586 Significant values were observed in 6 µg/mL concentration in relation to control (cell + medium). Vertical bars  
 587 represent the average of two independent experiments performed in  
 588 triplicate. #  $P \leq 0.05$ .

589

590 **Figure 7:** Cytokines produced in splenocytes cultures treated *in vitro* with 6 and 3 µg/mL of the aqueous  
 591 extract from leaves of *L. racemosa*. These cultures were performed in 24 hours of incubation. Control cultures  
 592 was cell + medium. Aqueous extract induced suppression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 cytokines. IL-2 and IL-17  
 593 were not stimulated and IL-4 was produced in higher values in relation to control. Vertical bars represent two  
 594 independent experiments performed in triplicate. #  $P \leq 0.05$ .

595

596 **Figure 8:** Association between IFN- $\gamma$  and nitric oxide production in splenocytes cultures stimulated, for 24  
 597 hours, with aqueous extract from leaves of *L. racemosa*. Control cultures was cell + medium. None  
 598 stimulation was observed to these two parameters. Vertical bars represent two independent experiments  
 599 performed in triplicate.

**\*Declaration of Interest Statement**



## Conflict of Interest disclosure

The all authors declare no conflict of interest.



**Table 1:** Biomass characterization and ion quantification obtained from *L. racemosa* leaves

<i>Laguncularia racemosa</i>	Composition (%)			
Holocelulose	57.65 ± 0.50			
Total Lignin	24.65 ± 4.68			
Extractives	12.35 ± 0.04		DRI (%)	
Total Ashes	5.32 ± 0.10	K	257 ± 56.8	5.4
		Ca	119 ± 25.9	11.9
		Mg (mg/100g)	74.3 ± 7.85	17.7
		P	13.3 ± 9.35	1.9
		Na	8.2 ± 0.75	0.5
		Zn	275 ± 10.1	2.5
		Mn	256 ± 35.1	11.1
		Fe (µg/100g)	104 ± 27.7	1.3
		Cu	78.9 ± 10.8	8.7
		Cr	10.8 ± 3.0	30.8

DRI = Dietary Reference Intakes recommended per day for males (31–50 years).

**Table 2:** Phytochemical profile of primary and secondary compounds present in aqueous extract of *L. racemosa* leaves.

Compounds	Aqueous extract from leaves of <i>L. racemosa</i>	DRI (%)
Total proteins (mg/mL)	0.15 ± 0.02	0.0002
Reducing sugars (g/L)	1.6 ± 0.1	1.2
Phenolic compounds (mg EAG/g)	92.81 ± 3.6	NA
Flavonoids (mg QE/g)	143 ± 0.19	NA
Tannins (g/mL)	3.33 ± 0.008	NA
Protoantocianidins (µg/mL)	62.71 ± 0.05	NA
NA = Not applicable. DRI = Dietary Reference Intakes recommended per day for males (31–50 years)		

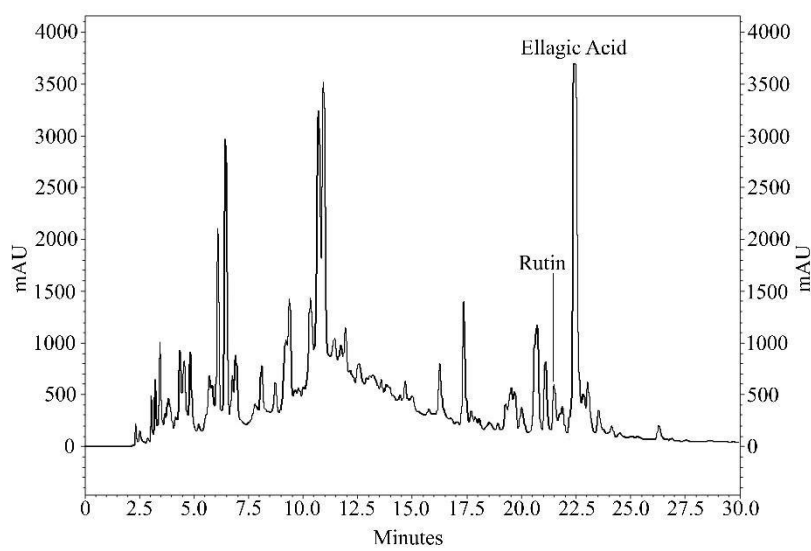
Table 3

**Table 3:** Phenolic compounds identified in the aqueous extract from leaves of *L. racemosa* by HPLC-UV.

Compounds	Retention Time	Area	Area %	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Compound class
Rutin	21.49	861844679	0.91	256; 356	Flavonoid
Ellagic Acid	22.45	7708256717	8.15	254; 368	Phenolic Acid

# Figure 1

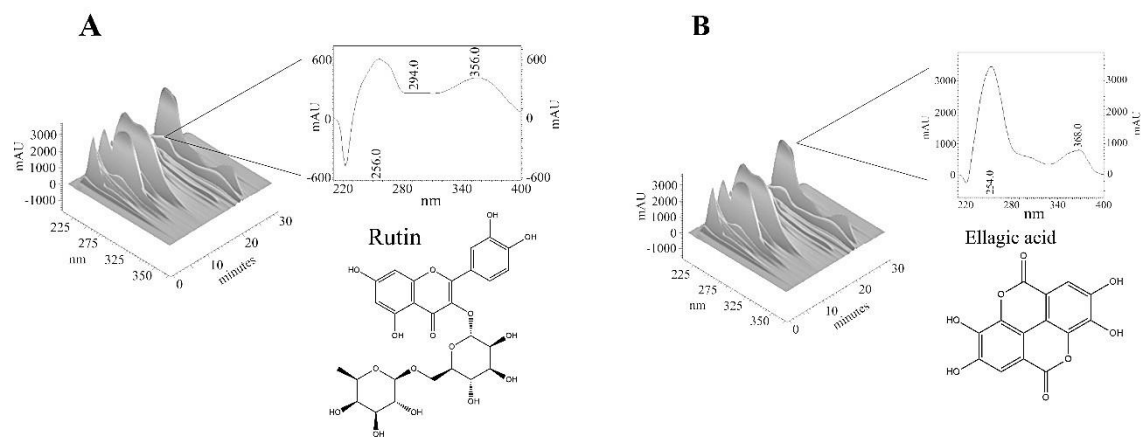
[Click here to download Figure\(s\): Figure 1 Elivania Maria da Silva.docx](#)



**Figure 1:** HPLC Chromatogram of aqueous extract of *L. racemosa* leaves. Rutin and Ellagic acid found in HPLC analysis.

# Figure 2

[Click here to download Figure\(s\): Figure 2 Elivania Maria da Silva.docx](#)



**Figure 2:** Absorption spectrum of molecules identified in the aqueous extract from leaves of *L. racemosa*.

# Table 4

**Table 4:** Compounds identified in aqueous extract of *L. racemosa* by Ultraperformance liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

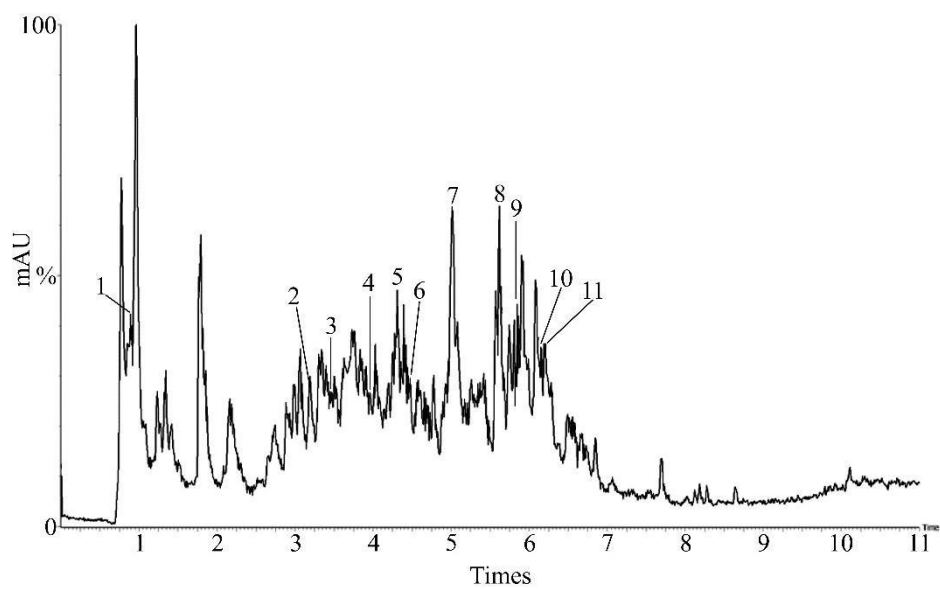
Compound Number	Compound Name	Retention time (min)	Molecular formula	Mass (Da)
1	Caffeic acid <sup>b,c</sup>	0.91	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180.160
2	Gentisic acid <sup>a</sup>	3.16	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154.026
3	Kaempferol	3.43	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.239
4	Catechin <sup>b,c</sup>	3.92	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.271
5	Gallocatechin <sup>b,c</sup>	4.31	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	306.270
6	Ouratea-catechin <sup>b,c</sup>	4.47	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	320.089
7	Rutin <sup>a</sup>	5.20	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610.153
8	Isoquercetin <sup>b,c</sup>	5.62	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464.095
9	Quercetin <sup>a</sup>	5.81	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302.042
10	Miricetine <sup>b,c</sup>	6.16	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	318.037
11	Quercitrin <sup>b,c</sup>	6.21	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448.100

a Confirmed by a standard.  
b Confirmed by a reference.  
c Confirmed by ion mass using chemical database (Chemspider and PubQuem).



## Figure 3

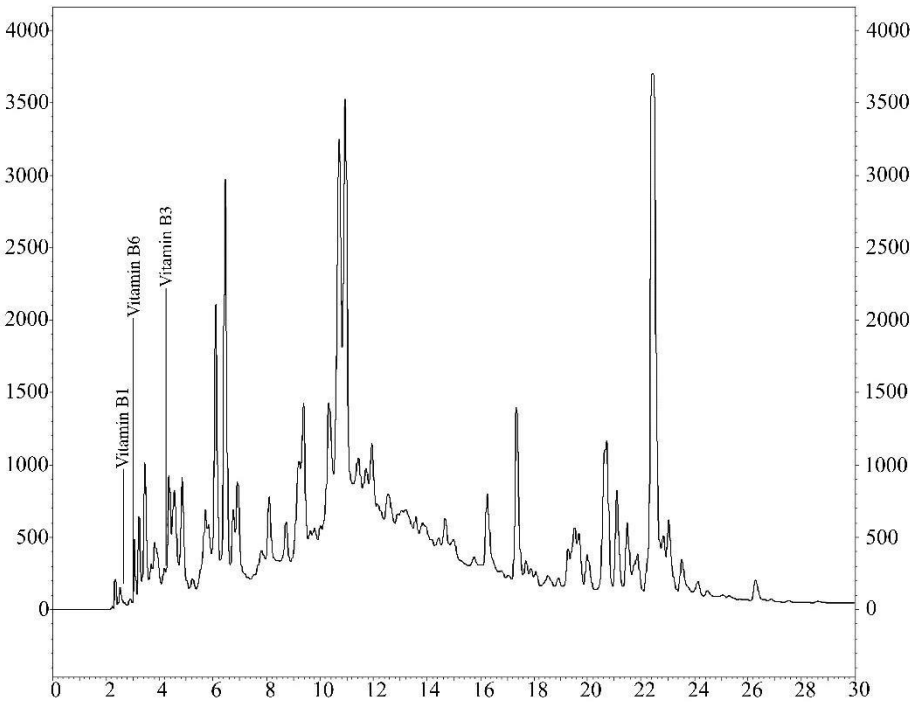
[Click here to download Figure\(s\): Figure 3 Elivania Maria da Silva.docx](#)



**Figure 3:** Chromatogram representative of the UPLC-MS analysis of the aqueous extract of *L. racemosa*.

# Figure 4

[Click here to download Figure\(s\): Figure 4 Elivania Maria da Silva.docx](#)



**Figure 4:** HPLC Chromatogram of aqueous extract of *L. racemosa* leaves. Vitamins B1, B3 and B6 found in HPLC analysis.

# Table 5

**Table 5:** Antioxidant activity promoted by aqueous extract of *L. racemosa* leaves.

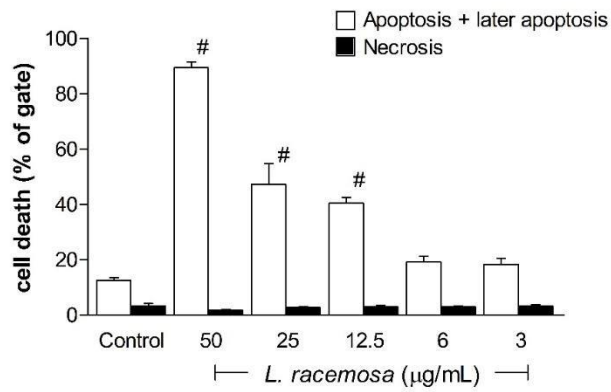
Sample	TAA	DPPH	ABTS	Nitric oxide	lipid peroxidation
	(%)	(IC <sub>50</sub> - µg/mL)	(IC <sub>50</sub> - µg/mL)	(IC <sub>50</sub> - µg/mL)	(%)
<i>L. racemosa</i>	26.84 ± 0.10	96.82	59.60 ± 0.50	61.13 ± 3.9	26,81 ± 0.01
Ascorbic acid	100	19.15	99.9 ± 0.10	ND	71.70 ± 0.01

ND = not detected

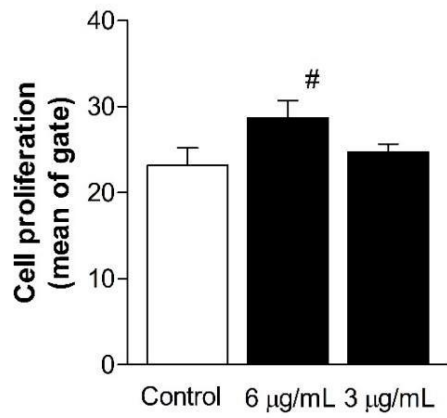
# Table 6

**Table 6:** Inhibition wells, Minimum Inhibitory Concentrations (MIC<sub>50</sub>) and Minimal Bactericidal Concentrations (MBC) of aqueous extract of *L. racemosa* leaves.

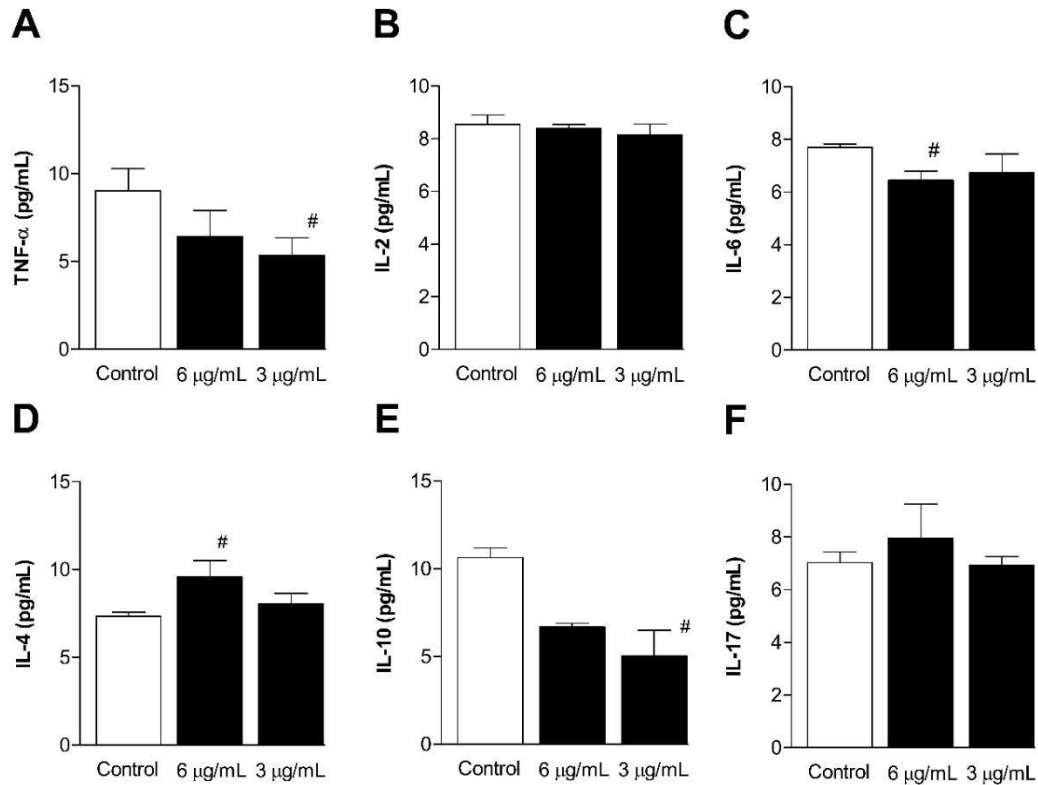
Strains	Inhibition wells (mm)	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MBC (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	19.0 ± 0.00	> 1.6	> 1.6
<i>Enterococcus faecalis</i>	19.0 ± 0.00	> 1.6	> 1.6
<i>Escherichia coli</i>	18.0 ± 4.95	> 1.6	> 1.6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	18.0 ± 0.00	> 1.6	> 1.6
<i>Shigella flexneri</i>	18.0 ± 0.00	> 1.6	> 1.6
<i>Salmonella enteritidis</i>	17.5 ± 2.12	> 1.6	> 1.6



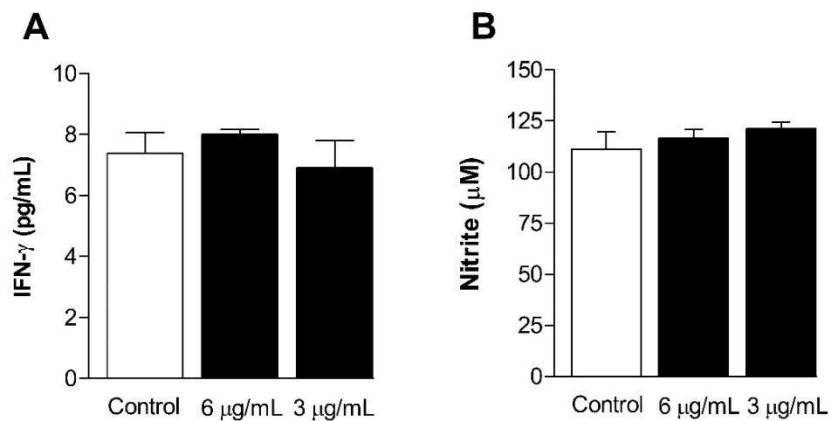
**Figure 5:** Citotoxicity investigation against mice splenocytes promoted by aqueous extract of *L. racemosa* leaves using annexin V-FITC and propidium iodide-PE staining in flow cytometry. *L. racemosa* induced significant apoptosis in 50, 25 and 12.5 µg/mL concentrations in relation to control (cell + medium). Vertical bars represent the average of two independent experiments performed in triplicate. #  $P < 0.05$ .



**Figure 6:** Cell proliferation induced by aqueous extract of *L. racemosa* leaves in mice splenocytes. Significant values were observed in 6 µg/mL concentration in relation to control (cell + medium). Vertical bars represent the average of two independent experiments performed in triplicate. #  $P \leq 0.05$ .



**Figure 7:** Cytokines produced in splenocytes cultures treated *in vitro* with 6 and 3 µg/mL of the aqueous extract of *L. racemosa* leaves. These cultures were performed in 24 hours of incubation. Control cultures were cell + medium. Aqueous extract induced suppression of TNF-α, IL-6 and IL-10 cytokines. IL-2 and IL-17 were not stimulated and IL-4 was produced in higher values in relation to control. Vertical bars represent two independent experiments performed in triplicate. #  $P < 0.05$ .



**Figure 8:** Association between IFN-γ and nitric oxide production in splenocytes cultures stimulated, for 24 hours, with aqueous extract from leaves of *L. racemosa*. Control cultures were cell + medium. No stimulation was observed for these two parameters. Vertical bars represent two independent experiments performed in triplicate.