



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

GUSTAVO DA COSTA LIMA

**SCREENING FITOQUÍMICO, ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO
EXTRATO AQUOSO BRUTO DE PROPÁGULOS DE
Rhizophora mangle L.**

Recife
2020

GUSTAVO DA COSTA LIMA

**SCREENING FITOQUÍMICO, ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO
EXTRATO AQUOSO BRUTO DE PROPÁGULOS DE
Rhizophora mangle L.**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Pinto de Medeiros.

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Morais de Oliveira.

Recife

2020

Catálogo na fonte: Bibliotecária Claudina
Queiroz, CRB4/1752

Lima, Gustavo da Costa

Screening fitoquímico, atividade citotóxica e genotóxica do extrato aquoso bruto de propágulos de *Rhizophora mangle* L. / Gustavo da Costa Lima - 2020.

83 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Juliana Pinto de Medeiros

Coorientador: Antonio Fernando Morais de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em
Morfotecnologia. Recife, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. *Rhizophora mangle* L . 2. Citotoxicidade 3. Genotoxicidade
I. Medeiros, Juliana Pinto de (Orientadora) II. Oliveira, Antonio
Fernando Morais de (Coorientador) III. Título

581.634 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-150

GUSTAVO DA COSTA LIMA

**SCREENING FITOQUÍMICO, ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO
EXTRATO AQUOSO BRUTO DE PROPÁGULOS DE
Rhizophora mangle L.**

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

Aprovada em: 21/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Juliana Pinto de Medeiros (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

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

Prof^a. Dr^a. Raquel Barbosa da Silva (Examinadora Externa)
Secretaria de Educação de Pernambuco

A magnífica existência da minha “mainha”.

AGRADECIMENTOS

Eu, na minha totalidade, na minha vida acadêmica, profissional e pessoal devo muito a educação que recebi da minha mãe, Jaira Maria (*in memoriam*) e meu pai. A minha mãe, na qual, sua partida recente veio a nos surpreender e afetar de forma única sempre nos ensinou através das atitudes que o amor sempre cura todo mal. A garra, sabedoria e carinho dela para com os delas são coisas que me inspiraram e sempre guardarei no meu íntimo. Obrigado, mainha por ser uma grande mãe, esposa e mulher.

Apesar de estarmos em menor número no ambiente familiar, fato que confunde muito o amor, meu pai (George) e minha irmã (Gigi) ainda continuaram me dando todo o suporte imprescindível para que eu pudesse continuar e concluir o mestrado. Sou grato por ter um pai participativo, colaborativo e carinhoso que cumpre com plenitude o significado da palavra “pai”. Além disso, é um grande homem e esposo. É muito importante poder compartilhar um ambiente familiar com pessoas deste calibre.

Quanto a minha irmã e colega de carreira, sou extremamente feliz por todo suporte, conselhos, duras e brigas durante minha vida doméstica e acadêmica. É bem mais fácil trilhar caminhos já percorridos por outros. O carinho que por toda minha vida tenho recebido por ela, as vezes incompreendido, é o sinal de que a semente de amor plantada por nossos pais é frutuosa.

Uma vez, em minha casa, apesar de todos os conflitos comuns nos ambientes domésticos, é visível o afeto gratuito, o cuidado construtivista e a ajuda mútua, fica fácil aprender a se relacionar. Dessa forma, tive felicidade de em todo período do mestrado e antes ter uma parceira, amiga e confidente incrível que tornou o peso das dificuldades universitárias mais leves. Te amo, Kassia Maria.

Apesar de não convivermos diariamente e de uma certa forma não compreender o que faço na faculdade, gostaria de demonstrar meu agradecimento a minha única vó viva, Dona Neitinha. Vovó, muito obrigado pelos abraços, refeições, apoio nos momentos sombrios e companhia ainda firme nesta difícil jornada que é a vida. Meu muito obrigado a senhora, vovó!

Aqui agradeço também os meus avôs e avós já falecidos, em especial Dona Eline (de criação) e Dona Severina na qual não tive a oportunidade de conhecer fisicamente.

Mas metafisicamente sei que sua presença me acompanha e hoje também se junta ao encontro da filha querida na glória divina. Obrigado, vovô José Augusto e Jorge por todo amor doado a mim aos meus pais. Suas histórias, força e sabedoria também compuseram parte do meu caráter.

Ainda falando em relações sanguíneas, desejo mandar um enorme abraço a todos os meus tios e tias, primos e primas, tanto da família Costa como da família Lima. Meu muito obrigado a todos que de uma forma ou de outra fizeram parte da minha educação e ainda hoje me dão palavras sábias e suporte nas complicações diárias da vida.

Um abraço especial também para minha sogra querida responsável por: me dar abrigo por diversas vezes, facilitar bastante minha logística nas correrias profissionais e compartilhar momentos ricos de amizade. Obrigado, Dona Lu. Também a seu adorado pai Severino Clemente (*in memoriam*) e todos e todas da família Clemente. Ao e meu cunhado Danilo. Também ao meu sogro Marcílio e a todos da família Silva que me recebem com muito afeto.

Agradeço a todos os meus colegas e ex-colegas de laboratório do ARRE-Água UFPE (Rafael, Carlos, Tulíbia, Géssica, Nirvana, Ivo, Marília, Brunna, Laura, Marina, Rebeca, Mayara, Nicácio e outros) e do LEAF-UFPE (João Bosco, Rayza, Jael, Edward, Edvaldo, Ítalo, Raquel e outros).

Contribuintes externos para a pesquisa, ex-orientador Rafael, ex-colega de laboratório Lucas, auxiliar na coleta Tota (morador e líder na Resex), Professor Emanuel (DEN-UFPE), Natache Ferrão (colega DEN-UFPE). Aos membros do Labbioprot do Depto de Bioquímica Professor Thiago, Me. Carlos (Bob), Me. Poliana Karla, Dr. Livia Laís e todos seus componentes. Mestrando Marcos do PPGM, por todo o suporte técnico e pessoal nas metodologias de atividade biológica. Professora Ester Ribeiro do Departamento de Antibióticos pelo apoio material. Professora Sônia Leite do Departamento de Histologia e Embriologia pelo suporte técnico e motivacional.

Obrigado também, aos meus alunos que nas minhas aulas também me deram suporte e me aliviaram com seus temperamentos leves.

A todos os meus vizinhos, amigos de igreja em especial Lucinaldo, amigos de academia (Summer), amigos da faculdade, colegas de trabalho.

Obrigado a todos os funcionários da limpeza, recepção e manutenção do CCB e anexo, em especial Tia Neide, Sr. Paulo e Kenedy.

À minha orientadora, professora Juliana, fica aqui meu muito obrigado. Tem momentos na vida em que procuramos saídas e não encontramos, e tem pessoas responsáveis por desatar esses nós diários. Obrigado, professora, me ajudar e escutar em momentos tão complicados e sendo uma plena ORIENTADORA.

Sem poder esquecer do meu coorientador, professor Fernando. Muito obrigado! Desde o antes do mestrado foi um verdadeiro guia, psicólogo e torcedor para que o projeto acontecesse. Deixando todos os MELHORES PROFESSORES que já vivi em igualdade. Obrigado pela sadia convivência.

“Oh Risoflora!
Vou ficar de andada até te achar”
(Chico Science)

RESUMO

Rhizophora mangle L.(mangue-vermelho) é uma espécie com vasta distribuição na costa brasileira e contribui para a manutenção da homeostase das populações humanas através de usos diversos de suas propriedades curativas. Este trabalho teve como objetivo identificar os compostos presentes nos extratos dos propágulos de *Rhizophora mangle* e testar seu potencial citotóxico e genotóxico. Para isso, foram realizados extratos com propágulos em estágios diferentes de desenvolvimento, anexados a planta e já senescentes. Os metabólitos secundários analisados mostraram indicaram que há predominância na presença de saponinas, flavonóides, taninos, fenóis e terpenos. O extrato aquoso de ambos os tratamentos demonstrou toxicidade frente ao ensaio com *A. salina*. O extrato aquoso bruto dos propágulos (EAP) de mangue-vermelho demonstrou atividade e toxicidade elevada para os metanúplios de *Artemia salina* em todas concentrações. No protocolo citotóxico de fragilidade osmótica o EAP feito através do material senescente e anexado se mostraram direntes entre si (significância 5%, anova one-way (P=0,00123)). Apesar disso, em ambas preparações de EAP nesse teste, os índices mais altos de hemólise foi atingido na concentração 750 µg/mL. O EAP anexado utilizado na atividade hemolítica demonstrou estreita relação dose dependente na anaálise de percentual hemolítico ($R^2 = 0,9745$). Na atividade genotóxica com radículas de cebola (*Allium cepa*), as raízes tenderam a obter maior crescimento quando em menor concentração do extrato mas não foi demonstrado graficamente. A concentração de 12,5% de EAP foi considerada ideal para experimentos genotóxicos com *Allium cepa*.

Palavras-Chaves: Mangue-vermelho. Fenóis e taninos totais. Avaliações de citotoxicidade. *Allium cepa*.

ABSTRACT

Rhizophora mangle L. (red mangrove) is a species with wide distribution on the Brazilian coast and contributes to the maintenance of homeostasis of human populations through different uses of its curative properties. This work aimed to identify the compounds present in the extracts of *Rhizophora mangle* propagules and to test their cytotoxic and genotoxic potential. Thus, we prepared extracts with propagules at different stages of development: attached to the plant and already senescent. Phytochemical analysis were performed (screening, TLC and spectrophotometric). In addition, cytotoxicity tests (*Artemia salina* Leach. and red-blood cells) and genotoxicity (*Allium cepa* protocol) with the crude aqueous fruit extract. We found predominantly saponins, flavonoids, tannin, phenolic compounds and terpenes as secondary metabolites found. The aqueous extract from both treatments showed toxicity compared to the assay with *A. salina*. The EAP (aqueous crude extract from *R. mangle* fruits) showed high activity and toxicity for *Artemia salina* metanápains in all concentrations. The EAP performed using senescent and attached material proved to be direct among themselves (significance 5%, one-way anova ($P = 0.00123$)). Despite this, in both preparations of EAP in that test, the highest levels of hemolysis were reached at a concentration of 750 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The attached EAP used in hemolytic activity showed a close dose-dependent relationship in the analysis of hemolytic percentage ($R^2 = 0.9745$). In the genotoxic activity with onion roots, the roots tended to obtain greater growth when in a lower concentration of the extract but it was not shown graphically. The concentration of 12.5% EAP was considered ideal for genotoxic experiments with *Allium cepa*.

Key-words: Red mangrove. Total phenolic and tannin content. *A. salina*. Cytotoxicity assays. *Allium cepa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processo de busca e inclusão dos artigos usados na base de dados. Modificado a partir de Moher et al. (2009).	26
Figura 2 - Mapa da RESEX Acaú-Goiana.	45
Figura 3 - Um representante de <i>Rhizophora mangle</i> ao centro da imagem. Observação © juanfiores · Alguns direitos reservados. https://www.inaturalist.org/observations/24174957	45
Figura 4 - Destaque do propágulo da <i>Rhizophora mangle</i> © Marco Hidalgo Chaverri · todos os direitos reservados. https://www.inaturalist.org/observations/23665532	45
Figura 5 - Exsicata depositada no Herbário-UFP (número de tombamento 85.148).	46
Figura 6 - Propágulos anexados triados em diferentes estágios de desenvolvimento. ...	47
Figura 7 - Placas cromatográficas com os extratos na posição 1, 2, 3 e 4. (à esquerda) e com o padrão (à direita).	49
Figura 8 - Processo de revelação cromatográfica com borrifamento e UV.	49
Figura 9 - Procedimento para detecção de alcalóides nos extratos.	50
Figura 10 - a) Realização da pesquisa de saponinas (extratos e padrão Juá no meio). b) Verificação de presença de saponinas com método de adição de azeite. c) Formação de emulsão presente notada no tubo da esquerda onde foi adicionado o extrato junto ao azeite, indicando saponinas.	50
Figura 11 - Preparação do EAP <i>R. mangle</i> . a) aquecimento e agitação mecânica. b) material pós liofilização.	53
Figura 12 - Processamento do EEP <i>R. mangle</i> . a) EEP <i>R. mangle</i> após a centrifugação. b) EEP <i>R. mangle</i> sendo evaporado no evaporador rotativo.	54
Figura 13 - Experimento in vitro com <i>Artemia salina</i> . a) Eclosão dos cistos. b) Placas com organismos e extrato durante experimento.	55
Figura 14 - Sementes imersas nas soluções de extrato e controle.	58
Figura 15 - Placas cromatográficas com os extratos na posição 1, 2, 3 e 4. (à esquerda) e com o padrão (à direita).	61
Figura 16 - Processo de revelação cromatográfica com borrifamento e UV.	61

Figura 17 - Curva padrão de calibração para a avaliação de Fenol Total.	64
Figura 18 - Curva padrão de calibração para a avaliação de Fenol Residual	65
Figura 19 - Boxplot percentual de hemólise.	67
Figura 20 - Percentual hemolítico do extrato de propágulos anexados.....	68
Figura 21 - Percentual hemolítico do extrato de propágulos senescentes.	69
Figura 22 - Fotomicrografia 10x de células meristemáticas de raiz de cebola vista em microscópio óptico.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário com os assuntos tratados nos 37 artigos revisados com autoria, ano de publicação, parte vegetal usada e tipo de estudo.....	28
Tabela 2 - Metabólitos e materiais utilizados para perfil fitoquímico do extrato de <i>R. mangle</i> L.....	48
Tabela 3 - Análises fitoquímicas preliminares no extrato EMP <i>Rhizophora mangle</i> ...	60
Tabela 4 - Valores obtidos em espectrofotômetro para conteúdo de compostos secundários no material vegetal estudado.	64
Tabela 5 - Tabelas com mortalidades dos náuplios de <i>Artemia salina</i>	65
Tabela 6 - Valores de percentual de hemólise do material senescentes em concentrações crescentes.	67
Tabela 7 - Valores de percentual de hemólise do material anexado em concentrações crescentes.	68
Tabela 8 - Valores médios da frequência dos índices mitóticos dos meristemas de <i>Allium cepa</i> submetidos a tratamento com diferentes concentrações do EAP <i>R. mangle</i> anexados.....	70
Tabela 9 - Valores médios da frequência dos índices mitóticos dos meristemas de <i>Allium cepa</i> submetidos a tratamento com diferentes concentrações do EAP <i>R. mangle</i> senescentes.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. salina</i>	<i>Artemia salina</i>
<i>A. cepa</i>	<i>Allium cepa</i>
ArreÁgua	Laboratório de Avaliação Recuperação e Restauração de Ecossistemas Aquáticos
BR	Brasil
CB	Centro de Biociências
CO ₂	Dióxido de Carbono
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
Depto	Departamento
EAP <i>R. mangle</i>	Extrato aquoso do propágulo da <i>Rhizophora mangle</i>
EMP <i>R. mangle</i>	Extrato metanólico do propágulo da <i>Rhizophora mangle</i>
Labbioprot	Laboratório de bioquímica de proteínas
LC ₅₀ ou DL ₅₀	Dose letal mediana
LEAF	Laboratório de Ecologia Aplicada a Fitoquímica
LILACS	Literatura Latino Americana de Ciências da Saúde
<i>R.</i>	<i>Rhizophora</i>
<i>R. mangle</i>	<i>Rhizophora mangle</i>
RESEX	Reserva Extrativista;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo Geral.....	20
1.1.2	Objetivos Específicos	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	GÊNERO <i>Rhizophora</i> L. (RHIZOPHORACEAE): CONTRIBUIÇÕES E USO MEDICINAL NO ECOSSISTEMA DE MANGUEZAL	21
2.1.1	O ecossistema, a biodiversidade e as relações humanas.....	21
2.1.2	A procura nas bases de dados	24
2.1.3	Achados mais importantes.....	26
2.1.4	Considerações finais	33
2.1.5	Referências	34
3	METODOLOGIA	44
3.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	44
3.2	Triagem e conservação do material	46
3.3	Secagem do material.....	47
3.4	Extração Metanólica e Screening fitoquímico.....	47
3.4.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	47
3.4.2	Identificação alcaloides e saponinas	49
3.4.4	Determinação dos Taninos e Fenóis totais.....	51
3.4.4.1	Preparação do padrão para o ácido tânico.....	51
3.4.4.2	Preparação do extrato	51
3.4.4.3	Quantificação de fenol total	51
3.4.4.4	Quantificação de fenol residual	52
3.4.4.5	Determinação dos níveis de tanino	52

3.5	ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	52
3.5.1	Bioensaio de citotoxicidade com <i>Artemia salina</i>	52
3.5.1.1	Preparação do extrato aquoso para Bioensaio de citotoxicidade	52
3.5.1.2	Preparação do extrato etanólico para Bioensaio de citotoxicidade	53
3.5.1.3	Bioensaio.....	54
3.5.1.4	Análises estatísticas	55
3.5.2	Protocolo de Fragilidade Osmótica	55
3.5.2.1	Preparação do Extrato aquoso.....	55
3.5.2.2	Ensaio	56
3.5.2.3	Análises estatísticas	56
3.5.3	Protocolo de Genotoxicidade com <i>Allium cepa</i>	56
3.5.3.1	Preparação do extrato aquoso	56
3.5.3.2	Germinação de sementes de <i>Allium cepa</i>	57
3.5.3.2	Desenho experimental.....	58
3.5.3.2	Análise da capacidade antiproliferativa	58
3.5.3.3	Análise da genotoxicidade.....	59
3.5.4.2	Análise estatística.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	SCREENING FITOQUÍMICO	60
4.1.1	Taninos e Fenóis totais.....	62
4.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	65
4.2.1	<i>Artemia salina</i>.....	65
4.2.2	Fragilidade Osmótica.....	66
4.2.3	Protocolo <i>Allium cepa</i>	69

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO A — AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES CIENTÍFICAS DO ICMBIO.....	79
	ANEXO B — CARTA DE ANUÊNCIA DA CHEFIA RESEX ACAÚ- GOIANA.....	80
	ANEXO C — CERTIDÃO 1 SISGEN PARA PESQUISA.....	81
	ANEXO D — CERTIDÃO 2 SISGEN PARA PESQUISA.....	82
	ANEXO E — AUTORIZAÇÃO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA (CEUA- UFPE).....	83

1 INTRODUÇÃO

O ecossistema de manguezal, além de ser de tamanha importância estética, presta diversos serviços ecossistêmicos/ambientais para os seres vivos que habitam na sua circunvizinhança. Mehvar et al. (2018), apontam vários serviços em seu artigo de revisão, como a mitigação dos efeitos das mudanças climáticas, proteção contra tempestades e ondas, estabilização da costa e controle da erosão. Pontua-se também, o controle de inundações, berçário para peixes e outras espécies marinhas e/ou estuarinas, armazenagem e desintoxicação de contaminantes (MEHVAR et al., 2018; ICMBIO, 2018), entre outros, como a pesca, mariscagem e catação de crustáceos.

O mangue-vermelho (*Rhizophora mangle* L.), comum no ecossistema de manguezal, pertence à família Rhizophoraceae Pers. Essa família possui distribuição em sua maioria pantropical e contém 15 gêneros com aproximadamente 149 espécies no total (JUNCOSA; TOMLINSON, 1988; COSTA-LIMA, 2018). Apesar do mangue-vermelho possuir maior representação ao longo da costa nordestina, o gênero possui outros representantes nos manguezais do Brasil, como *Rhizophora harrisonii* Leechm. e *Rhizophora racemosa* G.Mey. (TOMLINSON, 1994; NADIA; MACHADO, 2014). Estas possuem hábito terrestre, porte arbóreo, comum em manguezal e restinga e predominância nos trópicos (POLIDORO et al., 2010; COSTA-LIMA, 2018).

Nesse contexto, vale a pena salientar que as plantas de mangue têm um papel social pivotante na etnociência, pois além de constituírem matéria prima de vários utensílios domésticos, cercados, embarcações e corantes, estão presentes na mesa de comunidades tradicionais da costa brasileira, servindo de insumos para chás e outros preparos medicinais (CARNEIRO; BARBOZA; MENEZES, 2010; SANTOS et al., 2014).

Regalado, Sánchez e Mancebo (2016), em sua revisão de literatura enumeram os potenciais terapêuticos diversos do mangue-vermelho como antidiabético, antioxidante, anticancerígeno, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, diminui o colesterol, proliferação celular e aumenta a diferenciação celular. Ainda há literatura que sustenta a presença de compostos como os taninos como sendo os constituintes ativos encontrados em espécies do gênero (HOWLADER et al., 2013; RAHIM et al., 2008)

Além dos taninos, vários grupos químicos estão presentes em espécies de *Rhizophora* L. como álcoois, aldeídos, aminoácidos, ácido carboxílico aromático, carboidratos, ácidos carboxílicos, ésteres, ácidos graxos, flavonoides, cetonas, lipídios, fenóis, saponinas, esteroides e terpenos (ABDURAHMAN; NITTHIYA; MANAL, 2016). Os compostos secundários presentes em *Rhizophora* são principalmente responsáveis pelas atividades biológicas devido à presença de diferentes estruturas químicas. As diferentes substâncias presentes em *Rhizophora* spp. respondem pela sua ação farmacológica, toxicológica e nos processos ecológicos naturais.

Os compostos bioativos presentes nos extratos de *Rhizophora* spp. são os principais responsáveis pela atividade biológica das espécies do gênero. A demanda por espécies do grupo aumentou recentemente devido à ocorrência de compostos bioativos únicos que eles exibem (ABDURAHMAN; NITTHIYA; MANAL, 2016). Nas últimas décadas, *Rhizophora* spp. foi usado como medicamento para o tratamento doença como diarreia, febre e inflamação (BANDARANAYAKE, 2002; ABDURAHMAN; NITTHIYA; MANAL, 2016). À medida que a pesquisa progrediu, tornou-se imperativo para identificar, quantificar e compreender os compostos bioativos ou compostos químicos presente nos extratos dos representantes do grupo, a fim de auxiliar as na descoberta de novas atividades biológicas junto com estudos farmacêuticos.

Recentemente, vários estudos sobre espécies de mangue (*Rhizophora* spp.) foram relatados sobre compostos bioativos exercido nas espécies e nas atividades biológicas dos extratos (ABDURAHMAN; NITTHIYA; MANAL, 2016). Assunção et al. (2016), por exemplo, ao estudarem o extrato aquoso de *R. mangle*, com abordagem farmacêutica, perceberam que o extrato trouxe vários benefícios a parede gástrica, incluído a prevenção de diarreia. Assim, torna-se evidente a importância de estudos (etno)botânicos, sejam eles fitoquímicos, ecológicos ou evolutivos, agregados aos conhecimentos tradicionais das populações, considerando sempre os aspectos éticos aos detentores do conhecimento.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Identificar os compostos presentes nos extratos dos propágulos de *Rhizophora mangle* L. e testar seu potencial citotóxico e genotóxico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar a presença de compostos fitoquímicos majoritários no extrato aquoso bruto de *R. mangle*.
- Avaliar a atividade citotóxica do extrato aquoso de propágulos *R. mangle* através do bioensaio com *Artemia salina* Leach.
- Avaliar a atividade citotóxica do extrato aquoso de propágulos *R. mangle* através do protocolo de fragilidade osmótica.
- Avaliar a atividade genotóxica do extrato aquoso de propágulos *R. mangle* através do protocolo *Allium cepa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GÊNERO *RHIZOPHORA* L. (RHIZOPHORACEAE): CONTRIBUIÇÕES E USO MEDICINAL NO ECOSISTEMA DE MANGUEZAL

(Este referencial teórico já se encontra submetido e aceito como capítulo de livro Na Conferencia da Terra 2018)

2.1.1 O ecossistema, a biodiversidade e as relações humanas

O manguezal, assim como pântanos, várzeas e recifes de corais, representam Zonas Úmidas de Importância Internacional, dada a diversidade biológica que conferem, e as intensas pressões antrópicas sofridas, que estão sujeitas no dia a dia, e possuem alta produtividade. O manguezal é um ecossistema costeiro, com distribuição majoritária em latitudes tropicais, caracterizado por uma vegetação adaptada ao estresse salino, devido a influência das marés ².

Os tipos vegetacionais únicos e comuns dos manguezais se dão pelas características ambientais do meio, devido as variações nas concentrações de sais dos sedimentos, das quais são submetidas (RODRIGUEZ et al., 2012). Alguns bosques e franjas de mangue desses ecossistemas estão localizados em regiões de estuário, ou seja, áreas que possuem corpos de água conectadas diretamente ao mar, promovendo mistura da água doce com a salgada (PRITCHARD, 1967) ou mais a montante, no qual apresentam um gradiente de espécies relacionadas a dinâmica hidrológica, ocupando área de mangue seco ou apicuns.

O ecossistema de manguezal, presta diversos serviços ecossistêmicos ou ambientais para os seres vivos ao seu redor e dentro dele. Mehvar et al. (2018) aponta vários serviços em seu artigo de revisão, como a mitigação dos efeitos das mudanças climáticas, proteção contra tempestades e ondas, estabilização da costa e controle da erosão. Pontua-se também, o controle de inundações, berçário para peixes e outras espécies marinhas e/ou estuarinas, filtração e regulação do fluxo da água, sequestro de carbono, produção de oxigênio e absorção de CO₂, armazenagem e desintoxicação

de contaminantes (MEHVAR et al., 2018; ICMBIO, 2018), entre outros, como a pesca, mariscagem e catação de crustáceos.

Além disso, os manguezais possuem diversidade de flora e fauna única em suas adaptações (DE DEURWAERDER et al., 2016). As espécies vegetais típicas de manguezais no mundo incluem, aproximadamente, 50 espécies, distribuídas em 16 famílias.

No Brasil, os vegetais avasculares e vasculares (briófitas, samambaias e licófitas, e angiospermas (não há presença de gimnospermas)) com ocorrência em manguezal somam 41 famílias, 86 gêneros e 115 espécies (FLORA DO BRASIL, 2020). Contudo, as espécies mais conhecidas são *Avicennia schaueriana* Stapft & Leechm. ex Moldenke (mangue-preto) e *Avicennia germinans* (L.) L. (Acanthaceae), *Laguncularia racemosa* C.F. Gaertn. (mangue-branco) e *Conocarpus erectus* L (mangue-de-botão), (Combretaceae) e a *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) (mangue-vermelho) e do grupo das samambaias o *Acrostichum aureum* L. (samambaia-de-couro ou samambaia-do-mangue) (Pteridaceae) (MEDINA et al., 1990).

O mangue-vermelho (*Rhizophora mangle*) é uma espécie da família Rhizophoraceae Pers. Essa espécie tem o porte arbóreo (SCHWARZBACH, 2014; COSTA-LIMA, 2019). Ela desenvolve estruturas pseudo-radiculares típicas do grupo *Rhizophora* conhecidos como raízes escoras, que saem do tronco ou ramos do manguezal e crescem em direção ao solo, onde se desenvolverá um sistema radicular subterrâneo (PRANCE, 1975; SCHWARZBACH, 2014). A maioria das partes vegetativas é composta por tricoesclereíde (SCHWARZBACH, 2014).

A *Rhizophora mangle* é uma planta perene, suas folhas são simples, inteiras, opostas, alternas, pecioladas, glabras (PRANCE, 1975). Possuem pontuações negras mais evidentes na face inferior estípulas medindo entre 3–4,8 cm (SOUZA; MAGOSSO, 2002; SCHWARZBACH, 2014). Segundo Prance (1975), as folhas do mangue-vermelho crescem em aglomerados no final dos ramos. Steinke (1999) aponta que o excesso de sal na seiva das células é transferido para as folhas mais velhas que ficam

amarelas e caem, em um processo denominado realocação para as partes senescentes, o mesmo ocorre com os poluentes excedentes

As flores de *Rhizophora mangle* são pequenas e discretas, as cores das flores são geralmente brancas e amarelas que variam de amarelo pálido a amarelo escuro. Essa espécie desenvolve inflorescência composta, as flores surgem da axila. A floração e frutificação de *Rhizophora mangle* se dá, em geral, por todo ano, mas há em maior quantidade no período chuvoso, como exposto por NADIA et al. (2012). Os frutos germinam anexados as árvores-mães e originam propágulos em forma de lança, que podem permanecer viáveis por 12 meses (PANITZ et al., 1994). Esses frutos são pequenos e castanhos com cerca de 3-5cm e antecipam a fase crescimento dos propágulos (TOMLINSON, 1994; NADIA et al., 2012).

Os propágulos, estruturas de reprodução vivíparas comum em grupos vegetais de manguezais, ao se desprenderem contribuem para a dispersão da planta mãe no ecossistema. Essas estruturas, de acordo Beyl e Trigiano (2015) são cópias genéticas idênticas da planta original. O fruto sustenta o propágulo até que o mesmo esteja amadurecido e se desprenda do fruto caindo no solo ou flutuando na água salobra do manguezal. A propagação através da flutuação é uma característica global importante para os vegetais que habitam tal ecossistema e é influenciado pelo tempo que os propágulos continuam viáveis (VAN DER STOCKEN et al., 2019). Simulações sugerem que o gênero *Rhizophora* se moveu através do Atlântico através dispersão de longa distância (MORI; ZUCCHI; SOUZA, 2015) provavelmente através da propagação vivípara.

Apesar da espécie ser bastante representativa ao longo da costa nordestina, o gênero possui outros representantes nos manguezais do Brasil, como *Rhizophora harrisonii* Leechm. e *Rhizophora racemosa* G. Mey. (TOMLINSON, 1994; NADIA; MACHADO, 2014). Ao redor globo, além da *R. mangle*, *R. harrisonii*, *R. racemosa* também são citadas *Rhizophora apiculata* Blume, *Rhizophora mucronata* Lam. *Rhizophora stylosa* Griff (JUNCOSA; TOMLINSON, 1988; COSTA-LIMA, 2018).

É significativo que as ciências sejam pensadas a partir de um olhar multidisciplinar, como o fazem a etnobotânica, a etnoecologia, a etnofarmacologia, entre outras, como forma de alinhar o Conhecimento Ecológico Local (CEL) como as ciências naturais e sociais. A etnobotânica se destaca, ao resgatar conhecimentos das populações tradicionais e relacionar às ciências aplicadas, do ramo da biologia vegetal (ALBUQUERQUE, 2002).

Todos os vegetais cumprem um papel social pivotante na etnociência (SANTOS et al., 2014), não é diferente nos manguezais, pois além de constituírem matéria prima de vários utensílios domésticos, servem como cercados na agricultura, matéria prima na produção de carvão vegetal (SANTOS et al., 2014). Também estão presentes na mesa de comunidades tradicionais da costa brasileira, servindo de alimentação na forma de raízes, tubérculos, sucos e insumos para chás (CARNEIRO; BARBOZA; MENEZES, 2010). Neste sentido, se faz necessário conhecer com profundidade a flora que nos circunda, de modo que possamos usufruir e preservar de maneira mais eficiente seus potenciais.

Regalado, Sánchez e Mancebo (2016) em uma revisão de literatura enumeram os potenciais terapêuticos diversos do mangue-vermelho (*R. mangle*): antidiabético, antioxidante, anticancerígeno, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, diminui o colesterol, proliferação celular e aumenta a diferenciação celular. Ainda há literatura que sustenta a presença de compostos similares em espécimens do mesmo gênero, como o tanino (HOWLADER et al., 2013; RAHIM et al., 2008).

2.1.2 A procura nas bases de dados

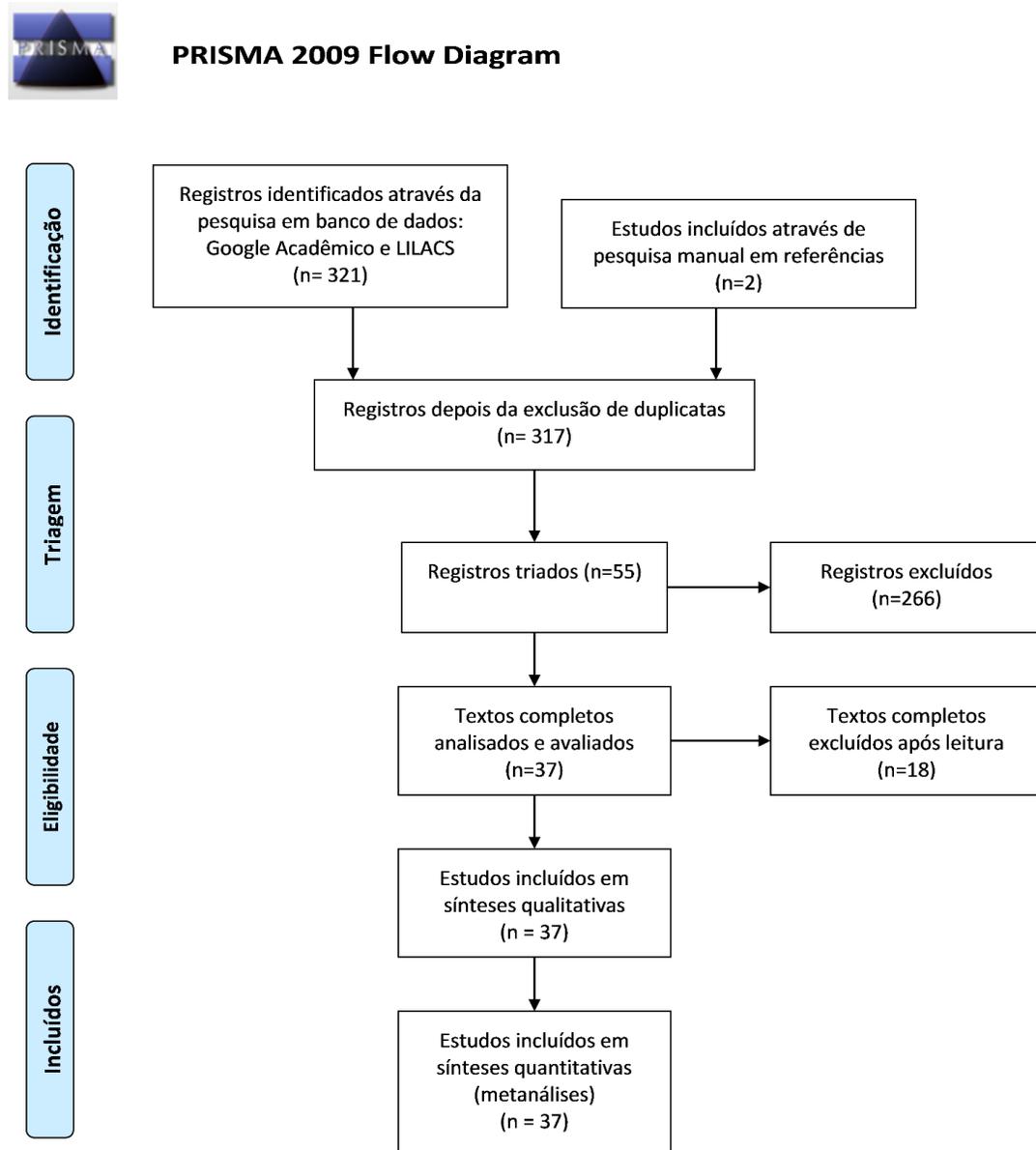
Este estudo foi baseado em uma revisão sistêmica, constituída por meio da análise da literatura, publicada em periódicos a partir de 2010. Para localizar os artigos sobre o assunto, realizou-se uma busca nas bases de dados eletrônicos do Google Acadêmico e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), de março a abril de 2018, usando a expressão “Plantas medicinais + Rhizophora” na primeira base de dados e através dos termos “Medicinal plants + Rhizophora” na segunda. Também foram realizadas buscas manuais nas referências

bibliográficas dos artigos encontrados e em seguida, foi realizado a leitura dos textos completos.

Primeiramente, utilizou-se o resumo de todos os artigos, de maneira que fossem selecionados àqueles que corroborassem com os seguintes critérios de inclusão: ser um artigo proveniente de uma revista confiável, tratar de alguma das espécies citadas em ecossistemas de manguezais, ter sido publicada nos últimos 8 anos (2010-2018), estar em alguma das línguas de domínio dos autores (português, inglês ou espanhol). Trabalhos em duplicata foram excluídos. Os critérios de exclusão foram (i) citações do gênero *Rhizophora* que não habitassem no ecossistema manguezal, (ii) trabalhos publicados em outros idiomas que não fossem de domínio dos autores, (iii) trabalhos provenientes de outras fontes, que não periódicos ou revistas, e (iv) trabalhos que estivessem disponíveis de maneira gratuita na base dados. Por fim, foram selecionados os artigos e os dados analisados foram apresentados no formato de tabelas e figuras com o uso do Microsoft Excel (versão 2016).

A seguir é apresentado o fluxograma do processo de busca na base de dados na **Figura 1**.

Figura 1 - Fluxograma do processo de busca e inclusão dos artigos usados na base de dados. Modificado a partir de Moher et al. (2009).



2.1.3 Achados mais importantes

A busca por “Medicinal plants and Rhizophora” e “Plantas medicinais and Rhizophora” no LILACS gerou o total de 21 resultados, porém apenas 18 artigos estavam disponíveis e se enquadravam nos critérios de inclusão. Somente estes foram selecionados para a fase seguinte de leitura do texto por completo. No Google Acadêmico, a busca em português gerou 1.130 resultados. No entanto, tal buscador,

por não possuir um algoritmo de busca preciso, pode causar erro na busca por trabalhos acadêmicos. Com isso, no Google Acadêmico foram analisados os primeiros 300 artigos da base de dados, sendo que 41 artigos foram selecionados desta base de dados, de acordo com os critérios de inclusão, para a fase da leitura do texto por completo. Após a leitura completa dos textos as bases de dados Google Acadêmico e LILACS nos forneceram o total de 38 registros válidos e que foram usados nesta revisão, já contabilizando a exclusão de 4 artigos duplicados.

Dentre os 37 manuscritos revisados, a maioria são provenientes dos anos 2016 (27%), seguido por 2011 (21,6%), 2010 e 2012 (13,5%), 2013 (8,1%), 2015 e o primeiro semestre de 2018 (5,4%) e por último 2014 e 2017 (2,7%). As partes vegetais com maior representatividade nas metodologias de pesquisa foram somente a casca do tronco da planta, com 45,9 %, seguido da folha em 27% dos trabalhos e a folha em consórcio com a casca em 8,1% dos artigos. Uso das cascas mostrou-se bastante significativo (quase metade dos artigos) com relação as demais partes do vegetal, o que sugere uma concentração maior de determinadas substâncias químicas com potencial curativo.

A espécie mais estudada foi *R. mangle* presente em 67,57% dos trabalhos seguida de *Rhizophora mucronata* Lam. (13,51%). A quase onipresença da *R. mangle* no ecossistema de manguezal fez com que este vegetal estivesse em mais da metade dos estudos revisados. Estudos etnobotânicos foram as pesquisas mais realizadas com 13,51%, seguido da atividade antibacteriana (8,11%). A predominância de estudos etnobotânicos sugere a importância da inserção de populações tradicionais para o avanço científico.

Há na literatura várias referências a estudos etnobotânicos com representantes do gênero *Rhizophora* (COE; ANDERSON, 1996; ISLAM; HALDER; APU, 2015; NEAMSUVAN et al., 2012; THAMAN, 1992). No estudo de Govindasamy e Kannan (2012) é relatado presença da *Rhizophora sp.* e nestes papers os populares fazem uso de suas partes vegetais para atividades curativas, como: hanseníase, elefantíase, tuberculose, malária, disenteria, úlceras e algumas doenças de pele. Em outros trabalhos, os autores Nabeelah Bibi et al. (2019), Liebezeit e Rau (2006), apontam os

usos de cascas e folhas da *Rhizophora mangle* em comunidades tradicionais para o combate: diabetes. Os trabalhos realizados por Islam, Halder e Apu (2015), Neamsuvan et al. (2012) e Sathe, Lavate e Patil (2014) relatam o uso de casca, folhas e frutos de *Rhizophora mucronata* para o combate de bactérias, diabetes, diarreia, náusea, hematúria, hemorragias, angina, mordidas de cobra, afrodisíaco e epilepsia. Assim, vale salientar a importância dos vegetais do gênero *Rhizophora* para a manutenção da medicina popular em diversas regiões do planeta. Na Tabela 1 é possível observar um sumário com os assuntos tratados nos 37 artigos revisados.

Tabela 1 - Sumário com os assuntos tratados nos 37 artigos revisados com autoria, ano de publicação, parte vegetal usada e tipo de estudo.

Autoria	Ano de publicação	Parte vegetal usada	Tipo do estudo
Abeysinghe	2010	folha (<i>R. apiculata</i>)	Atividade antibacteriana
Alemán et al.	2011	casca (<i>R. mangle</i>)	Atividade larvicida
Armas et al.	2016	casca (<i>R. mangle</i>)	Estimulação de interleucina
Assis et al.	2016	casca (<i>R. mangle</i>)	Estudo etnobotânico
Boukraâ, Abdellah e Ait- Abderrahim	2013	casca (<i>R. mucronata</i> , <i>R. apiculata</i> e <i>R. lamarckii</i>)	Atividade antimicrobiana
Sánchez Calero, Martínez Sánchez e Faure Garcia	2011	casca (<i>R. mangle</i>)	Efeito protetor de polifenóis

Carneiro, Barboza e Menezes	2010	raiz e propágulo (<i>R. mangle</i>)	Estudo etnobotânico
de-Faria et al.	2012	casca (<i>R. mangle</i>)	Etnoconhecimento e atividade anti-úlceras
Mancebo Dorvigny et al.	2011	folha (<i>R. mangle</i>)	Atividade cicatrizante
Figueiredo et al.	2011	flor (<i>R. mangle</i>)	Inventário florístico
Heredia-Diaz et al	2018	folha e caule (<i>R. mangle</i>)	Estudo etnobotânico
Hong, Ibrahim e Kassim	2011	casca (<i>R. apiculata</i>)	Atividade citotóxica
Hossain et al.	2016	casca e folha (<i>R. mucronata</i>)	Atividade anti-diarréia
Howlader et al.	2013	casca (<i>R. mucronata</i>)	Atividade antibacteriana, citotóxica e analgésica
De Jesus et al.	2012	folha (<i>R. mangle</i>)	Revisão sobre a atividade anti-úlceras dos taninos
Das et al.	2016	raíz (<i>R. apiculata</i>), (<i>R. mucronata</i>) e (<i>R. annamalayana</i>)	Revisão da atividade antidiabética de espécimens de manguezal

Lawag et al.	2012	casca (<i>R. mucronata</i>)	Abordagem etnobiológica na produção de fármacos
Limsuwan, Supayang e Voravuthikunchai	2013	casca (<i>R. mucronata</i>)	Atividade antibacteriana
Malini et al.	2010	casca (<i>R. mangle</i>)	Atividade antimutagênica
Marroquín e Cruz	2016	folha e casca (<i>R. mangle</i>)	Atividade biológica e caracterização química
Mathew et al.	2012	raiz (<i>R. mangle</i>)	Atividade cicatrizante
Mayorga et al.	2010	casca (<i>R. mangle</i>)	Bioensaio de toxicidade
Miranda et al.	2011	não definiu (<i>R. mangle</i>)	Estudo etnobotânico
Muniz e da Silva	2016	folha (<i>R. mangle</i>)	Estudo etnobotânico
Rodriguez-Perdomo e Curbelo-Hernandez	2012	casca (<i>R. mangle</i>)	Estudo da atividade cinética

Perera et al	2016	casca (<i>R. mangle</i>)	Atividade farmacológica e toxicológica
Ferrer et al	2011	casca e folha (<i>R. mangle</i>)	Estudo da atividade antimicrobiana
Prabhu e Guruvayoorappan	2012	toda a planta (<i>R. apiculata</i>)	Atividade imunostimulante e quimioprotetora
Rangel-Ruiz et al.	2016	folha (<i>R. mangle</i>)	Avaliação toxicológica
Rivero et al.	2015	casca (<i>R. mangle</i>)	Eficácia de creme para queimaduras
Rodrigues-Neto et al.	2017	folha (<i>R. mangle</i>)	Efeitos embriotóxicos e embrioestáticos
Sanchez, Garcia e Cors	2018	casca (<i>R. mangle</i>)	Atividade antioxidante
Santos et al.	2014	caule (<i>R. mangle</i>)	Estudo etnobotânico
Saravanan e Radhakrishnan	2016	folha (<i>Rhizophora</i> sp)	Atividade antimicrobiana
Selvaraj, Kaliyamurthi, Thirungnasambamdam	2016	folha (<i>R. apiculata</i>)	Identificação por DNA barcoding
Trinh, Staerk e Jager	2016	casca (<i>R. mucronata</i>)	Abordagem etnobiológica na

			produção de fármacos
Zhang et al.	2010	folha (<i>R. mangle</i>)	Atividade antioxidante

Nos trabalhos revisados foi possível observar como está perpetuado o uso de espécimens de *Rhizophora* no dia-a-dia de diversas populações tradicionais, sejam elas no Brasil ou em outros países (FIGUEIREDO et al., 2011; MATTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2014; HEREDIA et al., 2018). Isto nos leva a confirmar dois importantes hipóteses: o gênero vegetal tem abrangência pantropical e o uso de suas partes vegetais é bem conhecida entre o meio popular. Desta forma, os estudos com este grupo vegetal podem se limitar a pesquisas mais limitadas ao âmbito laboratorial (SÁNCHEZ CALERO; MARTINÉZ SÁNCHEZ; FAURE GARCIA, 2011; PIOLOTO FERRER et al., 2011; HOWLADER et al., 2013), bem como com o auxílio de trabalhos de campo, nestes incluindo entrevistas com populares (DE OLIVEIRA; VIERA; JUNIOR, 2018), a partir de técnicas de listas livres, questionários semiestruturados e/ou técnica de “snow ball” (bola de neve), que consiste em explorar os conhecimentos à respeito do assunto de quem detém o saber, após o mesmo indica a próxima pessoa que possui também conhecimento a respeito do tema e assim sucessivamente, até saturar as respostas obtidas.

Caneiro, Barboza e Menezes (2010) traçaram o perfil socioeconômico de populares e de uso de plantas em uma Reserva Extrativista no Pará, Brasil. Neste trabalho salientam que o mangue-vermelho (*R. mangle*) foi o vegetal mais citado dentre os 23 vegetais oriundos de restingas e manguezais da localidade. Dentre estes usos foram apontados os usos do *R. mangle* no artesanato, como combustível, para construções, tecnologias sociais (pesca e/ou espetos), medicinais, entre outros. Quanto ao uso medicinal dos representantes do gênero *Rhizophora* há relatos da utilização dos propágulos (CARNEIRO; BARBOZA; MENEZES, 2010), cascas (REZVANINEJAD et al., 2017), folhas (MARROQUÍN; CRUZ, 2016) e raízes

(CARNEIRO; BARBOZA; MENEZES, 2010). Isso se dá, pois, estudos fitoquímicos em representantes no gênero *Rhizophora* indicam a presença tanino, um composto antioxidante e antiinflamatório natural.

Perera et al. (2016), ao estudarem o extrato aquoso de *R. mangle*, com abordagem farmacêutica, perceberam que o extrato trouxe vários benefícios a parede gástrica, incluído a prevenção de diarreia. Em *R. stylosa* também foram encontrados compostos com atividade antioxidante, como o tanino, em seu fruto (MIRANTI et al., 2018). Assim, torna-se evidente a importância dos estudos (etno)botânicos, sejam eles fitoquímicos, ecológicos ou evolutivos, agregados aos conhecimentos tradicionais das populações, considerando sempre os aspectos éticos aos detentores do conhecimento. Há relatos também, do uso de partes vegetais de *Rhizophora* na diminuição dos efeitos da diabetes, uma das doenças crônicas mais comuns nestes tempos contemporâneos. Trinh, Staerk e Jager (2016) analisaram a inibição de enzimas envolvidas na diabetes tipo 2 (Diabetes mellitus) através de extratos de plantas do Vietnam, dentre as quais a *R. mucronata* estava incluída.

Embora muitos dos benefícios atribuídos aos representantes de *Rhizophora* já tenha sido referenciado por Regalado, Sánchez e Mancebo (2016), há ainda outros campos do conhecimento que podem se valer de tais qualidades presentes em espécimes do gênero vegetal. Na imunologia, o extrato da *R. apiculata* pode atuar como um ótimo imunostimulante, durante a quimioterapia, com acréscimo na contagem de leucócitos, hemoglobina e atividade da medula óssea, quando comparado a outros tratamentos (PRABHU; GURUVAYOORAPPAN, 2012). No campo da farmacoinformática e imunoinformática, Hossain et al. (2016) desenvolveram estruturas 3D que podem ser sintetizadas a compostos derivados de *R. mucronata*. Tal composto, se produzido, teria efeito no combate ao rotavírus A, uma vez que produzido como fármaco (HOSSAIN et al., 2016).

2.1.4 Considerações finais

Assim, é possível entender o quanto se sabe e o quanto se tem de percurso em pesquisa ainda a ser desenvolvido nas contribuições etnobotânicas das plantas do gênero *Rhizophora*. Desta forma, este trabalho pode subsidiar políticas públicas de

preservação da flora de áreas de manguezal assim como pode contribuir para estudos mais aprofundados na preservação do conhecimento popular e suas aplicações na saúde pública.

2.1.5 Referências

ABEYSINGHE, P D. Antibacterial activity of some medicinal mangroves against antibiotic resistant pathogenic bacteria. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 2, p. 167, 2010. Disponível em: <<http://www.ijpsonline.com/text.asp?2010/72/2/167/65019>>.

ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino de. **Introdução à Etnobotânica**. Recife: Editora Bagaço, 2002.

ALEMÁN, Y. et al. ACTIVIDAD LARVICIDA DE EXTRACTOS DE *Rhizophora mangle* L. CONTRA ESTRONGÍLIDOS GASTROINTESTINALES DE OVINOS. **Salud Anim.**, v. 33, n. 2, p. 111–115, 2011.

ARMAS, Elizabeth et al. Stimulation of Interleukin-2 [IL-2] Release by *Rhizophora mangle* Bark Aqueous Extracts and Its Fractions. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 15, n. 2, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://sciencedomain.org/abstract/14992>>.

ASSIS, José Geraldo de Aquino et al. Conociendo Brasil a través de dos colecciones etnobotánicas de España. Knowing Brazil through two ethnobotany collection from Spain. **Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Secc. Aula, Museos y Colecciones**, v. 3, p. 93–105, 2016.

ASSUNÇÃO, Maíra Algarve et al. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments collected from mangroves with different levels of urbanization in southern Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 119, n. 1, p. 439-445, 2017.

BEYL, Caula A.; TRIGIANO, Robert N. **Plant propagation concepts and laboratory exercises**. CRC Press, 2015. p 40.

BOUKRAâ, Laïd; ABDELLAH, Fatiha; AIT-ABDERRAHIM, Leïla. Antimicrobial Properties of Bee Products and Medicinal Plants. **Formatex**, n. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, p. 960–970, 2013.

CARNEIRO, Diogo Borges; BARBOZA, Myrian Sá Leitão; MENEZES, Moirah Paula. Plantas nativas úteis na Vila dos Pescadores da Reserva Extrativista Marinha Caeté-Taperaçu, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1027–1033, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062010000400017&lng=pt&tlng=pt>.

COSTA, Isabelle Gomes Cardoso Machado da; MOREIRA, Andréia Donza Rezende; BOVE, Claudia Petean. Flora of Rio de Janeiro: Rhizophoraceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 1, p. 109-110, 2017.

COE, Felix G.; ANDERSON, Gregory J. Ethnobotany of the Garifuna of eastern Nicaragua. **Economic Botany**, v. 50, n. 1, p. 71-107, 1996.

COSTA-LIMA, James Lucas. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Rhizophoraceae. **Rodriguesia**, v. 69, n. 1, p. 205–207, 2018.

COSTA-LIMA, James Lucas. **Rhizophoraceae**. In: **Flora do Brasil 2020 [em construção]. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13821>> (acesso em 22 de julho de 2019)

CRUZ, Sully M; et al. Evaluation of Mangrove (*Rhizophora mangle* L.) products as coloring, antimicrobial and antioxidant agents. **Int J Phytocosmetics Nat Ingredients**, v. 2, n. 1, p. 12, 2015.

DAS, Swagat Kumar; et al. Antidiabetic potential of mangrove plants: a review. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 1, p. 75–88, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1091386>>.

DE DEURWAERDER, Hannes; et al. How are anatomical and hydraulic features of the mangroves *Avicennia marina* and *Rhizophora mucronata* influenced by siltation? **Trees - Structure and Function**, v. 30, n. 1, p. 35–45, 2016.

DE OLIVEIRA, Francisco Pereira; VIEIRA, Norma Cristina; JÚNIOR, Sebastião Rodrigues. As Famílias do Manguê e Suas Práticas Holísticas: Um Estudo no Nordeste Paraense, Amazônia, Brasil. **Amazônica-Revista de Antropologia**, v. 9, n. 1, p. 316–337, 2018.

DE-FARIA, Felipe Meira et al. Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 234–243, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111007987>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

DE JESUS, Neyres Zinia Taveira et al. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3203–3228, 2012.

FIGUEIREDO, Estrela et al. Annotated catalogue of the flowering plants of São Tomé e Príncipe. **Bothalia**, v. 41, n. 1, p. 41–82, 2011.

FLORA DO BRASIL. Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 25 de Novembro de 2019, v. 5, 2018.

GOVINDASAMY, C.; KANNAN, R. Pharmacognosy of mangrove plants in the system of unani medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S38–S41, 2012.

HEREDIA, Yamilé et al. An ethnobotanical survey of medicinal plants used by inhabitants of Holguín, Eastern Region, Cuba. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 1, n. 1, p. 63–81, 2018.

HONG, Lim Sheh; IBRAHIM, Darah; KASSIM, Jain. Assessment of in vivo and in vitro cytotoxic activity of hydrolysable tannin extracted from *Rhizophora apiculata*

barks. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2737–2740, 2011.

HOSSAIN, Mohammad Uzzal et al. Therapeutics insight with inclusive immunopharmacology explication of human rotavirus A for the treatment of diarrhea. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. JUN, 2016.

HOWLADER, Md Sariful Islam et al. Antibacterial, cytotoxic, analgesic and diuretic activities of *Rhizophora mucronata* Lam. bark. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 4, n. 3, p. 229–232, 2013.

ICMBIO. **Atlas dos Manguezais do Brasil**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/manguezais/atlas_dos_manguezais_do_brasil.pdf>.

ISLAM, Md Shariful; HALDER, Joyanta; APU, Md Aminul Islam. A review on traditional ayurvedic medicinal plants used in the sundarban mangrove forest in Bangladesh. **Online Journal of BioSciences and Informatics**, v. 1, n. 1, 2015.

JUNCOSA, Adrian M.; TOMLINSON, Philip Barry. A Historical and Taxonomic Synopsis of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, n. 4, p. 1278–1295, 1988. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2399286>>.

LAWAG, Ivan L. et al. α -Glucosidase inhibitory activity of selected Philippine plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 217–219, 2012.

LIMSUWAN, Surasak; VORAVUTHIKUNCHAI, Supayang P. Anti-Streptococcus pyogenes activity of selected medicinal plant extracts used in Thai traditional medicine. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 4, p. 535–540, 2013.

LIEBEZEIT, Gerd; RAU, Monica T. New Guinean mangroves—Traditional usage and chemistry of natural products. **Senckenbergiana maritima**, v. 36, n. 1, p. 1-10, 2006.

SÁNCHEZ CALERO, Janet; MARTÍNEZ SÁNCHEZ, Gregorio; FAURE GARCÍA, Roberto. Efecto protector de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. sobre el daño oxidativo a proteínas y ADN. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2011.

SOUZA, Vinicius Castro; MAGOSSÍ, R. Goodeniaceae In. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, Brasil. São Paulo: FAPESP/HUCITEC**, v. 2, p. 121-122, 2002.

MALINI, Maressa et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 176–181, 2010.

MANCERO DORVIGNY, Betty et al. Efecto cicatrizante de la pasta de clorofila-caroteno de *Pinus caribaea* var. *caribaea* sobre heridas abiertas asépticas. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, n. 1, p. 24–33, 1996. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000100003>.

MARROQUÍN, Nereida; CRUZ, Sully M. Actividad biológica y caracterización química de los extractos de las hojas y corteza de *Rhizophora mangle* L. **Ciencia, Tecnología y Salud**, v. 3, p. 73–81, 2016.

MATHEW, Mathen et al. Effect of *Rhizophora* root extracts on wound healing and yeast-induced pyrexia in rats. **Fishery Technology**, v. 49, n. 2012, p. 161–166, 2012.

MATTOS, Patrícia Pereira et al. Etnoconhecimento e percepção dos povos pesqueiros da Reserva Ponta do Tubarão acerca do ecossistema manguezal. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 4, p. 481, 2012.

MAYORGA, Pablo et al. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 897–903, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000600012&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

MEDINA, Ernesto et al. Soil salinity, sun exposure, and growth of *Acrostichum aureum*, the mangrove fern. **Botanical Gazette**, v. 151, n. 1, p. 41–49, 1990.

MEHVAR, Seyedabdolhossein et al. Quantifying Economic Value of Coastal Ecosystem Services: A Review. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 6, n. 1, p. 5, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2077-1312/6/1/5>>.

MIRANDA, Tatiana Mota et al. Existe utilização efetiva dos recursos vegetais conhecidos em comunidades caiçaras da Ilha do Cardoso, estado de São Paulo, Brasil? **Ecologia**, v. 62, n. 1, p. 153–169, 2011.

MIRANTI, Dewi Indah; ICHIURA, Hideaki; OHTANI, Yoshito. The Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Food Products of *Rhizophora stylosa* Fruit (Coffee and Tea Mangrove). **International Journal of Forestry Research**, v. 2018, p. 6, 2018.

MOHER, David et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **Annals of Internal Medicine**, v. 151, n. 4, p. 264, 2009. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135>>.

MORI, Gustavo M.; ZUCCHI, Maria I.; SOUZA, Anete P. Multiple-geographic-scale genetic structure of two mangrove tree species: the roles of mating system, hybridization, limited dispersal and extrinsic factors. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0118710, 2015.

MUNIZ, José Carlos; DA SILVA, Luiz Everson. “MAIS QUE ISSO EU NÃO POSSO FALÁ”: NOTAS SOBRE BENZEDURAS E PARTEIRAGENS CAIÇARA EM GUARAQUEÇABA/PR. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 12, n. 23, p. 31–43, 2016. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia>>.

NADIA, de Lima Tarcila; MORELLATO, Leonor Patrícia Cerdeira; MACHADO, Isabel Cristina. Reproductive phenology of a northeast Brazilian mangrove community: Environmental and biotic constraints. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 207, n. 9, p. 682-692, 2012.

NADIA, Tarcila L; MACHADO, Isabel C. Wind pollination and propagule formation in *Rhizophora mangle* L.(Rhizophoraceae): resource or pollination limitation? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 86, n. 1, p. 229–238, 2014.

NABEELAH BIBI, Sadeer et al. Ethnopharmacology, phytochemistry, and global distribution of mangroves—A comprehensive review. **Marine drugs**, v. 17, n. 4, p. 231, 2019.

NEAMSUVAN, Oratai et al. A survey of medicinal plants in mangrove and beach forests from sating Phra Peninsula, Songkhla Province, Thailand. **J Med Plants Res**, v. 6, n. 12, p. 2421-37, 2012.

OLIVEIRA, G. L. **Etnobotânica nordestina: plantas medicinais da comunidade Muribeca (Jaboatão dos Guararapes–PE, Brasil). 2007**. 2007. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado)—Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PANITZ, C. M. N. et al. Lagoas costeiras, manguezais, marismas, dunas e restingas. **Diagnóstico ambiental oceânico e costeiro das regiões sul e sudeste do Brasil**, v.7, p. 128-97, 1994.

RODRIGUEZ PERDOMO, Yanet; CURBELO HERNANDEZ, Caridad. Leaching kinetics of the red mangrove bark in water. **Rev Cubana Farm**, v. 46, n. 1, p. 80-86, 2012. Disponível em <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152012000100010&lng=es&nrm=iso>

PERERA, Luz María Sánchez et al. Further Pharmacological Evidence Supporting the Development of an Antiulcerogenic Drug Based on *Rhizophora mangle* L. Aqueous Extract HPLC Method Proposed for Determinating a Chemical Marker. **OALib**, v. 03, n. 01, p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://www.oalib.com/paper/pdf/3146589>>.

PÉREZ-PORTERO, Yalina et al. Plantas Antidermatofíticas, Utilizadas en Comunidades Costeras del Municipio Guamá, Santiago de Cuba. **Etnobiología**, v. 7, n. 1, p. 56–62, 2015.

PIOLOTO FERRER, Janet et al. Search of new Antimitotics compounds from the Cuban flora. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y**

Aromaticas, v. 10, n. 1, p. 75–82, 2011. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79951475564&partnerID=40&md5=ca634e128822157e804555d9fba087a0>>.

POLIDORO, Beth A. et al. The loss of species: mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10095, 2010.

PRABHU, V. Vinod; GURUVAYOORAPPAN, C. Evaluation of immunostimulant activity and chemoprotective effect of mangrove *Rhizophora apiculata* against cyclophosphamide induced toxicity in BALB/c mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 34, n. 4, p. 608–615, 2012.

PRANCE, Ghilleen T. et al. Revisão taxonômica das espécies amazônicas de Rhizophoraceae. **Acta Amazonica**, v. 5, n. 1, p. 5-22, 1975.

PRITCHARD, Donald W. What is an Estuary: Physical Viewpoint. **The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas**, p. 306–324, 1967. Disponível em: <<http://books.google.se/books?id=Hc3MpWAACAAJ>>.

RAHIM, Afidah A. et al. Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. **Food chemistry**, v. 107, n. 1, p. 200-207, 2008.

RANGEL-RUIZ, Luis José et al. Toxicological evaluation of three methods of applying *Rhizophora mangle* on *Galba cubensis* (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae). **Ecosistemas y Recursos Agropecuarios**, v. 3, n. 2016, p. 3–7, 2016.

REGALADO, Ada; SÁNCHEZ, Luz M.; MANCEBO, Betty. *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2016. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=496053933001>>.

REZVANINEJAD, Razihsadat et al. Herbal Medicine in Treatment of Recurrent Aphthous Stomatitis: A Literature Review. **Journal of Islamic Dental Association of Iran**, v. 29, n. 3, p. 127–134, 2017. Disponível em: <<http://jidai.ir/article-1-1928-en.html>>. Acesso em: 1 ago. 2018.

RIVERO, Vilma Kenia Fondén et al. Eficacia de la crema de *Rhizophora mangle* l al 50% en el tratamiento local de las quemaduras dérmicas AB. **Multimed**, v. 19, n. 2, 2015.

RODRIGUES-NETO, Ageu A. et al . Evaluation of embryotoxic and embryostatic effects of the aqueous extract of *Rhizophora mangle* and tannic acid on eggs and larvae of *Aedes aegypti*. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro , v. 90, n. 2, supl. 1, p. 2141-2148, 2018 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652018000502141 &lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 08 Julho 2020.

RODRIGUEZ, Humberto Gonzalez *et al.* Comparative Morphology and Anatomy of Few Mangrove Species in Sundarbans, West Bengal, India and its Adaptation to Saline Habitat. **International Journal of Bio-Resource and Stress Management**, v. 3, n. 85, p. 1–17, 2012.

SANTOS, Gideão Costa et al. Fitossociologia e práticas de manejo tradicional em uma floresta de várzea em Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 57, n. 2, p. 138–145, 2014.

SARAVANAN, D.; RADHAKRISHNAN, M. Antimicrobial activity of mangrove leaves against drug resistant pathogens. **International Journal of PharmTech Research**, v. 9, n. 1, p. 141–146, 2016.

SCHAEFFER-NOVELLI, Yara. Grupo de ecossistemas: manguezal, marisma e apicum. **São Paulo**: ANP, 1999.

SCHWARZBACH, A. E. Rhizophoraceae. In: **Flowering Plants. Eudicots**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. p. 283-295.

SELVARAJ, Gurudeeban; KALIAMURTHI, Satyavani; THIRUGNASAMBANDAN, Ramanathan. Effect of Glycosin alkaloid from *Rhizophora apiculata* in non-insulin dependent diabetic rats and its mechanism of action: In vivo and in silico studies. **Phytomedicine**, v. 23, n. 6, p. 632–640, 2016.

SATHE, Sanjay S.; LAVATE, Rajendra A.; PATIL, Sandeep B. Ethnobotanical and medicinal aspects of mangroves from southern Kokan (Maharashtra). **International Journal of Emerging Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 11-17, 2014.

STEINKE, Trevor Desmond. Mangroves in South African estuaries. **Estuaries of South Africa**, p. 119-140, 1999.

THAMAN, Randolph R. Batiri kei Baravi: The ethnobotany of Pacific Island coastal plants. **Atoll research bulletin**, 1992.

TOMLINSON, Philip Barry. **The Botany of Mangroves**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

TRINH, Binh T.D.; STAERK, Dan; JÄGER, Anna K. Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 189–195, 2016.

VAN DER STOCKEN, Tom et al. Global-scale dispersal and connectivity in mangroves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 3, p. 915-922, 2019.

ZHANG, Liang-Liang et al. Condensed tannins from mangrove species *Kandelia candel* and *Rhizophora mangle* and their antioxidant activity. **Molecules**, v. 15, n. 1, p. 420–431, 2010.

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A RESEX Acaú-Goiana (7° 32' 49.2" S - 34° 54' 14.4" W, altitude máx.: 13 m) (**Figura 2**) está localizada em Goiana (54,55% da área) do município do estado de Pernambuco e em Caaporã (9,15% da área) e Pitimbu (1,72% da área) municípios do estado da Paraíba, no nordeste do Brasil. A área apresenta aproximadamente 6.678,00 hectares de Mata Atlântica Ombrófila Densa em diversas etapas de preservação nas áreas de limites com os canaviais e uma extensa área de manguezal, entrecortada por manchas de Apicum nos estuários. O relevo da área é conhecido compõe o Tabuleiro Costeiro, apesar deste ter altitudes médias 50-100 metros, nossa área de estudo não atingiu essa elevação. O desenho do solo desta área caracteriza-se de plano a ondulado, platôs de origem sedimentar, com entalhe que varia, ora com vales estreitos e encostas abruptas, ora abertos com encostas suaves e fundos com amplas várzeas. De maneira geral, podem-se destacar a ocorrência de Latossolos, Podzólicos e Areias Quartzosas. A hidrologia da RESEX é composta por dois rios, Rio Goiana e Rio Megaó. O clima local é tropical úmido do tipo As', com o verão quente e seco e um inverno chuvoso, segundo a classificação climática de Köppen (1948). A pluviosidade média anual é de aproximadamente 935,8mm para Goiana/Pernambuco e Acaú (Pitimbu) 1.979,3 mm. O material botânico foi coletado em quatro viagens de campo entre os meses de Julho/2018 e Outubro/2018.a ocorrência de Latossolos, Podzólicos e Areias Quartzosas. A hidrologia da RESEX é composta por dois rios, Rio Goiana e Rio Megaó. O clima local é tropical úmido do tipo As', com o verão quente e seco e um inverno chuvoso, segundo a classificação climática de Köppen (1948). A pluviosidade média anual é de aproximadamente 935,8mm para Goiana/Pernambuco e Acaú (Pitimbu) 1.979,3 mm. O material botânico foi coletado em quatro viagens de campo entre os meses de Julho/2018 e Outubro/2018.

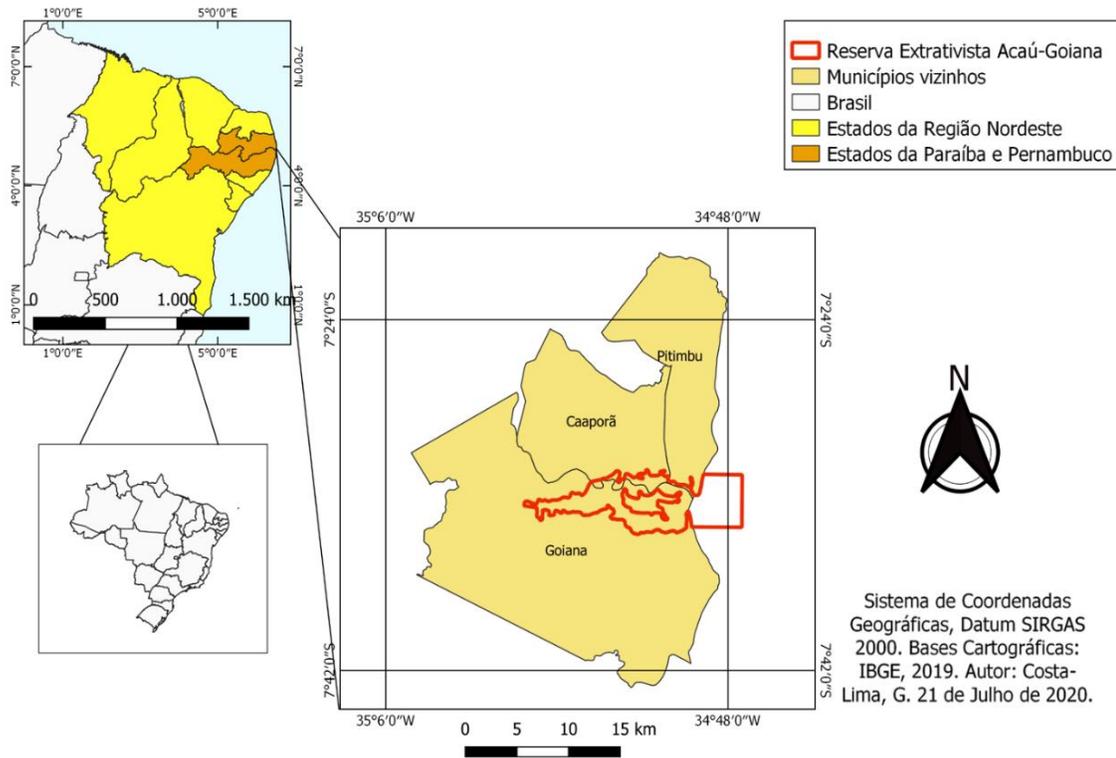


Figura 2 - Mapa da RESEX Acaú-Goiana.



Figura 3 - Um representante de *Rhizophora mangle* ao centro da imagem. Observação © juanflore · Alguns direitos reservados. <https://www.inaturalist.org/observations/>



Figura 4 - Destaque do propágulo da *Rhizophora mangle* © Marco Hidalgo Chaverri · todos os direitos reservados. <https://www.inaturalist.org/observations/23665532>



Figura 5 - Exsicata depositada no Herbário-UFP (número de tombamento 85.148).

3.2 TRIAGEM E CONSERVAÇÃO DO MATERIAL

O material foi conservado em freezer à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ no laboratório de Avaliação, Recuperação e Restauração de Ecossistemas (ARREÁgua) do Depto. de Zoologia, CB - UFPE. Um exemplar foi reservado e depositado no Herbário UFP – Geraldo Mariz sob o número de tombamento 85.148 (**Figura 3**). Em seguida, os propágulos foram separados de acordo com estágio de desenvolvimento em relação planta: anexados e senescentes.



Figura 6 - Propágulos anexados triados em diferentes estágios de desenvolvimento.

3.3 SECAGEM DO MATERIAL

Após seleção, o material foi seco em estufa durante 3 dias a 60 °C. Após os a secagem os exemplares botânicos foram triturados em moinho de facas (tipo Willey TE 80) para obtenção de um pó de baixa granulometria.

3.4 EXTRAÇÃO METANÓLICA E SCREENING FITOQUÍMICO

3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato bruto foi obtido com a utilização de 3 g de um mix de propágulos com os dois estágios de desenvolvimentos (anexado e senescentes) e álcool metílico p.a. 100% (v/v) durante 30 min. O mesmo mix foi usado neste procedimento e na investigação de alcalóides. Após este período o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo. O extrato obtido foi destinado ensaios fitoquímicos e a testes de bioatividade.

O extrato foi submetido à técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), empregando-se sistemas de desenvolvimento e reveladores adequados (WAGNER; BLADT, 1996). Os testes foram desenvolvidos em presença ou ausência de

cumarinas, saponinas, alcaloides, flavonoides, triterpenos e taninos. A Tabela 1 descreve o procedimento cromatográfico utilizado.

Tabela 2 - Metabólitos e materiais utilizados para perfil fitoquímico do extrato de *R. mangle* L.

CLASSES	FASE MÓVEL	PROPORÇÃO	PADRÕES	REVELADORES
Cumarinas	Tolueno + Éter	50:50 v/v	Ácido cumárico	KOH 10 % – ETOH
Flavonóides	Acetato de Etila + Ácido Fórmico + Água	100:11:11:26 v/v	Quercetina	NEU
Triterpenos (esteróides)	Tolueno + Clorofórmio + Etanol	40:40:10 v/v	Lupeol	Liberman - Burchard
Taninos	Clorofórmio + Metanol + Água	65:30:5 v/v	Ácido Tânico	Cloreto férrico 1%

Fonte: WAGNER et al., 1996; DA SILVA; MIRANDA; DA CONCEIÇÃO, 2010.

Para os testes fitoquímicos foram utilizadas placa de cromatografia constituída por gel de sílica com dimensões 20 x 20 cm e 0,25 milímetros de espessura a fase estacionária será a CCD. O padrão correspondente a cada classe de metabólito foi aplicado no lado direito da placa (**Figura 7**).

Ao final do processo, as placas foram removidas da cuba cromatográfica e postas à temperatura ambiente na capela de fluxo laminar. Em seguida, os reveladores apropriados foram borrifados sobre as placas e estas submetidas ao UV quando necessário (**Figura 8**).



Figura 7 - Placas cromatográficas com os extratos na posição 1, 2, 3 e 4. (à esquerda) e com o padrão (à direita).

Ao final do processo, as placas foram removidas da cuba cromatográfica e postas à temperatura ambiente na capela de fluxo laminar. Em seguida, os reveladores apropriados foram borrifados sobre as placas e estas submetidas ao UV quando necessário (**Figura 8**).



Figura 8 - Processo de revelação cromatográfica com borrifamento e UV.

3.4.2 Identificação alcaloides e saponinas

Ao contrário dos demais constituintes, os alcaloides foram detectados por meio de reação de precipitação com o reagente Dragendoff (**Figura 9**). Caso haja a formação de precipitados insolúveis será indicada a presença de alcaloides na espécie vegetal (HONDA et al., 1990), com modificações. Como padrão positivo foi utilizado escopolamina.

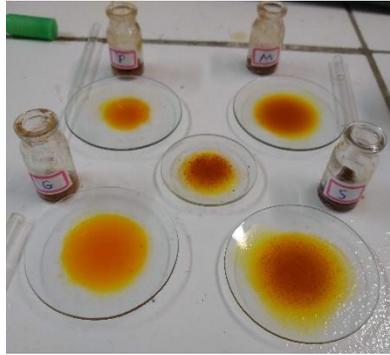


Figura 9 - Procedimento para detecção de alcalóides nos extratos.

Para verificar a presença de saponinas foi aplicado o teste de formação de espuma (OKENIYI et al., 2018). A triagem fitoquímica foi iniciada com a mistura minuciosa de 2 g do material vegetal triturado anexado e senescente em água destilada para completar a solução obtida para 20 ml. Foi, então, fervido em banho maria 4 ml do extrato *R. mangle L.* solução de extrato de folhas com água destilada em partes iguais em banho-maria, seguido de filtragem e agitação vigorosa do filtrado para formação de espuma persistente estável, que foi então misturada com 3 gotas de azeite antes de agitar vigorosamente novamente para observar a formação de emulsão. A formação de um “halo” persistente de espuma é indicativa da presença de saponinas (**Figura 10**).



Figura 10 - a) Realização da pesquisa de saponinas (extratos e padrão Juá no meio). b) Verificação de presença de saponinas com método de adição de azeite. c) Formação de emulsão presente notada no tubo da esquerda onde foi adicionado o extrato junto ao azeite, indicando saponinas.

3.4.4 Determinação dos Taninos e Fenóis totais

3.4.4.1 Preparação do padrão para o ácido tânico

Para o preparo da solução aquosa de ácido tânico 1,0 mg/mL foi necessário remover seis alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL e transferir em seguida individualmente para balões volumétricos de 100 mL com 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 10 mL de solução de carbonato de sódio, onde também foi adicionada água destilada para completar o volume. A solução foi mantida em repouso por 30 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 760 nm com o uso de cubeta de vidro. Após as diluições, as concentrações finais foram 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 µg/mL, respectivamente. Para a solução padrão foi utilizada água destilada (AMORIM et al.,2008).

3.4.4.2 Preparação do extrato

Na preparação do extrato vegetal foi pesado 500 mg da amostra da planta seca pulverizada e padronizada em seguida transferida para um balão volumétrico de 50 mL, posteriormente adicionou-se 25 mL de metanol 80% e a solução foi aquecida até ebulição leve por 30 min. A solução foi filtrada em um balão volumétrico de 50 mL. Para evitar perdas, o resíduo foi então lavado com 25 mL de metanol a 80%. O volume foi completado com 80% de metanol. O procedimento foi repetido até medições em triplicata (AMORIM et al., 2008).

3.4.4.3 Quantificação de fenol total

Para mensurar o teor de fenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu, transferindo-se 0,5 mL do extrato bruto para um balão volumétrico de 100 contendo 50 mL de água destilada, 5 mL do reagente de fenol Folin-Ciocalteu (solução aquosa 10% v/v) e 10 mL de solução aquosa de carbonato de sódio Para mensurar o teor de fenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu, transferindo-se 0,5 mL do extrato bruto para um balão volumétrico de 100 contendo 50 mL de água destilada, 5 mL do reagente de fenol Folin-Ciocalteu (solução aquosa 10% v/v) e 10 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5% m/v) onde também foi adicionada água destilada e mantida em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Em seguida, a

absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 760 nm em cubeta de vidro (AMORIM et al., 2008).

3.4.4.4 Quantificação de fenol residual

Para a quantificação de fenol residual foi pesado 1,0 g de caseína e transferido para um balão Erlenmeyer de 50 mL, com a adição de água para completar volume. Em seguida, a solução é mantida sob agitação mecânica em uma mesa de agitação por 3 h em temperatura ambiente e filtrada para um balão volumétrico de 25 mL. As alíquotas foram removidas da amostra filtrada e transferidas para um balão volumétrico de 100 mL. As alíquotas foram posteriormente analisadas no espectrofotômetro repetindo-se o protocolo descrito para quantificação de fenol total (AMORIM et al., 2008).

3.4.4.5 Determinação dos níveis de tanino

O teor de taninos totais foi determinado pelo método de precipitação de caseína, adicionado, em um Erlenmeyer de 50 mL, um grama de caseína em pó, 6 mL de extrato vegetal e 12 mL de água destilada. A solução foi mantida sob agitação mecânica constante em mesa agitadora por três horas em temperatura ambiente e filtrado para balão de 25 mL e completado com água destilada. Alíquotas de 3,0 mL foram removidas dessa solução para um balão de 100 mL e os fenóis residuais determinados pelo método Folin-Ciocalteu. A quantidade de taninos totais correspondeu à diferença entre o valor de fenol total e residual.

As amostras foram analisadas em triplicatas e tanto os valores de fenóis como de taninos foram expressos em miligramas por grama de matéria seca (mg/g) (MONTEIRO et al., 2005b; MONTEIRO et al., 2006; ARAÚJO et al., 2008; AMORIM et al., 2008).

3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.5.1 Bioensaio de citotoxicidade com *Artemia salina*

3.5.1.1 Preparação do extrato aquoso para Bioensaio de citotoxicidade

Inicialmente 50 g do material vegetal triturado foi pesado, o volume de 500 mL de água destilada foi aferido com o auxílio de uma proveta e ambos foram vertidos em um béquer de vidro de 1000 mL. Posteriormente, cobertos com um papel filme para

evitar evaporação e deixados por 30min em um agitador magnético a uma temperatura de 85°C.

Após o período de decocção (**Figura 11**) o material foi filtrado o por meio de papel de filtro qualitativo com porosidade de 3 µm, para então o EAP ser submetido a secagem no liofilizador.

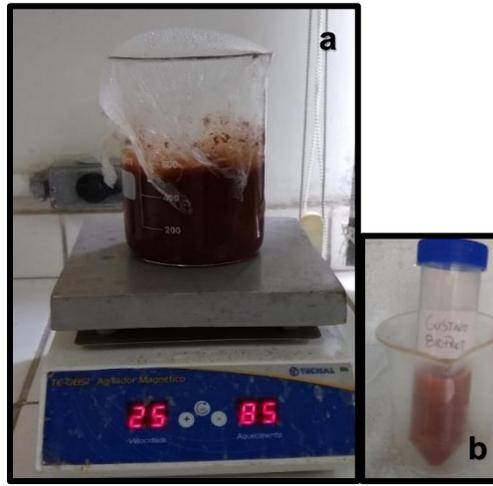


Figura 11 - Preparação do EAP *R. mangle*. a) aquecimento e agitação mecânica. b) material pós liofilização.

3.5.1.2 Preparação do extrato etanólico para Bioensaio de citotoxicidade

Na metodologia adaptada de Howlader et al. (2013) cerca de 100 g do material vegetal triturado dos propágulos pequenos e 300 g dos senescentes foram depositados separadamente em recipientes de vidro de fundo plano e embebidos em etanol 80%, o primeiro com cerca de 234 ml e o segundo com 700 ml (0,42 g/mL). Os recipientes com o seu conteúdo foram hermeticamente fechados e mantidos por um período de 40 dias em agitação ocasional.

As duas misturas foram então centrifugadas (**Figura 12a**) por 5 min sob força 2540 g na centrífuga FANEM Excelsa II. Em seguida o EEP foi filtrado através de papel de filtro qualitativo UNIFIL 15 cm C40 Faixa Branca. Os dois tratamentos filtrado assim obtido foram evaporados num evaporador rotativo (**Figura 12b**) à 32 rpm sob 85 °C até se tornar uma massa pastosa de cor preta avermelhada. Em seguida, a massa foi

deixada em banho maria por cerca de 24h horas até que todos os resquícios alcoólicos não fossem mais percebidos. O rendimento total obtido foi de 30g (13.3%).

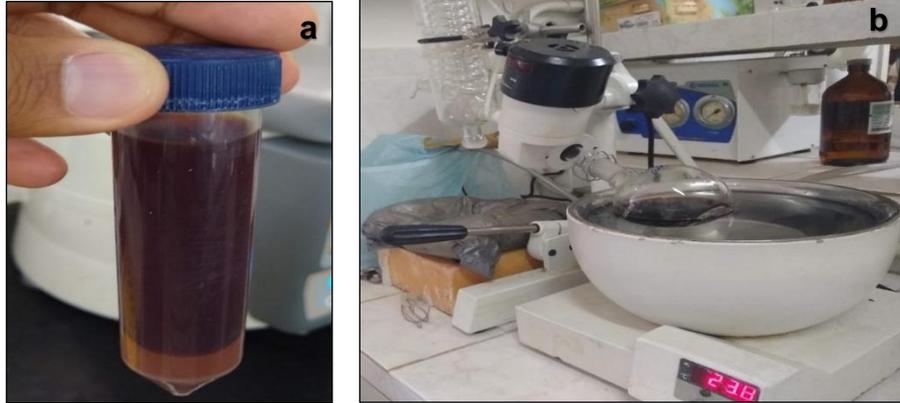


Figura 12 - Processamento do EEP *R. mangle*. a) EEP *R. mangle* após a centrifugação. b) EEP *R. mangle* sendo evaporado no evaporador rotativo.

3.5.1.3 Bioensaio

Este protocolo foi baseado na metodologia descrita por Meyer et al. 1982 com algumas adaptações. Cerca de 3.000 mg de cistos de *Artemia salina* foram eclodidos em água do mar artificial, uma solução de 1 L de água destilada e 40 g de mistura salina artificial (Natural Ocean), aeração contínua e iluminação fluorescente durante o período de 48 horas (**Figura 13a**). A temperatura foi aferida com auxílio de termômetro digital e mantida em condições ambientais e o pH foi controlado com a base NaOH 1% e fitas de colorimétricas até sua estabilização em uma faixa levemente alcalina.

Após a eclosão, foi observado a viabilidade dos metanúplios e estes foram colocados em tubos em grupos de dez durante 24 horas, sendo o mesmo protocolo realizado em triplicata. Então, 0,1 g do extrato liofilizado, foi pesado e dissolvido em 1 litro de água destilada para que fossem realizadas diluições até as concentrações 12,5, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e ofertada aos metanúplios de *A. salina* (**Figura 14b**).

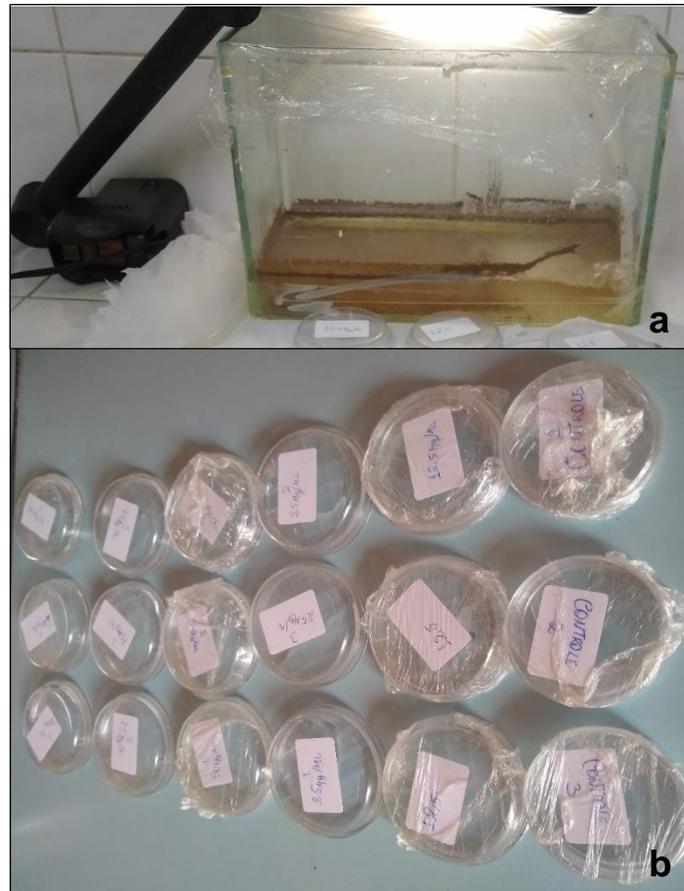


Figura 13 - Experimento *in vitro* com *Artemia salina*. a) Eclosão dos cistos. b) Placas com organismos e extrato durante experimento.

3.5.1.4 Análises estatísticas

A concentração letal mediana (CL50) do extrato aquoso dos propágulos *R. mangle* foi determinada através da tabela de Probit e do cálculo de regressão com o programa Excel 2016.

3.5.2 Protocolo de Fragilidade Osmótica

3.5.2.1 Preparação do Extrato aquoso

Este protocolo foi adaptado do trabalho de Malini et al. (2010) com *R. mangle*. Para preparar o EAP *R. mangle*, 30 g de casca de planta foram adicionados a 90 mL de água, onde a casca permanecerá imersa por 72 h. Após esse período, a solução foi filtrada, produzindo extrato bruto do propágulo de *R. mangle* na concentração aproximada de 12,30 g/L para o extrato de propágulos anexados e 15,82 g/L para o

extrato de propágulos senescentes. Extrato foi o mesmo utilizado para a atividade hemolítica.

3.5.2.2 Ensaio

A técnica de fragilidade osmótica seguiu os procedimentos metodológicos descritos por Dacie e Lewis (1975). Amostras de sangue de carneiro comercial foram adquiridas da empresa VisionMedica® (25 µL). Foi distribuído 5mL de solução salina NaCl 0,9% em 7 tubos. No tubo 0, foi adicionado 25 µL de sangue de carneiro e encubado por 30'. Os tubos seguintes, de 1 a 6 receberam as respectivas concentrações do extrato aquoso em análise: 50µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL, 500 µg/ mL, 750 µg/ mL, e 1000 µg/ mL. Em seguida, cada tubo recebeu 25 µL de sangue de carneiro e forma encubados por 30 minutos. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação a força de 3 500 G durante 15 minutos. (Figura 2). Em seguida, o sobrenadante foi lido no espectrofotômetro GeneQuant 1300 com comprimento de onda 540nm, para obter a absorbância resultante. Para determinar o percentual de hemólise o controle positivo o designado como 100%.

Para controle negativo utilizou-se solução isotônica de cloreto de sódio 0,9% e o controle positivo com água destilada, os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos empregados nas amostras testes. O ensaio foi realizado em duplicata.

3.5.2.3 Análises estatísticas

Para a conferir o grau de similaridade estatística entre os grupos anexado e senescentes foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) one-way seguido pelo teste *t* de Student não pareado, conforme exigido. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3.5.3 Protocolo de Genotoxicidade com *Allium cepa*

3.5.3.1 Preparação do extrato aquoso

Este protocolo foi adaptado do trabalho de Malini et al. (2010) com *R. mangle*. Para preparar o EAP *R. mangle*, 30 g do propágulo foram adicionados a 90 mL de água, onde permaneceu imerso por 72 h. Após esse período, a solução foi filtrada, produzindo extrato bruto do propágulo de *R. mangle* na concentração aproximada de

12,30 g/L para o extrato de propágulos anexados e 15,82 g/L para o extrato de propágulos senescentes. Extrato também foi o mesmo utilizado para a atividade hemolítica. As concentrações foram as seguintes, para o grupo anexado: 12,30 g/L, 6,15 g/L, 3,075 g/L, 1,517 g/L e 0,7687 g/L. Já para o grupo senescente: 15,82 g/L, 7,91 g/L, 3,955 g/L, 1,977 g/L, 0,9887 g/L.

3.5.3.2 Germinação de sementes de *Allium cepa*

Durante 10 dias a prior do protocolo propriamente dito, foi realizado um estudo de potencial de germinação com as sementes (Cebola Baia Periforme – 071 *Allium cepa*, ISLA®) provenientes de supermercado agrícola no subúrbio em Paulista, a serem usadas no ensaio. Para isso, 30 sementes foram deixadas germinar *in vitro*, armazenadas em placa de Petri e sob papel de filtro umedecido com 6 mL de água destilada, com temperatura controlada e água disponível e forma observados o potencial, tempo de germinação, e o tempo até que o comprimento da raiz atingisse aproximadamente 1 cm. Esse último dado é importante pois só assim a raiz estaria disponível para o protocolo. Aproximadamente 80% das sementes atingiram seu tamanho ideal de radículas com cerca de 10 dias de experimento.

Uma vez que os pesquisadores envolvidos no protocolo estavam de posse da biologia das sementes em questão, as mesmas foram postas para germinar. Desta forma, 1.260 sementes foram germinadas em ambiente controlado armazenadas em placa de Petri e sob papel de filtro umedecido com 6 mL de água destilada.

Parâmetros macroscópicos (tamanho da raiz e morfologia) e o índice mitótico foram levados em consideração para avaliação da toxicidade do extrato. As raízes foram fixadas e coradas para análise citológica.

3.5.3.2 Desenho experimental

Após a germinação as radículas das sementes atingiram aproximadamente 1 cm foram reservadas 7 (sete) sementes germinadas em 3 (três repetições) por cada concentração (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, controle negativo com água) de extrato (senescente e anexado). Assim, por tratamento/extrato foram testadas 21 sementes e por extrato foram no total utilizadas 126 sementes.

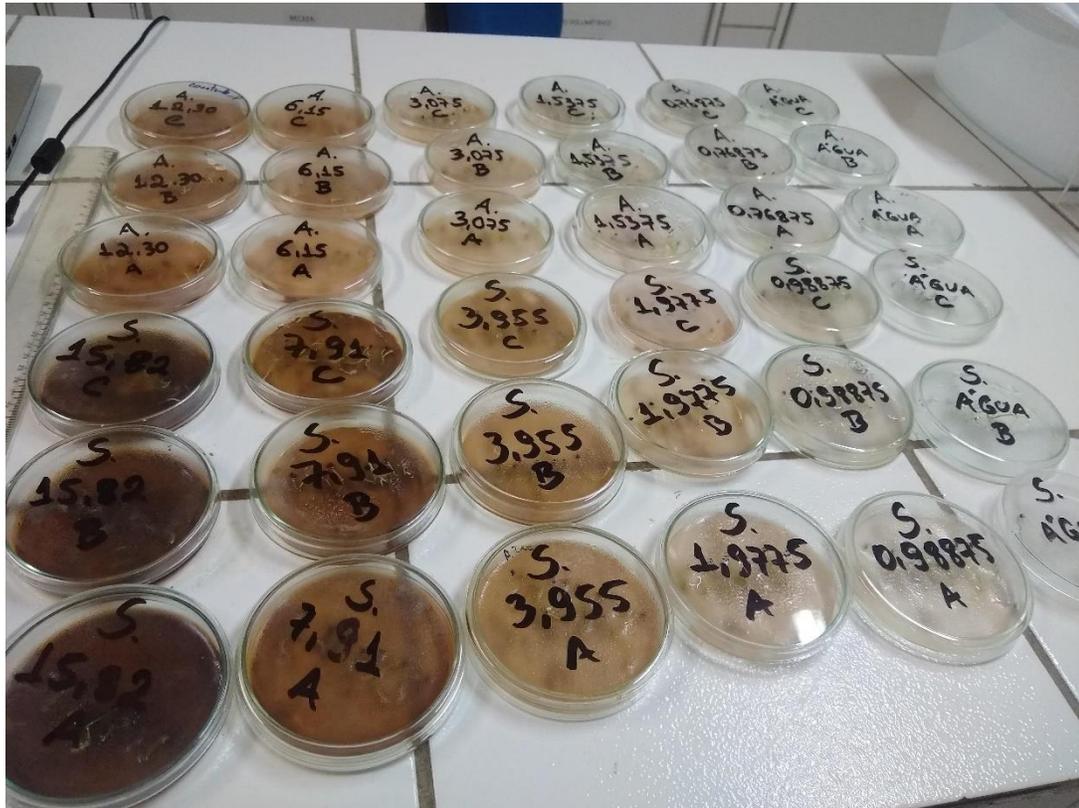


Figura 14 - Sementes imersas nas soluções de extrato e controle.

3.5.3.2 Análise da capacidade antiproliferativa

As radículas dos bulbos de cebolas foram coletadas e postas numa solução fixadora de álcool etílico/ácido acético na concentração de 3:1 por 24 horas. Após esse período, foram lavadas em água corrente, hidrolisadas com HCl a 45% por 10 minutos. Após a retirada do HCl, as amostras foram novamente lavadas e coradas com hematoxilina. Em seguida, as amostras foram transferidas para as lâminas, cortando-se a parte meristemática e empregada à técnica de esmagamento com utilização de

uma lamínula para finalização da preparação histológica. Foram preparadas em média 5 lâminas para cada tratamento e o controle negativo.

Para a avaliação da capacidade antiproliferativa do EAP em células meristemáticas das cebolas, foi utilizado o cálculo de índice mitótico (IM), que foi estabelecido pela relação entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas. Para o IM foi realizada a seguinte equação: $IM = NCM/NTC \times 100$, onde NCM corresponde ao número de células em mitose e NTC ao número total de células contabilizadas. A partir dos valores obtidos na equação acima, foi possível avaliar o potencial citotóxico das amostras, em inibir ou aumentar a proliferação celular.

3.5.3.3 Análise da genotoxicidade

Foram analisadas 1000 células de cada tratamento. As lâminas foram avaliadas observando-se as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, com auxílio de microscópio ótico com a objetiva de 100X. A contagem de anomalias cromossômicas não foi realizada nesta etapa, reservando-se para uma próxima fase. Posteriormente, foi realizada a captura de imagem usando a câmera acoplada ao Microscópio ótico.

3.5.4.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do programa R, versão 3.5.1, e expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram calculadas pela aplicação de uma análise de variância (ANOVA) one-way seguido pelo teste *t* de Student não pareado, conforme exigido. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SCREENING FITOQUÍMICO

Os resultados para os ensaios fitoquímicos são mostrados na Tabela 3. Os testes foram positivos para saponinas, flavonoides, taninos, fenóis e terpenos, sendo negativos para cumarinas e esteroides.

Tabela 3 - Análises fitoquímicas preliminares no extrato EMP *Rhizophora mangle*.

Número de análises	Testes	Natureza do Extrato usado	Natureza do Teste	Observações
1.	Teste para saponinas	Aquoso	Teste de manual (formação de halo)	+
2.	Teste para flavonoides	Metanólico	CCD	+
3.	Teste para taninos	Metanólico	CCD	+
4.	Detecção de cumarinas	Metanólico	CCD	-
5.	Detecção de fenóis	Metanólico	CCD	+
6.	Detecção de terpenos	Metanólico	CCD	+
7.	Detecção de esteroides	Metanólico	CCD	-

8.	Detecção de alcaloides	Metanólico	CCD	-
----	---------------------------	------------	-----	---

(+); Presença – (-); Ausência



Figura 15 - Placas cromatográficas com os extratos na posição 1, 2, 3 e 4. (à esquerda) e com o padrão (à direita).

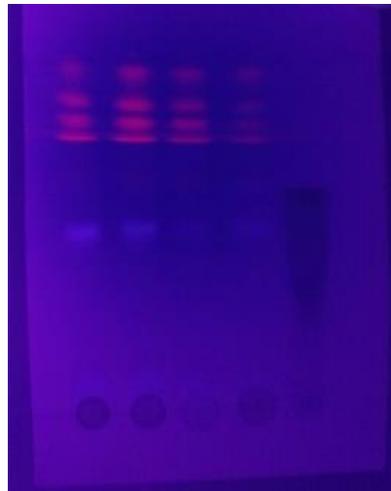


Figura 16 - Processo de revelação cromatográfica com borrifamento e UV.

De acordo com a literatura, espécies de *Rhizophora* possuem compostos secundários como alcaloides, flavonoides, taninos, fenóis e terpenos (BANDARANAYAKE, 2002; RAVIKUMAR et al., 2010; KANDIL et al., 2004; SELVARAJ, KALIAMURTHI; THIRUGNANASAMBANDAM, 2016; KUMARI et al., 2015; SUGANTHY; PANDIAN; DEVI, 2009), o que corrobora os resultados encontrados.

A ausência de saponinas, cumarinas e esteroides é comumente citada em outros trabalhos para representantes de *Rhizophora* (SELVARAJ; KALIAMURTHI; THIRUGNANASAMBANDAM, 2016; KUMARI et al., 2015). Apenas a presença de saponinas não é corroborada por esses estudos.

4.1.1 Taninos e Fenóis totais.

Os compostos fenólicos são doadores eficazes de hidrogênio, tornando-os bons antioxidantes (AMICÉ et al., 2003). Também é relatado que os taninos são 15 a 30 vezes mais eficazes na retirar peróxidos do que os fenóis simples (HAGERMAN et al., 1998). A curva padrão avaliada para Fenol Total e Fenol Residual revelou uma tendência dose-resposta, contudo a equação linear da reta foi pouco adequada a ambos os testes, representado por $R^2 < 0,900$ (**Figura 17 e 18**). A média do conteúdo de Fenóis Totais no material anexado foi de 0,045 mg/g e nos senescentes foi de 0,224 mg/g. Já, a média do conteúdo de Taninos Totais foi de 0,010 mg/g para o material anexado e 0,200 mg/g no senescente (**Tabela 4**).

Os fenóis e polifenóis são um dos maiores grupos de metabólitos secundários. Em *R. mangle* a porcentagem de taninos condensados extraíveis representa 21,9% do peso seco das folhas (ZHANG et al., 2010), e os taninos e outros compostos fenólicos representam 18% da matéria orgânica dissolvida (BENNER; WELIKY; HEDGES, 1990). No nosso trabalho, os resultados que mostraram que a quantidade de teores totais de taninos e fenóis diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os extratos das grupo anexado e do grupo senescente testadas.

A média do conteúdo de Fenóis Totais no material anexado foi de 0,045 mg/g e nos senescentes foi de 0,224 mg/g. Anova one-way $P=0,00851$.

Já, a média do conteúdo de Taninos Totais foi de 0,010 mg/g para o material anexado e 0,200 mg/g no senescente. Anova one-way $P= 0,007853$.

As concentrações de compostos secundários em vegetais sofrem variações de acordo com disponibilidades de alguns componentes, tais como: carbono, nitrogênio e fósforo (LAMBERS; CHANPIN III; PONS, 2008). E esses componentes podem sofrer

alterações nas suas concentrações ambientais de acordo com as estações do ano (ROCHA; THOMAZ, 2004).

Em termos gerais, os valores maiores no conteúdo tanino dos extratos senescentes quando comparados aos extratos anexados pode ser melhor entendido quando a luz do que falam (BHATLA; LAL, 2018) em seu livro. O que pode vir a ser entendido como uma estratégia contra herbivoria para suplantar os 4-7 meses até do hipocótilo (primórdios foliares) (ALLEN, 2002). No mesmo livro, eles enfatizam que déficit de nitrogênio pode levar a um aumento na produção de tanino e lignina, tornando a planta menos palatável para herbívoros (BHATLA; LAL, 2018; NEILSON et al., 1986).

Feller (1995), em seu estudo com herbivoria foliar em *R. mangle*, também aponta que a maior disponibilidade de fósforo no ambiente pode levar a maior produção de compostos fenólicos assim como taninos condensados. Apesar disso, na literatura científica há trabalhos com folhas de vegetais de manguezais que afirmam há um padrão decrescente no conteúdo de taninos dentro do grupo senescente, muito embora em alguns tratamentos do mesmo grupo as médias tenham tendido para um padrão de aumento. (HERNES et al., 2001; LIN et al., 2007). Os valores de taninos mais elevados estão contidos em folhas de *Rhizophora sp* recém caídas da árvore (LIN et al., 2010; ZHANG; LAANBROEK, 2018)

Os fenóis em *R. mangle* são ricos em diversidade e ação contra estresses bióticos, abióticos e bioquímicos internos (CLOSE; MACARTHUR, 2002). A sua sintetização e acúmulo nas árvores são associadas a ambientes de maior luminosidade, alta temperatura, alta salinidade e baixo nível de nutrientes, apontaram os autores em um trabalho com folhas de *R. mangle* (KADIL et al., 2004) Esses autores também informam que os eventos de síntese e acúmulo de fenóis ocorrem principalmente quando o consumo de carbono para crescimento ou reprodução é limitado pelo déficit nutricional (KADIL et al., 2004).

Lin et al. (2010) no seu estudo com folhas de *R. stylosa* também indicaram que há um padrão de decréscimo nos valores de compostos fenólicos de vegetais senescentes quando comparados aos tratamentos anexos. No mesmo trabalho, os pesquisadores

também indicaram que os valores de fenóis totais foram inversamente proporcionais as concentrações de nitrogênio e fósforo.

Tabela 4 - Valores obtidos em espectrofotômetro para conteúdo de compostos secundários no material vegetal estudado.

Valores Absolutos Fenol Total (mg/g)		
Repetição	Senescentes	Anexados
1	0,153	0,040
2	0,241	0,053
3	0,277	0,042
Média	0,224	0,045
Valores Absolutos Fenol Residual (mg/g)		
Repetição	Senescentes	Anexados
1	0,026	0,041
2	0,025	0,036
3	0,021	0,029
Média	0,024	0,035
Valores Absolutos Tanino Total (mg/g)		
Repetição	Senescentes	Anexados
1	0,127	-0,001
2	0,216	0,017
3	0,256	0,013
Média	0,200	0,010

Figura 17 - Curva padrão de calibração para a avaliação de Fenol Total.

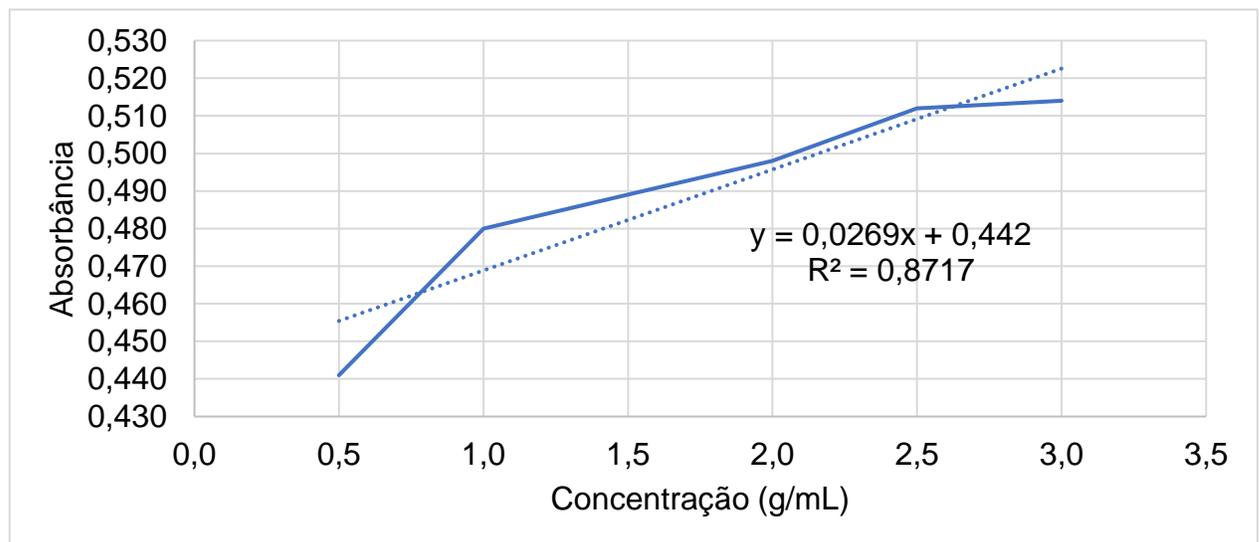
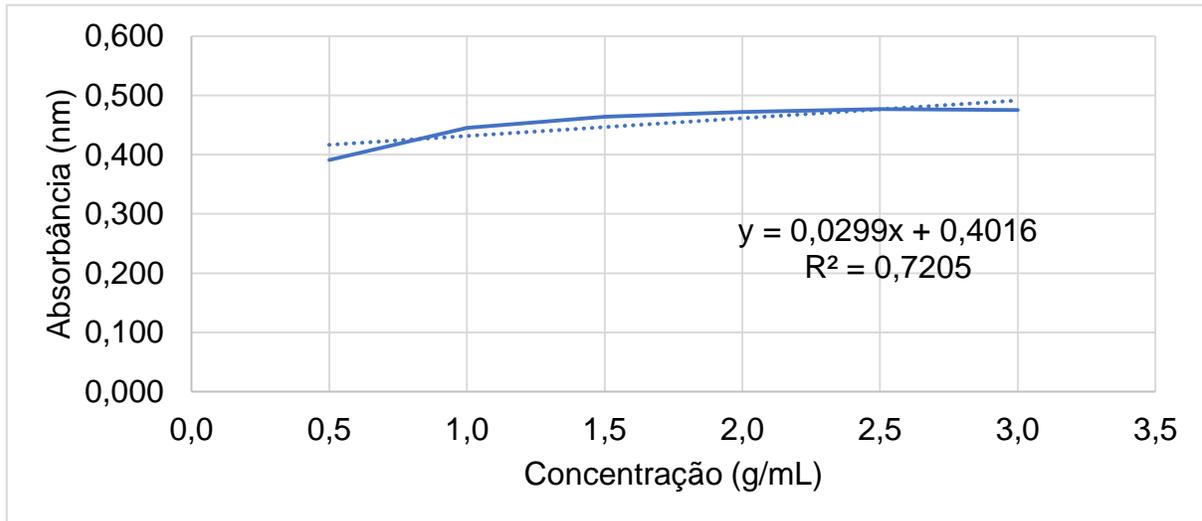


Figura 18 - Curva padrão de calibração para a avaliação de Fenol Residual



4.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.2.1 *Artemia salina*

O EAP *R. mangle* demonstraram valores de alta toxicidade ($LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$) para *Artemia salina*, com valores de LC_{50} em torno de $4,51 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$ (Tabela 5).

Tabela 5 - Tabelas com mortalidades dos náuplios de *Artemia salina*.

		Porcentagens de mortes em 24 horas						LC ₅₀ μg/ mL
[Extrato]	Controle	12,5 μg/mL	25 μg/mL	50 μg/mL	75 μg/mL	100 μg/mL	95% intervalo de confiança	
Mortalidade média	0	3,33	0	0	3,33	0	4,51 E-06 μg/ mL	

O número de larvas mortas não foi proporcional ao aumento das concentrações testadas. Ocorrendo uma mortalidade da ocasionais nas concentrações 12,5 e 75 μg/mL,

no entanto não houve mortalidade nas demais concentrações. Durante o experimento, no grupo controle todos indivíduos permaneceram incólumes.

O biensaio com *Artemia salina* é considerado um teste preliminar útil para identificar a toxicidade, assim como correlacionar citotoxicidade contra alguns tumores sólidos em humanos. Extratos vegetais com LC₅₀ abaixo de 1000 µg/mL são considerados bioativos e potencialmente tóxicos (DOS SANTOS JÚNIOR, 2010; ARCANJO et al., 2012; KARCHESY et al., 2016). O extrato apresentou uma LC₅₀ de 4,51 x 10⁻⁶ µg/mL, o que se qualifica como uma alta atividade e toxicidade para o extrato do propágulo. Rohmawati e Sutoyo, 2018 em seu estudo com *R. stylosa* afirmam que a presença de compostos fitoesteroides são altamente tóxicas para *A. salina*.

4.2.2 Fragilidade Osmótica

Houve diferença significativa entre os dois extratos a nível de significância 5%, anova one-way (P=0,00123). Sendo o extrato de propágulos senescente com maior ação hemolítica. O ensaio de fragilidade osmótica do extrato de *R. mangle*, nas condições testadas obtiveram baixas porcentagens da ação hemolítica, tais valores são inferiores aos, hemólise (**Figura 16**), considerando deve ser considerado alto quando superior a 40% e baixo quando 10% (NOFIANI; KURNIADI; ARDININGSIH, 2011; SILVA et al., 2017).

A maior concentração testada, 1.000 µg/mL, que não apresentou diferença estatística significativa (p < 0,001) em relação às demais concentrações. No entanto, a concentração 750 µg/mL demonstrou em ambas composições de extrato, anexado e senescente, o maior percentual de hemólise 4,0% e 10,9%, respectivamente. Assim, provavelmente, há pouco ou nenhum dano à membrana do eritrócito. A ação hemolítica dos diferentes compostos vegetais é atribuída a vários mecanismos inespecíficos, por exemplo, compostos surfactantes que produzem um efeito hemolítico solubilizando a membrana plasmática ou a lise osmótica, que promove alterações na permeabilidade dos glóbulos vermelhos (APARICIO et al., 2005), como as saponinas presentes na *Rhizophora mangle*. As saponinas exercem um efeito hemolítico resultante da

capacidade de interagir com os elementos da membrana celular dos glóbulos vermelhos, principalmente com o colesterol (SILVA et al., 2017)

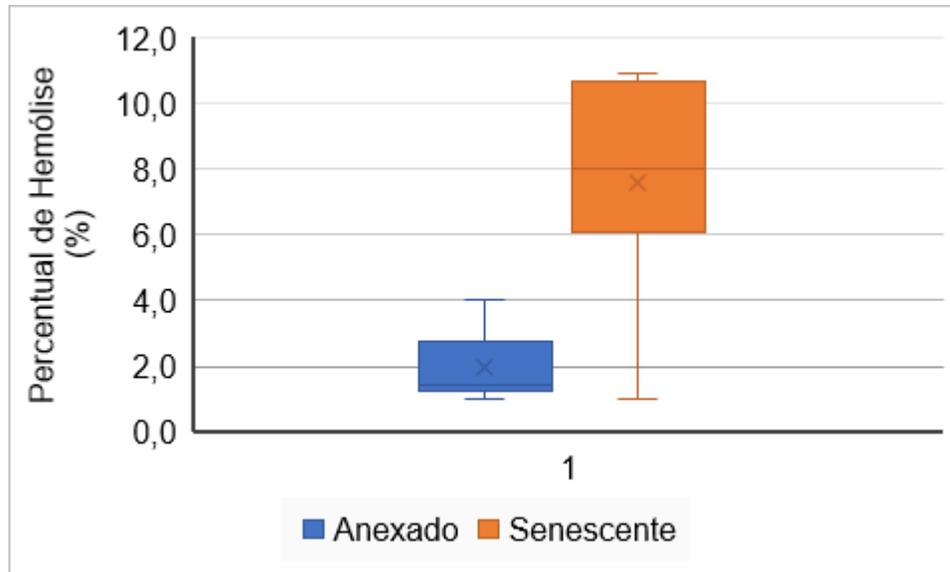


Figura 19 - Boxplot percentual de hemólise.

Tabela 6 - Valores de percentual de hemólise do material senescentes em concentrações crescentes.

Percentual de Hemólise (%)	Concentração (ug/ml)
1,0	0
1,4	50
1,3	100
1,4	250
2,0	500
4,0	750
2,7	1000

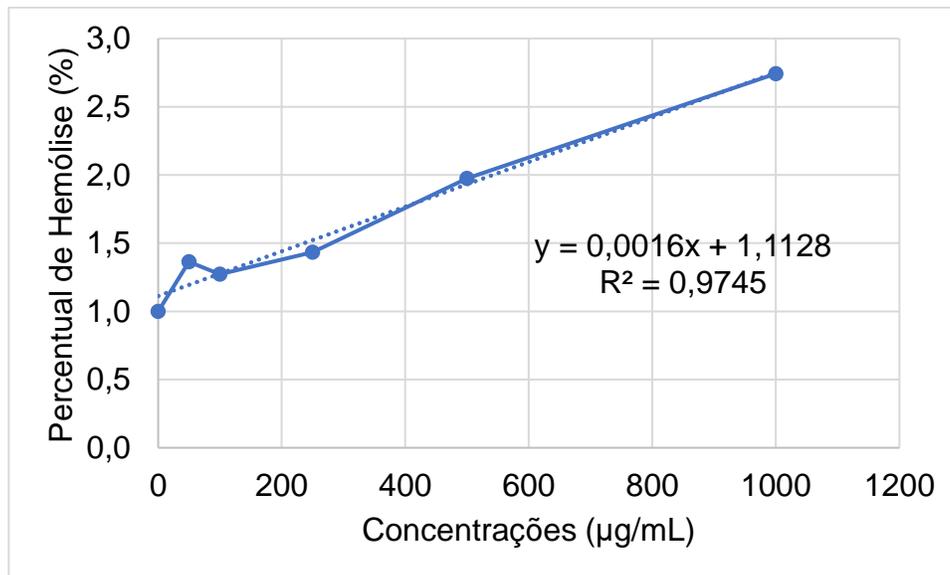


Figura 20 - Percentual hemolítico do extrato de propágulos anexados.

Tabela 7 - Valores de percentual de hemólise do material anexado em concentrações crescentes.

Percentual de Hemólise (%)	Concentração (ug/ml)
1,0	0
6,1	50
9,0	100
7,5	250
8,0	500
10,9	750
10,7	1000

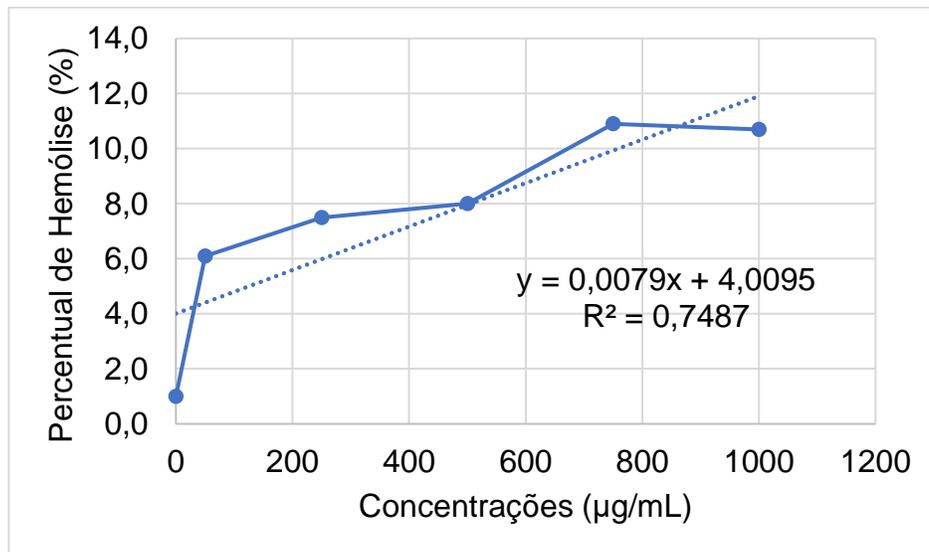


Figura 21 - Percentual hemolítico do extrato de propágulos senescentes.

4.2.3 Protocolo *Allium cepa*

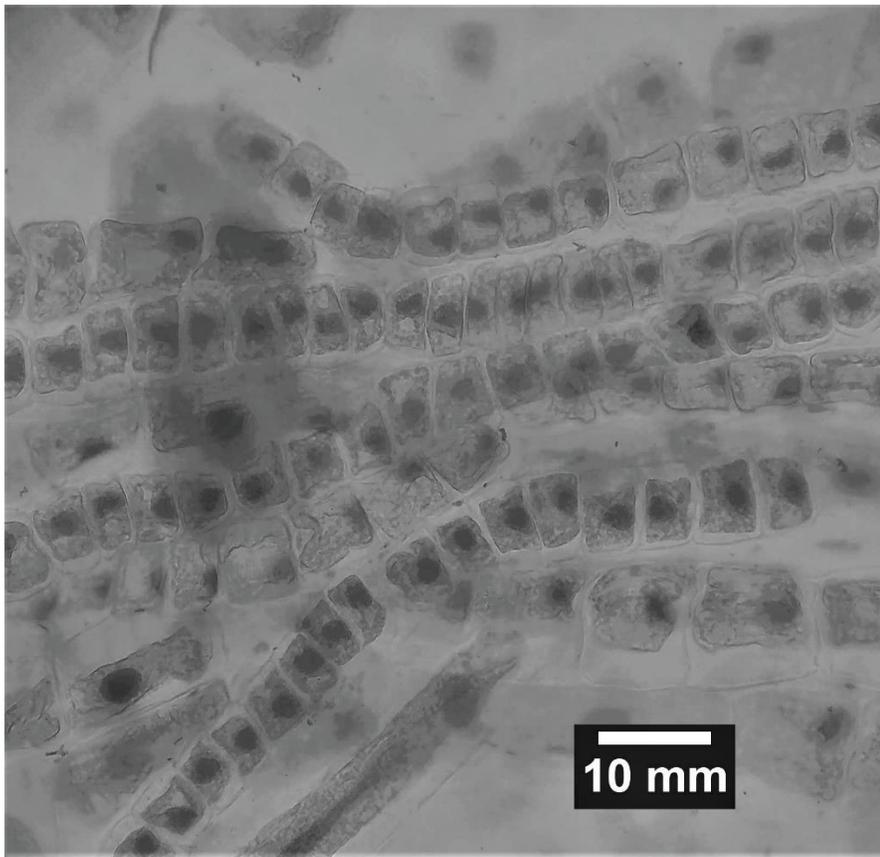


Figura 22 - Fotomicrografia 10x de células meristemáticas de raiz de cebola vista em microscópio óptico.

Tabela 8 - Valores médios da frequência dos índices mitóticos dos meristemas de *Allium cepa* submetidos a tratamento com diferentes concentrações do EAP *R. mangle* anexados.

Amostras	Índice Mitótico	Tamanho da radícula (cm)
Controle negativo	0	4,4256
A. 100%	17,4	2,9883
A. 50%	1,4	2,8953
A. 25%	3,5	3,2483
A. 12,5%	13,6	3,2483
A. 6,25%	6,2	3,9048

Tabela 9 - Valores médios da frequência dos índices mitóticos dos meristemas de *Allium cepa* submetidos a tratamento com diferentes concentrações do EAP *R. mangle* senescentes.

Amostras	Índice Mitótico	Tamanho da radícula (cm)
Controle negativo	0	4,8175
A. 100%	17,4	2,9176
A. 50%	1,4	3,3200
A. 25%	3,5	4,1037
A. 12,5%	13,6	3,8476
A. 6,25%	6,2	4,4998

A avaliação da toxicidade em *Allium cepa* revelou uma diminuição relação dose-dependente entre crescimento radicular e concentração do extrato, indicando que a toxicidade dos extratos é proporcional a um aumento na concentração do mesmo (Tabelas 6 e 7). Este parâmetro indicou que nas concentrações de 6,25% no extrato de propágulos anexados e 6,25% e 25% no extrato de propágulos senescentes são os mais adequados para uso em experimentos biológicos. Isso se dá pois as raízes verificadas nessas concentrações apresentaram crescimento próximo ao do controle negativo (MALINI et al., 2010).

Para análise de citotoxicidade, o índice mitótico das raízes de *A. cepa* foram avaliados (Tabelas 8 e 9). A observação (Figura 22) verificou que o número de células

apresentando divisão celular foi maior para o tratamento com a maior concentração, contrariando estudos prévios, que indicam que um ocorreu um maior desenvolvimento radicular resultante de divisão celular mitótica em condições normais. Após análise dos dois parâmetros avaliadas, toxicidade e citotoxicidade, a concentração de 12,5 % foi determinada como a fração que deve ser utilizado no desenvolvimento da mutagenicidade e antimutagenicidade estudos para ambos EAPs, anexados e senescentes (MALINI et al., 2010).

Correlação de Pearson entre índice mitótico e tamanho da radícula do EAP anexados indicou ínfima relação negativa (-0,12213598) e já correlação de Pearson entre índice mitótico e tamanho da radícula do EAP senescentes indicou relação positiva alta (0,808993).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos brutos do propágulo da *Rhizophora mangle* contém fitoconstituintes, como flavonoides, taninos, fenóis e terpenos, similares com outros trabalhos já relatados na literatura. Os fenóis totais e taninos totais dosados estavam em maior quantidade no grupo de extrato senescentes, o que é referenciado, em base dados acadêmicas, como conteúdo de propágulos recém despertos.

O EAP demonstrou atividade biológica e toxicidade elevada para os metanúplios de *Artemia salina* e baixo percentual de hemólise nos tratamentos anexado e senescente, contudo o último alcançou os níveis mais altos próximo ao limiar do percentual intermediário. Esses resultados indicam possibilidade de reteste para o Bioensaio com *A. salina*, uma vez que não foi possível observar com clareza um padrão dose-resposta. E alta percentual hemolítico do extrato senescente indica a presença maior de compostos com tal capacidade em seu conteúdo, como saponinas. Ou seja, os extratos são em termos gerais tóxicos.

Na atividade genotóxica com radículas de cebola, as raízes tenderam a obter maior crescimento quando em menor concentração do extrato. A concentração de 12,5% de EAP foi considerada ideal para experimentos genotóxicos com *Allium cepa*.

Portanto, uma vez que foi encontrada uma toxicidade elevada neste trabalho, recomenda-se o uso racional da espécie vegetal pelos populares, uma vez que se são usados na forma de macerados ou bebidos na forma de chás (COELHO-FERREIRA, 2009). É necessário a realização de diferentes testes toxicológicos e pré-clínicos para confirmar os aqui resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

ABDURAHMAN, Nour; NITTHIYA, J.; MANAL, S. Omer. The Potential of *Rhizophora mucronata* in Extracting the Chemical Composition and Biological Activities as Mangrove Plants: A Review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 4, p. 114-139, 2016

ALLEN, James A. *Rhizophora mangle* L. In: **Vozzo, J., ed. Tropical Tree Seed Manual: Part II, Species Descriptions. Agric. Handb. 712. Washington, DC: US Department of Agriculture: 690-692**, p. 690-692, 2002.

AMORIM, Elba L. C. et al. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.

APARICIO, Rosa M. et al. In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 39, n. 5, p. 1063-1067, 2005.

ARAÚJO, Thiago Antônio de Sousa et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.

ARCANJO, Daniel Dias Rufino et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

BANDARANAYAKE, Wickramasinghe M. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. **Wetlands ecology and management**, v. 10, n. 6, p. 421-452, 2002.

BENNER, Ronald; WELIKY, Karen; HEDGES, John I. Early diagenesis of mangrove leaves in a tropical estuary: molecular-level analyses of neutral sugars and lignin-derived phenols. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 54, n. 7, p. 1991-2001, 1990.

BHATLA, Satish C.; LAL, Manju A. **Plant physiology, development and metabolism**. Springer, 2018.

BLADT, Sabine. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 2009.

CARNEIRO, Diogo Borges; BARBOZA, Myrian Sá Leitão; MENEZES, Moirah Paula. Plantas nativas úteis na Vila dos Pescadores da Reserva Extrativista Marinha Caeté-Taperaçu, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1027–1033, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062010000400017&lng=pt&tlng=pt>.

CLOSE, Dugald C.; MCARTHUR, Clare. Rethinking the role of many plant phenolics—protection from photodamage not herbivores?. **Oikos**, v. 99, n. 1, p. 166–172, 2002.

COELHO-FERREIRA, Márlia. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159–175, 2009.

DA SILVA, Nádia Livia Amorim; MIRANDA, Francisco Alberto Alencar; DA CONCEIÇÃO, Gonçalo Mendes. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010.

DE JESUS, Neyres Zinia Taveira et al. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3203–3228, 2012.

DOS SANTOS JÚNIOR, Helvécio Martins et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 2, p. 231–238, 2010.

FELLER, Ilka C. Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). **Ecological monographs**, v. 65, n. 4, p. 477–505, 1995.

HERNES, Peter J. et al. Tannin diagenesis in mangrove leaves from a tropical estuary: a novel molecular approach. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 65, n. 18, p. 3109-3122, 2001.

HONDA, Neli Kika. et al. Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica. **Campo Grande–MS, EUFMS**, 1990.

HOWLADER, Md Sariful Islam et al. Antibacterial, cytotoxic, analgesic and diuretic activities of *Rhizophora mucronata* Lam. bark. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 4, n. 3, p. 229–232, 2013.

ICMBIO. **Atlas dos Manguezais do Brasil**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/manguezais/atlas_dos_manguezais_do_brasil.pdf>.

JUNCOSA, Adrian M.; TOMLINSON, Philip Barry. A Historical and Taxonomic Synopsis of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, n. 4, p. 1278–1295, 1988. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2399286>>.

KANDIL, F. E. et al. Polyphenolics in *Rhizophora mangle* L. leaves and their changes during leaf development and senescence. **Trees**, v. 18, n. 5, p. 518-528, 2004.

KARCHESY, Yvette M. et al. Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 510, 2016.

KUMARI, C. Sree et al. In vitro anti-inflammatory and anti-arthritic property of *Rhizophora mucronata* leaves. **Int J Pharma Sci Res**, v. 6, n. 3, p. 482-5, 2015.

LAMBERS, Hans; CHAPIN III, F. Stuart; PONS, Thijs L. **Plant physiological ecology**. Springer Science & Business Media, 2008.

LIN, Yi Ming et al. Tannins and nitrogen dynamics in mangrove leaves at different age and decay stages (Jiulong River Estuary, China). **Hydrobiologia**, v. 583, n. 1, p. 285-295, 2007.

LIN, Yi-Ming et al. Nutrient conservation strategies of a mangrove species *Rhizophora stylosa* under nutrient limitation. **Plant and soil**, v. 326, n. 1-2, p. 469-479, 2010.

MALINI, Maressa et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 176–181, 2010.

MEHVAR, Seyedabdolhossein et al. Quantifying Economic Value of Coastal Ecosystem Services: A Review. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 6, n. 1, p. 5, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2077-1312/6/1/5>>.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MONTEIRO, Julio Marcelino et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONTEIRO, Júlio M. et al. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 338-344, 2006.

NEILSON, M. J.; GIDDINS, R. L.; RICHARDS, G. N. Effect of tannins on the palatability of mangrove leaves to the tropical sesarminid crab *Neosarmatium smithi*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 34, p. 185-186, 1986.

NOFIANI, Risa; KURNIADI, Rio; ARDININGSIH, Puji. Antimicrobial, Antioxidant, Hemolytic Activities and Toxicity of Ethyl Acetate Extract From an Unidentified Coral-Associated Fungus, *Aspergillus brevipes* RK06. **Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention**, v. 2, n. 2, p. 212-216, 2011.

PERERA, Luz María Sánchez et al. Further Pharmacological Evidence Supporting the Development of an Antiulcerogenic Drug Based on *Rhizophora mangle* L. Aqueous Extract HPLC Method Proposed for Determinating a Chemical Marker. **OALib**, v. 03, n. 01, p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://www.oalib.com/paper/pdf/3146589>>.

OKENIYI, Joshua Olusegun et al. *Rhizophora mangle* L. leaf biochemical characterization: natural-green totalcorrosion inhibition prospect on concrete steel-reinforcement in 3.5% NaCl. **Jurnal Teknologi**, v. 80, n. 1, p. 11-21, 2018.

RAHIM, Afidah A. et al. Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. **Food chemistry**, v. 107, n. 1, p. 200-207, 2008.

RAVIKUMAR, S. et al. Antibacterial potential of chosen mangrove plants against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 94-99, 2010.

REGALADO, Ada; SÁNCHEZ, Luz M.; MANCEBO, Betty. *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2016. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=496053933001>>.

ROCHA, Renata Ribeiro de Araujo; THOMAZ, Sidinei Magela. Variação temporal de fatores limnológicos em ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná PR/MS–Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 3, p. 261-271, 2004.

ROHMAWATI, Dian; SUTOYO, Suyatno. Steroid Isolated from the Dichlorometane Extract of Matoa's Stem Bark (*Pometia pinnata*) and Toxicity Tests Against *Artemia salina* Leach. In: **Seminar Nasional Kimia-National Seminar on Chemistry (SNK 2018)**. Atlantis Press, 2018.

SANTOS, Gideão Costa et al. Fitossociologia e práticas de manejo tradicional em uma floresta de várzea em Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 57, n. 2, p. 138–145, 2014.

SELVARAJ, Gurudeeban; KALIAMURTHI, Satyavani; THIRUGNASAMBANDAN, Ramanathan. Effect of Glycosin alkaloid from *Rhizophora apiculata* in non-insulin dependent diabetic rats and its mechanism of action: In vivo and in silico studies. **Phytomedicine**, v. 23, n. 6, p. 632–640, 2016.

SILVA, Jéssica de Andrade Gomes et al. Assay on osmotic fragility and antioxidant potential of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* KUNTH (Euphorbiaceae). **Asian Journal of Computer Science and Information Technology**. 8. 6106 – 6109, 2017.

SUGANTHY, Natarajan; PANDIAN, Shanmugiahthevar Karutha; DEVI, Kasi Pandima. Cholinesterase inhibitory effects of *Rhizophora lamarckii*, *Avicennia officinalis*, *Sesuvium portulacastrum* and *Suaeda monica*: mangroves inhabiting an Indian coastal area (Vellar Estuary). **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 702-707, 2009.

ZHANG, Liang-Liang et al. Condensed tannins from mangrove species *Kandelia candel* and *Rhizophora mangle* and their antioxidant activity. **Molecules**, v. 15, n. 1, p. 420–431, 2010.

ZHANG, Qiu-Fang; LAANBROEK, Hendrikus J. The effects of condensed tannins derived from senescing *Rhizophora mangle* leaves on carbon, nitrogen and phosphorus mineralization in a *Distichlis spicata* salt marsh soil. **Plant and Soil**, v. 433, n. 1-2, p. 37-53, 2018.

ANEXO A — AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES CIENTÍFICAS DO ICMBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 62055-2	Data da Emissão: 10/06/2019 19:32:59	Data da Revalidação: 10/06/2020
De acordo com o art. 26 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		
Dados do titular		
Nome: Gustavo da Costa Lima	CPF: 089.974.474-59	
Título do Projeto: ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTINOCEPTIVA DO EXTRATO AQUOSO DE PROPÁGULOS DE <i>Rhizophora mangle</i> L.		
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE	CNPJ: 24.134.488/0001-08	

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Questionários socioeconômico com a população ribeirinha.	04/2018	12/2020

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exclui o pesquisador (titular ou membro de sua equipe) da necessidade de obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais, bem como do cumprimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possuidor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação, de acordo com o processo de regularização fundiária em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador (titular desta autorização) deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular desta autorização ou de seu representante, assim como os membros de sua equipe, quando da elaboração da legislação vigente, ou quando da sua depreciação, omissão ou falta de descrição de limitações e locais que estabeleceram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licenças suspensas ou revogadas pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, ou que especifica esta autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou agrícolas. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas no âmbito de atuação permitida.
5	As atividades de campo realizadas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, deverão obedecer aos procedimentos, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças litológicas da origem natural e outras propriedades físicas e químicas, obtidos por meio de recursos e técnicas que se desfaçam ao estado, a duração e a pesquisa, estudos e/ou a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licenças ou autorizações e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, e usando a morte ou danos significativos a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições naturais.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre o acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, a partir de amostras coletadas na zona econômica exclusiva, ou ao componente biológico associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/geg .

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Reserva Extrativista Acaú-Goiana	PE	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0620550220190610

Página 1/3

ANEXO B — CARTA DE ANUÊNCIA DA CHEFIA RESEX ACAÚ-GOIANA

07.01/2020

SEVICMbio - 5349286 - Declaração

02124.000764/2019-42
Número SEI:5349286

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
RESERVA EXTRATIVISTA ACAÚ-GOIANA
BR 230, KM 10, SN, - Cabedelo - CEP 58102-202

Telefone:

Declaração

Cabedelo, 08 de julho de 2019

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos o pesquisador GUSTAVO da COSTA LIMA, aluno de mestrado na Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, a desenvolver o seu projeto de pesquisa " Análise Fitoquímica e Atividade Antinociceptiva, do Extrato Etanólico de Propágulos de *Rhizophora mangle*. L., que está sob a orientação do Professor Dr. Gilberto Gonçalves Rodrigues.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do pesquisador aos requisitos da Resolução 466/12 CNS e suas complementares, comprometendo-se o mesmo a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Eclarecemos que esta autorização, emitida pelo ICMBio, enquanto órgão gestor de Unidades de Conservação Federal, não exime a necessidade de obtenção do consentimento das comunidades participantes da pesquisa.

MARISOL MENEZES PESSANHA

CHEFE da RESEX ACAU-GOIANA



Documento assinado eletronicamente por **Marisol Menezes Pessanha, Chefe**, em 08/07/2019, às 17:06, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.icmbio.gov.br/autenticidade> informando o código verificador **5349286** e o código CRC **F4461BAE**.

ANEXO C — CERTIDÃO 1 SISGEN PARA PESQUISA



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A426EFF

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A426EFF**
 Usuário: **Gustavo da Costa Lima**
 CPF/CNPJ: **089.974.474-59**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Rhizophora mangle

Título da Atividade: **Análise fitoquímica e atividade antinociceptiva do extrato etanólico de propágulos de Rhizophora mangle L.**

Equipe

Gustavo da Costa Lima **Universidade Federal de Pernambuco**
Gilberto Gonçalves Rodrigues **Universidade Federal de Pernambuco**

Data do Cadastro: **04/11/2018 23:21:10**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **20:46** de **10/06/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO D — CERTIDÃO 2 SISGEN PARA PESQUISA



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro n.º A207CEB

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto n.º 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A207CEB**
 Usuário: **Gustavo da Costa Lima**
 CPF/CNPJ: **009.974.474-59**
 Objeto do Acesso: **Conhecimento Tradicional Associado**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Rhizophora mangle

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO AQUOSO DE PROPÁGULOS DE Rhizophora mangle L.**

Equipe

Gustavo da Costa Lima **Universidade Federal de Pernambuco**
Gilberto Gonçalves Rodrigues **Universidade Federal de Pernambuco**

Data do Cadastro: **10/06/2019 20:38:46**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **12:23** de **07/04/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO E — AUTORIZAÇÃO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA (CEUA-UFPE)



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 13 de março de 2019

Ofício nº 08/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Gilberto Gonçalves Rodrigues**

Departamento de Zoologia

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.035726/2018-12

Certificamos que a proposta intitulada “Análise fitoquímica e atividade antinociceptiva do extrato etanólico de propágulos de *Rhizophora mangle* L.” registrada com o nº 23076.035726/2018-12, sob a responsabilidade de Prof. Gilberto Gonçalves Rodrigues que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/02/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março de 2019 a março de 2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	72
Peso/Idade	200-250g/8-12 semanas
Sexo	Macho (72)
Origem	Bioterio do Laboratorio de Cancerologia do Departamento de Antibioticos da UFPE.

Atenciosamente,


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691