



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - PPGCF

JHONATTA ALEXANDRE BRITO DIAS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA,
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE
Laguncularia racemosa (L) C. F. Gaert**

RECIFE
2022

JHONATTA ALEXANDRE BRITO DIAS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA,
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE
Laguncularia racemosa (L) C. F. Gaert**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

RECIFE
2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4: 1895

D541a Dias, Jhonatta Alexandre Brito.
 Avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana do extrato
 hidroalcoólico das folhas de *laguncularia racemosa* (L) c. F. Gaert / Jhonatta Alexandre
 Brito Dias – 2022.
 81 p.

 Orientadora: Ivone Antônia de Souza
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da
 Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2022.
 Inclui referências e apêndices.

 1. *Combretaceae*. 2. Inflamação. 3. Testes de toxicidade. 4. Plantas medicinais.
 Souza, Ivone Antônia de (orientadora). II. Título.

615 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2023 - 216)

JHONATTA ALEXANDRE BRITO DIAS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA,
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE
Laguncularia racemosa (L) C. F. Gaert**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Federal de Pernambuco como requisito
parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 18 / 11 / 2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ivone Antónia Souza
Examinadora interna– UFPE

Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti Amorim
Examinadora interna– UFPE

Prof^a. Dr^a. Cynthia Layse Ferreira de Almeida
Examinadora externa– UNIVASF

Prof^a. Dr^a. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo

Ximenes
Examinadora interna–UFPE

Prof. Dr. Ricardo Brandão
Examinador interno-UFPE

Profª. Drª. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo
Albuquerque
Suplente interna– UFPE

Profª. Drª. Jane Sheila Higinio
Examinadora Externa– UFPE

**Aos meus pais, Iza Maria Brito e Vanderley Freire Dias,
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter subido mais um degrau, por mais um sonho que se concretiza. Por sempre está presente comigo em todas as horas mesmo quando fraco ou triste. A Ele toda honra toda gloria e todo o poder. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais: Iza Maria Brito e Vanderley Freire Dias por todo amor, carinho, compreensão, educação, investimento apoio e incentivo nas mais diversas situações e devaneios enfrentados ao longo da minha vida e carreira profissional.

Aos meus irmãos Ayse Pricilla Brito Dias, Johnson Augusto Brito Dias e Moises Vidal Fernandes pelo companheirismo e cumplicidade.

À minha esposa Camyla Pires de Souza e meu Filho Davi Emanuel Pires Brito por me darem forças e motivos para caminhar e crescer e nunca desistir dos meus sonhos.

À minha tia Mércia Pereira de Brito por sempre está presente e me apoiar de maneira incondicional na busca e realizações dos meus sonhos e projetos e por sempre esta ao meu lado de tal forma que mesmo cansado e sem forças me encorajou a prosseguir que sempre acreditou e aguço o meu potencial.

A todos da minha família por acreditarem e confiarem na minha capacidade e me encorajarem a sempre seguir em frente independente dos obstáculos.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a. Ivone Antônia de Souza por ter me aceitado como orientando, pelo seu coração enorme e sempre disposto a ajudar, pelo seu sempre excelente trabalho desenvolvido no laboratório.

À minha coorientadora, Prof^a Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva por ter me mostrado e encaminhado a pesquisa científica, por seu excelente trabalho, bem como suas valiosíssimas orientações, conduzindo-me nos primeiros e essenciais passos da minha pós-graduação e vida profissional, amizade e exemplo de pessoa e

profissional.

Aos meus amigos Laís Nerys, Helimarcos Nunes, Cynthia Layse, Jéssica Andrade, Rayane Siquera, Alisson Oliveira, Bruno Iraquitan, Anne Cecília, Elizabeth Borba, Larissa Cardoso, Temístocles Ítalo, Caroline Soares, Pedro Paulo, Fernanda Aguiar, por fazerem parte da minha caminhada científica. Pelo carinho e incentivo que me fizeram durante esses dois anos percorridos.

A todos que fazem parte do Biofarmatox, Laboratório de Prospecção Farmacotocológicas de Produtos Bioativos e do Departamento de Antibióticos por toda prestatividade e contribuição para consolidação deste trabalho.

Aos secretários Nerilin Trajano da Silva Neto e Rilvan Guedes Pereira, todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo convívio e disponibilidade em atender minhas solicitações.

A cada professor que compõe o Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo tempo e ensinamentos destinados a minha formação.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (CNPq), pelo incentivo e apoio financeiro.

Imensamente e sinceros, muito obrigado!

**Que darei eu ao Senhor, por todos
os benefícios que me tem feito**

**Tomarei o cálice da salvação, e
invocarei o nome do Senhor.**

**Pagarei os meus votos ao Senhor,
agora, na presença de todo o seu
povo.**

RESUMO

A busca por produtos naturais com atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral é uma temática recorrente e que se tem grandes avanços na atualidade. *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn é uma espécie pertencente à família Combretaceae e que desempenha uma função ecológica relevante no ecossistema de manguezal e alguns estudos relatam sua atividade na interação e monitoramento biológico de alguns micro-organismos. Entretanto, essa espécie foi pouco estudada nos aspectos farmacológicos, toxicológicos e fitoquímicos, diferentemente de outros membros da mesma família que apresentaram atividades biológicas, tais como a antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antineoplásica. Diante dessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, e toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa* (EHA-Lr). A atividade antimicrobiana foi avaliada pela metodologia de microdiluição em caldo para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) frente às cepas *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* e o extrato foi mais ativo frente a cepa de *Micrococcus luteus* (0,93 mg). Foram realizados os ensaios para determinação da toxicidade aguda através da metodologia proposta pela OECD 2001 e para a avaliação da atividade anti-inflamatória do EHA-Lr através dos modelos de edema de pata induzido por carragenina e inflamação pulmonar aguda induzido por LPS. O teste de toxicidade, o extrato EHA-Lr demonstrou baixa toxicidade, sem alterações significativas no peso dos animais e órgãos e nos parâmetros bioquímicos e hematológicos; enquanto nos testes anti-inflamatórios o EHA-Lr mostrou-se eficaz na redução da migração leucocitária no modelo de edema de pata e no modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS. Conclui-se que o EHA-Lr apresentou atividades anti-inflamatória e antimicrobiana, com baixa toxicidade, o que o torna promissor para dar prosseguimento a novos estudos.

Palavras chave: combretaceae; inflamação; testes de toxicidade; plantas medicinais.

ABSTRACT

The search for natural products with antimicrobial, anti-inflammatory, and antitumor activities is a recurring theme that has made great advances today. *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn is a species belonging to the Combretaceae family that plays a relevant ecological role in the mangrove ecosystem and some studies report its activity in the interaction and biological monitoring of some microorganisms. However, this species was little studied in the pharmacological, toxicological, and phytochemical aspects, unlike other members of the same family that showed biological activities, such as antioxidant, antimicrobial, antifungal, and antineoplastic. Given this perspective, the present work aimed to evaluate the antimicrobial, anti-inflammatory, and toxicity of the hydroalcoholic extract of the leaves of *L. racemosa* (EHA-Lr). The antimicrobial activity was evaluated by the broth microdilution methodology to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus faecalis* strains, and the extract was more active against the strain of *Micrococcus luteus* (0.93 mg). Assays were performed to determine the acute toxicity through the methodology proposed by the OECD 2001 and to evaluate the anti-inflammatory activity of EHA-Lr through the models of paw edema induced by carrageenan and acute pulmonary inflammation induced by LPS. In the toxicity test, the EHA-Lr extract showed low toxicity, without significant changes in the weight of animals and organs and the biochemical and hematological parameters; while in anti-inflammatory tests, EHA-Lr was effective in reducing leukocyte migration in the paw edema model and the LPS-induced acute pulmonary inflammation model. It is concluded that EHA-Lr showed anti-inflammatory and antimicrobial activities, with low toxicity, which makes it promising to continue with further studies.

Keywords: combretaceae; inflammation; toxicity tests; medicinal plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo de migração dos leucócitos ao local de inflamação.....	19
Figura 2 – Características do processo inflamatório agudo (A) e crônico (B)	22
Figura 3 – Principais citocinas descritas e suas ações.....	25
Figura 4 – Folhas (A e B) de <i>L. racemosa</i> (L) C. F. Gaert e distribuição do vegetal no Brasil (C)	26
Figura 5 – Atividade antioxidante promovida pelo extrato hidroalcolico de <i>L. racemos</i> por métodos <i>in vitro</i> DPPH (A) e ABTS (B) em diferentes concentrações comparados aos padrões ácido ascórbico e hidroxitolueno butilado (BHT) respectivamente.....	43
Figura 6 – Efeito do extrato de EHA-Lr (50, 100 e 200mg/kg, v.o) e indometacina (10mg/kg, v.o) na formação de edema de pata em ratos	50
Figura 7 – Efeito do extrato EHA-Lr (50, 100 e 200 mg/kg, v.o) e dexametasona (0,5 vmg/kg,v.o) sobre a migração leucocitária na inflamação pulmonar aguda.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores de fenólicos, flavonoides, flavonóis e ácido tânico determinados por espectroscopia UV/Vis presentes no extrato hidroalcólico.....	42
Tabela 2 – Resultados de CE ₅₀ para o extrato hidroalcólico de <i>L. racemosa</i> e para os padrões ácido ascórbico e hidroxitolueno butilado (BHT) frente aos ensaios de DPPH e ABTS.....	44
Tabela 3 – Evolução ponderal e consumo de água e ração dos grupos controle e tratado com o extrato hidroalcólico das folhas de <i>Laguncularia racemosa</i> na toxicidade aguda na dose de 2.000mg/kg.....	47
Tabela 4 – Peso absoluto dos órgãos dos grupos controle e tratado com extrato hidroalcólico das folhas de <i>Laguncularia racemosa</i> na toxicidade aguda na dose de 2.000 mg/kg.....	48
Tabela 5 – Parâmetros hematológicos dos grupos controle e tratado com extrato hidroalcólico de <i>Laguncularia racemosa</i> na toxicidade aguda na dose de 2.000 mg/kg.....	49
Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos dos grupos controle e tratado com extrato hidroalcólico de <i>Laguncularia racemosa</i> na toxicidade aguda na dose de 2.000mg/kg.....	49
Tabela 7 – Determinação da concentração mínima inibitória do EHA-Lr frente as cepas bacterianas testadas.....	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO	18
2.2	INFLAMAÇÃO AGUDA	19
2.3	INFLAMAÇÃO CRÔNICA	20
2.4	RESPOSTA IMUNE E INFLAMAÇÃO	22
2.2.1	Citocinas	23
2.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Laguncularia racemosa</i>	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	METODOLOGIA	31
4.1	SUBSTÂNCIAS E REAGENTES	32
4.2	EQUIPAMENTOS	32
4.3	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	32
4.3.1	Procedimentos éticos	33
4.4	COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS	33
4.5	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO HIDROÁLCOOLICO	34
4.5.1	Determinação do conteúdo fenólico total	34
4.5.2	Determinação do teor total de taninos	34
4.5.3	Determinação do teor total de flavonóis	35
4.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	35
4.6.1	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método DPPH	35
4.6.2	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método ABTS	36
4.6.3	Determinação do CE ₅₀	36
4.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	36
4.8	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	37
4.8.1	Edema de pata induzido por carragenina em camundongos	38
4.8.2	Inflamação pulmonar aguda induzida por LPS	38
4.9	AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA	38
4.9.1	Concentração mínima inibitória (CIM)	38

4.10	ANÁLISE DOS DADOS	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	RENDIMENTO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL POR ESPECTROSCOPIA DE UV/VISÍVEL	42
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	42
5.3	TOXICIDADE AGUDA	45
5.4	EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	50
5.5	INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS	52
5.6	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)	54
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A – Publicação oriunda do trabalho: <i>International Research of Advanced Engineering and Science</i>. Fator de Impacto 7.32.....	67

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais atualmente se constitui numa alternativa viável para a cura de diversas doenças, principalmente pela facilidade e baixo custo para o acesso pela população. Por isso, é um recurso que vem sendo cada vez mais valorizado (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018; SHARMA et al., 2017).

As plantas medicinais são utilizadas para combater diferentes doenças desde os primeiros registros da civilização humana. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento enfrenta dificuldades para adquirir medicamentos sintéticos e faz uso de medicamentos tradicionais, sobretudo os de origem vegetal, para suprir suas necessidades básicas de saúde (SULTANA et al., 2015; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

Através do desenvolvimento da pesquisa na área de produtos naturais, várias atividades biológicas foram sendo sistemática e largamente estudadas utilizando material botânico como principal matéria-prima, tais como a antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, gastroprotetora, ansiolíticas e, mais recentemente, a antineoplásica (AL-ANSARI et al., 2019; GONULALAN et al., 2019; RTIBI et al., 2015; SHARMA et al., 2017; SIEW et al., 2019).

Nesse intuito, diversas famílias botânicas vêm sendo estudadas buscando a determinação de propriedades medicinais ou visando à prospecção de compostos bioativos (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018). No Brasil são estudadas plantas de praticamente todos os ecossistemas, desde a Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga até o Mangue, o qual ainda é pouco explorado (LIPORACCI, 2014; BARTZ et al., 2015).

Nos manguezais brasileiros ocorrem quatro espécies (*Rhizophora mangle* L. – *Rhizophoraceae*, *Avicennia schaeuriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke e *Avicenniagerminans* (L.) Stearn – *Acanthaceae*, e *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn. – *Combretaceae*). Esta última é conhecida popularmente como mangue-branco, manso ou tinteira. Ela é de abrangência global, com maior presença na América do Norte e do Sul, e no geral, desempenha grande importância para o ecossistema onde habita (NETO et al, 2015; SILVA, 2012).

Nesse sentido, *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn foi alvo de diversos estudos envolvendo sua interação no ecossistema manguezal, em termos de

monitoramento de poluição e em estudos de interação com alguns microrganismos, entretanto estudos farmacológicos e fitoquímicos com essa espécie são escassos (DE FREITAS GUEDES et al., 2018; REINERT et al., 2016; SODRÉ et al., 2013).

Alguns estudos farmacológicos indicam que *L. racemosa* apresenta potencial atividade moluscida (MENDES et al, 2018), antioxidante (XUE et al, 2008) e inibição da PLA2 e outras vias da cascata da inflamação (PINHO et al, 2014). E um estudo fitoquímico revelou nessa planta a presença de alguns compostos, como taninos e flavonoides, com possível atividade antioxidante e inibidores de proteínas quinase (PINHO, 2014).

A literatura mostra que outras espécies representantes da família Combretaceae apresentaram atividades antimicrobiana, antioxidante e anticâncer, fato que revela uma enorme potencialidade para a investigação mais aprofundada da *L. racemosa*, considerando que os fatores quimiotaxonômicos determinam que espécies de uma mesma família podem possuir semelhanças na constituição fitoquímica e, por conseguinte, nas atividades biológicas (KATERERE et al., 2012; RAJABPOUR et al., 2019; SANTOS et al, 2018; SIMÕES et al., 2017).

Tendo em vista essas possíveis atividades biológicas e diante do alto custo, das limitações terapêuticas e dos efeitos colaterais evidenciados com os fármacos empregados atualmente para o tratamento de patologias de cunho inflamatório, microbiológicas e os diferentes tipos de neoplasias o presente estudo propõe uma avaliação das atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral do extrato hidroalcolólico da *L. racemosa*.

2. Referencial Teórico

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO

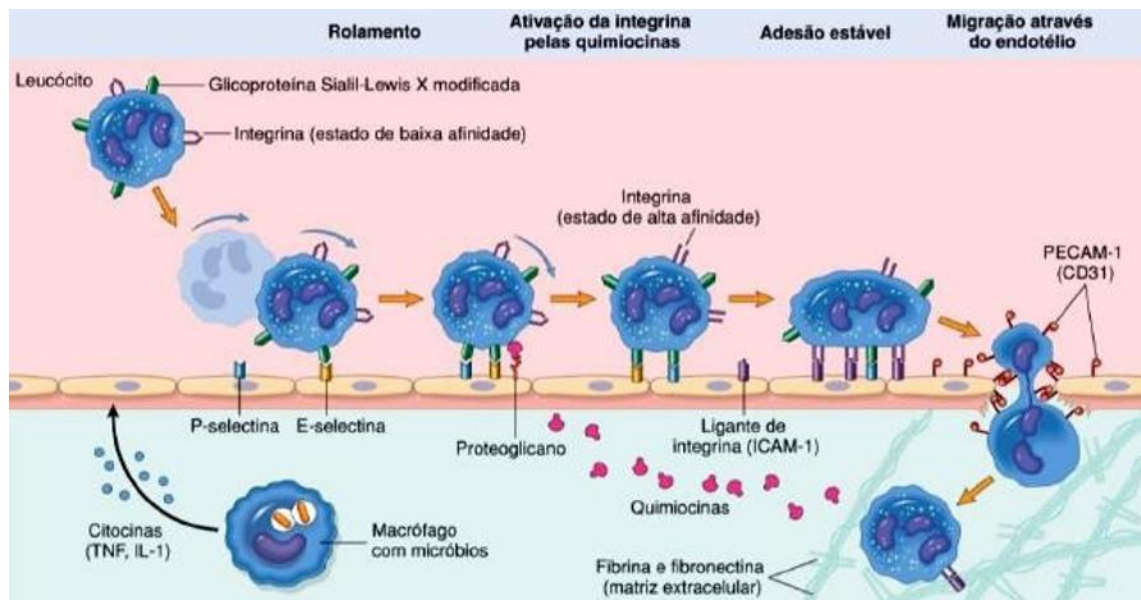
A inflamação é definida como uma parte de uma resposta biológica complexa aos danos celulares ocasionados por agressões de natureza química, física ou biológica, onde o sistema imunológico tenta eliminar (fagocitose e anticorpos) ou neutralizar estímulos prejudiciais diluindo (plasma extravasado), isolando ou sequestrando (malha de fibrina) o agente agressor e iniciar os processos de cicatrização e regenerativos (ETIENNE; VEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021; MATSUZAWA-ISHIMOTO; HWANG; CADWELL, 2018; SHALAPOUR; KARIN, 2015).

Durante o processo inflamatório, muitos mediadores químicos como óxido nítrico (NO) e prostaglandinas promovem uma série de alterações locais, acompanhado pelo calor e rubor, sinais característicos de uma reação inflamatória (BANNENBERG; CHEN et al., 2018; SERHAN, 2010). Os eventos iniciam-se com a liberação de substâncias quimiotáticas e aminas vasoativas como a serotonina e a histamina liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a agressão tissular, causando a dilatação de vasos da microcirculação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, com extravasamento de líquido plasmático e formação de edema, e, conseqüentemente, um aumento de fluxo sanguíneo na área afetada. Na sequência, há movimentação de proteinase e leucócitos do sangue para o tecido extravascular devido a contração do citoesqueleto das células endoteliais, favorecendo assim a permeabilidade vascular (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; ETIENNE; VEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021; CHEN et al., 2018; SERHAN; LEVY, 2018).

Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos e monócitos) para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como: rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme, transmigração ou diapedese e quimiotaxia (Figura 1). Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão (selectinas que são formadas por três proteínas E-selectina, P-selectina e a L-selectina, as integrinas, as imunoglobulinas e as

caderinas), de mediadores quimiotáticos (como a interleucina-8 (IL-8), o fator do complemento C5a e o LTB₄) (CHEN et al., 2018; (ETIENNE; VEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021; KELLY; KWANG; KUBES, 2007; SERHAN; LEVY, 2018). Destacam-se no processo as selectinas, dentre elas a P-selectina e a E-selectina que participam no rolamento e numa maior adesão de leucócitos ao endotélio, respectivamente. As integrinas e as imunoglobulinas, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), medeiam à adesão célula-célula e célula-matriz extra celular, de grande importância durante o processo da diapedese (CHEN et al., 2018; MILES et al., 2008; SERHAN; LEVY, 2018).

Figura 1. Processo de migração dos leucócitos ao local de inflamação.



Fonte: Kumar et al, 2008

Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda há acúmulo predominante de neutrófilos. Em processos alérgicos e infecções parasitárias pode ocorrer também a migração de eosinófilos. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos. A ativação contínua deste processo ou a falha na capacidade da resposta inflamatória desenvolve-se a lesão crônica (CHEN et al., 2018; FRANCISCHETTI et al., 2010; FREIRE; DYKE, 2013).

2.2 INFLAMAÇÃO AGUDA

A inflamação aguda é a reação imediata do organismo frente a um estímulo físico, químico ou biológico, onde mediadores de defesa são sintetizados e direcionados ao local da lesão. Essa resposta geralmente é breve, podendo durar alguns minutos ou até mesmo alguns dias. O principal objetivo da reação inflamatória é possibilitar ao tecido lesado o acesso de células, proteínas e outros elementos originários do sangue para que haja reparação do tecido lesionado. Segundo Contran et al. (2005), o processo inflamatório agudo pode ser dividido em uma sequência de eventos. Primeiramente há uma lesão em um organismo, fazendo com que este produza mediadores inflamatórios. Depois há um aumento do fluxo sanguíneo local, devido à retração de células endoteliais, promovendo a vasodilatação, e permitindo os mediadores inflamatórios terem acesso à região inflamada. Posteriormente, o extravasamento de macromoléculas plasmáticas, devido ao aumento da pressão oncótica local, promovendo a evasão de água e levando a formação do edema. Por último a quimiotaxia de leucócitos, caracterizando o processo inflamatório (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; MAJNO; PALACE, 1961; YANG; HU, 2018).

A inflamação aguda possui com os resultados do seu processo: a reparação de tecido lesado, combate ao microrganismo invasor; formação de fibrose e progressão para a inflamação crônica (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; ETIENNE; VEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021; FREIRE; DYKE, 2013; YANG; HU, 2018).

2.3 INFLAMAÇÃO CRÔNICA

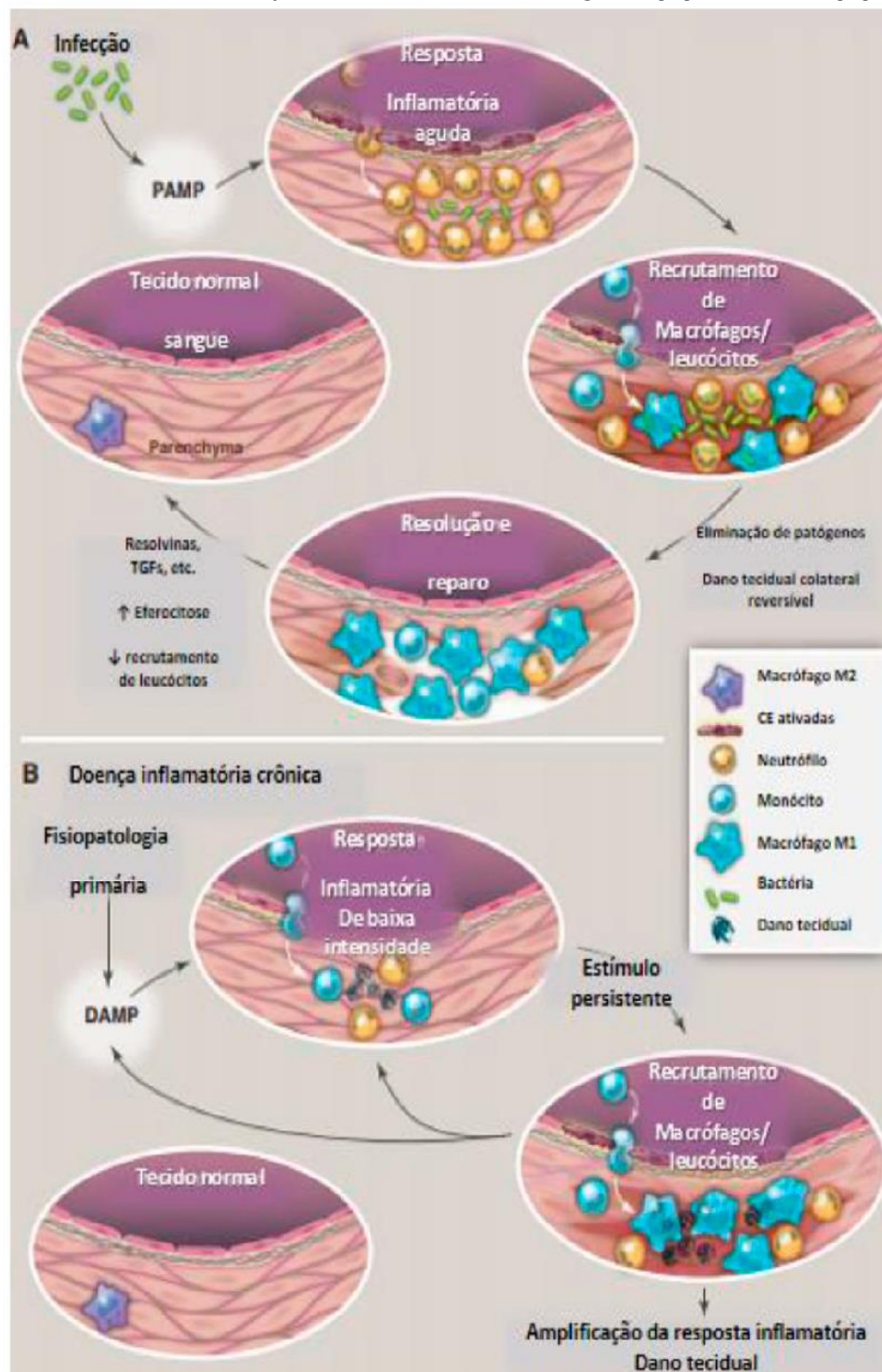
A inflamação crônica é uma evolução da inflamação aguda devido à persistência do estímulo agressor, ocasionando uma destruição contínua dos tecidos e, em alguns casos, perda da função (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010; MURAKAMI; HIRANO, 2012).

A inflamação crônica se prolonga por períodos bem mais extensos de duração, podendo estender-se por semanas a meses, associada com alguns processos específicos de alteração histológica como a destruição do tecido e formação de fibrose, devido à presença de processo inflamatório ativo e tentativas de reparo tecidual (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; YANG; HU, 2018).

Entre as doenças crônicas inflamatórias podemos citar o reumatismo, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (LES). O reumatismo caracteriza-se por dores articulares ou por outras alterações dos músculos e ossos. A artrite reumatóide afeta o revestimento das articulações, causando inchaços dolorosos, podendo levar ao longo dos anos, à deformidade da articulação e erosão óssea. Já o lúpus eritematoso sistêmico (LES) é definido como uma doença inflamatória autoimune que afeta diversos órgãos e sistemas do organismo (CHEN et al., 2018; ETIENNE; VEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021; JACKSON et al., 2018; SOUSA JUNIOR et al, 2017).

A Figura 2 mostra, resumidamente, as características do processo inflamatório agudo e crônico.

Figura 2. Características do processo inflamatório agudo **(A)** e crônico **(B)**.



Fonte: Etienne; Vegas; Viegas Junior (2021).

2.4 RESPOSTA IMUNE E INFLAMAÇÃO

O sistema imune é responsável pelos processos de reparo tecidual e de defesa

do organismo. Os leucócitos atuam em momentos distintos da reposta imune. A resposta imune pode ser classificada em imunidade não-específica (inata) e a específica (adquirida) atuando de forma independente. Na imunidade inata, as células fagocitárias mononucleares (macrófagos/monócitos) são as principais células atuantes, assim como os granulócitos (ex. neutrófilos). No caso da imunidade adquirida há atuação dos linfócitos (linfócitos T e linfócitos B) e células efectoras (CHEN et al., 2018; ETIENNE; VEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021; KIRVESKARI et al., 2003; SERHAN; LEVY, 2018).

Na imunidade inata, os macrófagos entram em ação secretando diversos mediadores (óxido nítrico, quimiocinas, etc). O efeito indutor ativador dos macrófagos pode ser tanto pelo estímulo lesivo, agente infectante ou pela ação de outras citocinas, principalmente interferon gama (IFN- γ) que são liberadas por linfócitos (CHEN et al., 2018; MARTÍN-FONTECHA et al., 2004; SERHAN; LEVY, 2018). Dentre estes mediadores responsáveis pela vasodilatação e contribuição pela migração leucocitária está a bradicinina. Este mediador estimula a produção de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-1 β), assim como a liberação de prostaglandinas e aminas simpático miméticas indutoras da hipernocicepção e da dor (ETIENNE; VEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021; MURAKAMI; HIRANO, 2012; VERRI et. al, 2007).

Na imunidade adquirida as células em atuação são os linfócitos, produzidas primeiramente no timo ou na medula óssea. Os linfócitos sofrem amadurecimento nos órgãos linfoides periféricos (timo, baço, linfonodos e amígdalas), para posteriormente serem liberadas ao longo da resposta imune. Os linfócitos T efetores (maduros), quando chegam ao local lesionado liberam diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α). Estas são responsáveis pela ativação de células B, quimiotaxia de leucócitos, ativação dos macrófagos, deposição de fibrina e nocicepção (CHEN et al., 2018; KUBO; MARTÍN-FONTECHA et al., 2004; MOTOMURA, 2012; TURNER, et al, 2014; SILVA et al., 2019; WATKINS et al.,1995).

2.2.1 Citocinas

As citocinas compreendem um grupo de moléculas que atuam regulando a resposta inflamatória e imunológica. São produzidas em repostas à lesão tecidual causadas por patógenos, células danificadas, compostos tóxicos ou irradiação

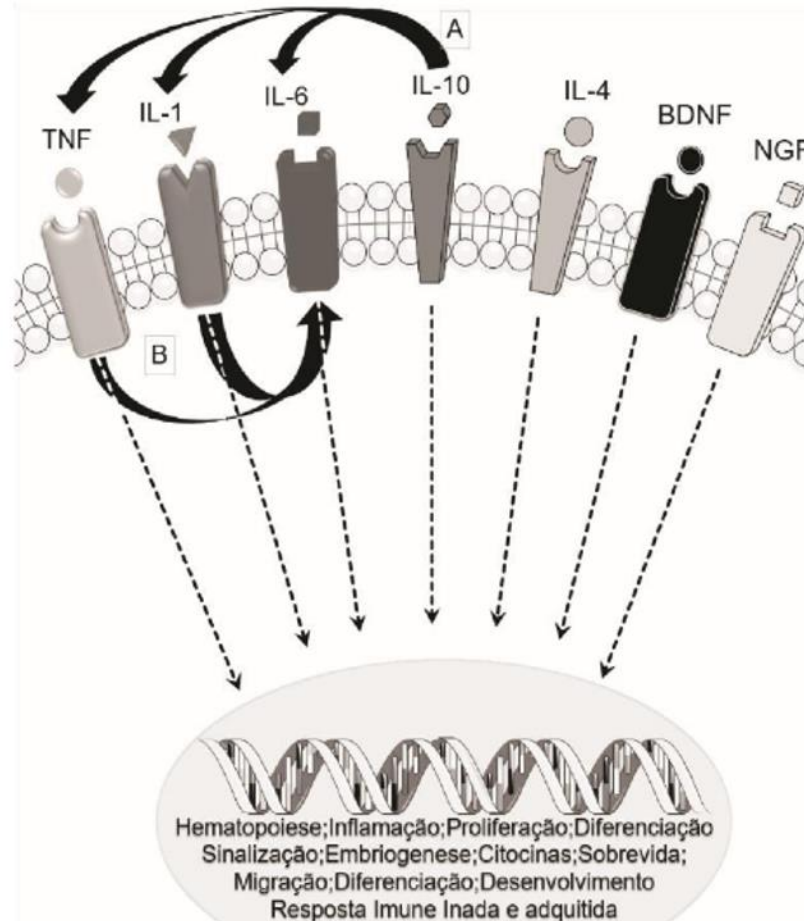
dando início a uma cascata de sinalização química que induzem respostas inflamatória (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; CHEN et al., 2018; FEGHALI; WRIGHT, 1997; TURNER et al, 2014; SILVA et al., 2019; ZHANG, 2008).

As citocinas são liberadas predominantemente por células do sistema imune, que incluem: monócitos, macrófagos e linfócitos e são classificadas em citocinas em (i) pró-inflamatórias e (ii) anti-inflamatórias. No primeiro grupo podemos (i) encontrar a família da interleucina 1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL36 γ , IL-36Ra, IL-37 e IL-1Hy2); da interleucina 6 (IL-6, IL-11, IL-31, CNTF, CT-1, LIF, OPN, OSM); da interleucina 17 (IL-17A-F, IL-25); do fator de necrose tumoral (TNF- α , TNF β , BAFF, APRIL); e interferon (IFN α , IFN β , IFN ω , IFN κ , IFN γ , IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B)), que atuam sinalizando a inflamação na área lesionada e também na indução e manutenção da dor aguda e crônica. Já no grupo (ii), a família da interleucina 10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL24, IL-26, IL-28, IL-29) e interleucina 12 (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35). as interleucinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-1e o TGF- β 1 (fator transformador de crescimento- β 1) atuam inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e reduzindo a expressão da COX-2 (Figura 3) (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; CHEN et al., 2018; CUNHA, 2003; FEGHALI; WRIGHT, 1997; TURNER et al, 2014; VALE et al., 2003; SILVA et al., 2019).

Dentre as citocinas que atuam no processo inflamatório podemos citar: IL-1 β , TNF- α e IFN- γ . Um dos principais papéis da IL-1 β é sua atuação no hipotálamo exercendo sua conhecida função de pirógeno endógeno e no aumento da expressão das ciclo-oxigenases (COX-1 e COX 2) (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; FEGHALI; WRIGHT, 1997; SILVA et al., 2019; VERRI et al., 2006).

O TNF- α é sintetizado e liberado no local da lesão a partir de diversas células, como: macrófagos, linfócitos Th1, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, astrócitos, células natural killers (NK) e células do sistema nervoso (CHEN et al., 2018; MEYERS; ALBITAR; ESTEY, 2005; SILVA et al., 2019). O TNF- α , assim como o IL-1, também pode induzir febre, pela indução da liberação da própria IL-6, além disso favorece a regulação positiva das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), da produção de interferon γ (IFN- γ) (Figura 3) (ETIENNE; VEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021; FEGHALI; WRIGHT, 1997; OMOIGUI, 2007; SILVA et al., 2019).

Figura 3. Principais citocinas descritas e suas ações.



Após estímulo da lesão há ativação de uma cascata de sinalização intracelular, cujas vias levam a diversas respostas intracelulares indicadas pelas setas pontilhadas. Além de regular a quimiotaxia, as citocinas atuam também na regulação e/ou estimulação de outras citocinas, como (A) IL-10 regula a secreção de TNF, IL-1 e IL-6 enquanto (B) TNF e IL-1 estimulando a síntese de IL-6. Fonte: Silva et al., (2019).

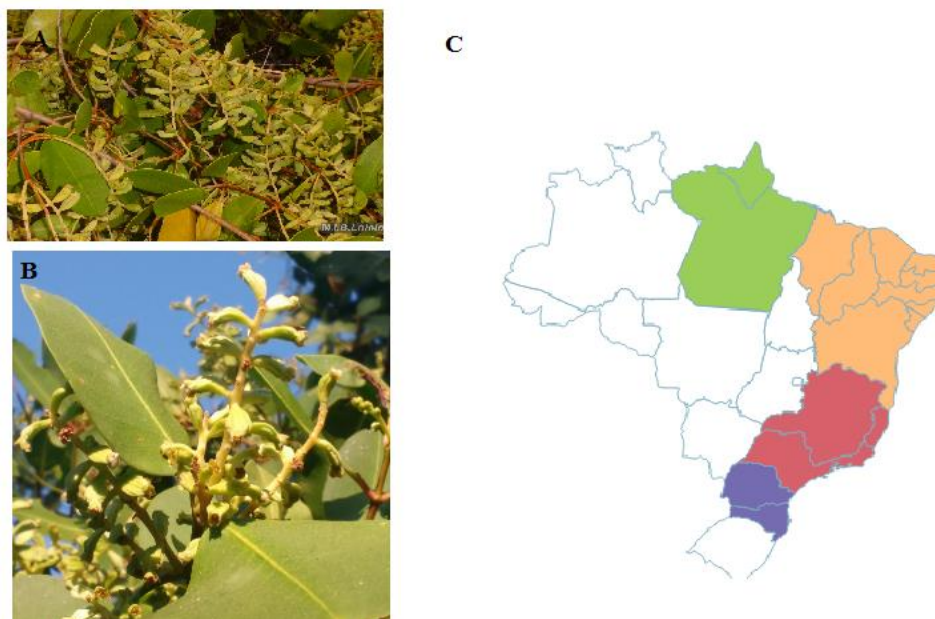
O IFN- γ contribui na resposta inflamatória aguda e principalmente na crônica, atraindo macrófagos e aumentando o número de células fagocitárias no local da inflamação (CHEN et al., 2018; FEGHALI; WRIGHT, 1997; MURAKAMI; HIRANO, 2012; SILVA et al., 2019).

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Laguncularia racemosa*

A *Laguncularia racemosa* (L) C. F. Gaert, conhecida popularmente como mangue branco ou mangue manso é uma espécie de planta pertencente à família Combretaceae. A espécie é nativa da costa da África Ocidental, na costa atlântica das Américas, na costado Pacífico da América do Norte, México até noroeste do Peru, incluindo as ilhas Galápagos (CHAPMAN,1976; TOMLINSON,1986).

L. racemosa (L) C. F. Gaert tem como habitat os manguezais e sua ocorrência no litoral brasileiro vai desde o Amapá até Santa Catarina. É a única espécie existente deste gênero no Brasil possuindo grande porte pode atingir até 20m de altura,ou ser encontrada em forma de arbusto. Possui folhas simples com filotaxia oposta, pecioladas, espessas e coriáceas, oblongas ou elípticas, com ápice arredondado e emarginado, medindo entre 4-11 cm de comprimento e 4-5 cm de largura, pecíolo vermelho com duas glândulas na parte superior, as folhas sobre os galhos estão orientadas verticalmente e são de cor verde-grisáceo mais clara na parte abaxial. A mesma possui geotropismo negativo com raízes pneumatóforos, expansões de raízes que tem função de realizar trocas gasosas (Figura 4) (LOIOLA et al., 2009).

Figura 4. Folhas de *L. racemosa* (L) C. F. Gaert (A e B) e distribuição do vegetal no Brasil (C).



Fonte: Ribeiro; Marquet; Loiola, 2022.

Apesar de se desenvolver em diferentes continentes, há poucos relatos de

estudos farmacológicos na literatura (LEE, 1995; ALONGI et al., 2002).

A espécie desenvolveu meios protetivos contra herbivoria, microrganismos e salinidade excessiva que a levaram a processo de adaptação evolutiva e, consequentemente, uma complexidade química de metabólitos secundários, principal fonte para síntese de novos fármacos (PATRA et al., 2014).

Na Índia, a casca de *L. racemosa* (L) C. F. Gaert é utilizada como tônico, adstringente, contra aftas, disenteria, febre amarela, hipertermia e escorbuto, além de apresentar atividades antimicrobianas (BANDARANAYAKE, 1998). Um trabalho realizado na mesma reg total de 27 compostos fenólicos já foram isolados, dentre eles 4 flavonoides atuando como antioxidante e antitumoral, respectivamente (; SHI et al., 2011).

Mendonça e colaboradores (2009) revelaram uma associação entre a quantidade de fenóis e o número de galhas, e observaram que os insetos evitavam estas plantas galhadas, certamente pela concentração de metabólitos secundários com efeito inseticida (GODOY et. al., 1997). Rodrigues e colaboradores (2015), relevaram em seus estudos a presença de dois flavonoides (quercetina-3-O-arabinósido e quercetina-3-O- rhamlado) com potenciais aplicações terapêuticas para o tratamento de doenças trombóticas.

É notório que os flavonoides podem apresentar atividades antioxidante e anti-inflamatória (MAMTA; BANSAL; SANDHU, 2013; RIBEIRO et al., 2015), o que faz da utilização dos extratos dessa espécie uma abordagem valiosa.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial anti-inflamatório, antimicrobiano e antitumoral do extrato hidroalcóolico das folhas de *L. racemosa*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudos de toxicidade aguda para determinação da dose letal 50% (DL50) do extrato hidroalcóolico das folhas de *L. racemosa*;
- Realizar avaliação bioquímica e hematológica das amostras de sangue dos camundongos submetidos ao ensaio de toxicidade aguda tratados com o extrato hidroalcóolico das folhas de *L. racemosa*;
- Realizar a análise ponderal, macroscópica e histológica dos órgãos dos animais submetidos ao ensaio de toxicidade aguda tratados com o extrato hidroalcóolico das folhas de *L. racemosa*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcóolico das folhas de *L. racemosa* em modelos animais de inflamação aguda como edema de pata induzida por carragenina e inflamação pulmonar aguda induzida por LPS;
- Determinar a concentração de NO e MPO em amostras do tecido pulmonar dos animais tratados com o extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa* no modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS;
- Realizar a análise histológica do tecido pulmonar dos animais tratados com o extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa* submetidos ao modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS;

- Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa* frente às células do baço (esplenócitos) de camundongos BALB/c;
- Determinar as concentrações de IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, INF e TNF provenientes das células (esplenócitos) tratados com o extrato hidroalcoólico das folhas *L. racemosa* no ensaio de citotoxicidade;
- Avaliar o a concentração inibitória mínima (CMI) do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa* frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

4. Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

Etanol 100% (Vetec), água destilada, heparina sódica 5.000 UI/mL (Cristalia), evans blue (Sigma), HEMSTAB EDTA15g/dLLabtest), cloridrato de cetamina (Vetbrands), cloridrato de xilazina (Vetbrands); reagente de Griess (Sigma), álcool iodado, álcool 70%, solução salina 9%, PBS, placas de 96 poços; vidraria; seringas; agulhas; bisturis; luvas; máscaras; óculos de proteção.

4.2 EQUIPAMENTOS

Balança analítica, citômetro de fluxo, câmara de fluxo laminar, câmara de CO₂, centrífuga, analisador hematológico ABX micros 60- Horiba, aparelho de ELISA, pletismômetro (UgoBasile, Itália).

4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho foram utilizados 40 camundongos machos adultos (com cerca de 60 dias de nascidos) albinos swiss (*Mus musculus*), pesando entre 25 e 35g- provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e 48 camundongos *Mus músculos* albinos da linhagem BALB/c fêmeas adultas (com 6 a 8 semanas de idade) foram criados e mantidos no biotério do Keizo Laboratório de Imunopatologia Asami-LIKA localizado na Universidade Federal de Pernambuco.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos num ambiente com temperatura de 22±2°C e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais foram submetidos a jejum, com a retirada da ração cerca de 4 horas antes do início do experimento. Durante o experimento os animais tiveram livre acesso à ingestão de água. Os animais foram mantidos de acordo com as normas internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS).

4.3.1 Procedimentos éticos

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e com as normas estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), sob protocolo de número 23076.030374/2018-85. Este projeto encontra-se em concordância com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 - art. 32 e decreto 3.179- art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

4.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS

A espécie *L. racemosa* foi coletada no manguezal de Tamandaré (8° 44' 54" Sul, 35° 6' 14" Oeste), litoral sul do Estado de Pernambuco, identificada e depositada no Herbário UFP- Geraldo Mariz, localizado no centro de Biocências da Universidade Federal de Pernambuco, como número de tombamento *Laguncularia racemosa* (Combretaceae); Soares, C. (01)UFP83.203. Em seguida, o material vegetal foi triturado com o auxílio de um moinho de facas. Para obtenção do extrato hidroalcólico foi utilizado 50g do material vegetal para 500mL de solução etanol/água 70% (v/v), no qual foi macerado em temperatura ambiente durante 48 horas, mantidos em vidros âmbar, sob o abrigo da luz do sol e com agitações ocasionais. Em seguida, esse material extrativo foi filtrado, concentrado em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a temperatura de 40-50 °C e logo depois liofilizado para obtenção do extrato hidroalcólico de folhas secas de *Laguncularia racemosa*. Calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula: $Re = (P_{extrato} / P_{folhas}) \times 100$. Sendo Re = Rendimento total do extrato (%); P_{extrato} = Peso do extrato liofilizado (g); P_{folhas} = Peso do pó utilizado na preparação do extrato.

4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO HIDROÁLCOOLICO

4.5.1 Determinação do conteúdo fenólico total

O teor de fenólicos totais foi determinado de acordo com Nerys et al. (2022) e Royani et al. (2022) com modificações. Para isto, 1 mL de extrato na concentração de 1000 µg/mL foi adicionado a 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1/10 v/v) e deixado reagir por 1 minuto. Posteriormente, 2 mL de carbonato de sódio (2% p/v) foi adicionado ao sistema (extrato + reagente), homogeneizado em vórtex e incubado por 2 horas na ausência de luz em condições ambientais (25°C). as amostras foram analisadas num comprimento de onda 765 nm em um espectrofotômetro UV-vis (Hewlett-Packard, modelo 8453). O branco do equipamento foi formado nas mesmas condições da amostra, utilizando-se água destilada ao invés do extrato. Após a incubação, o conteúdo fenólico total do extrato foi calculado usando uma curva preparada com o ácido gálico padrão em diferentes concentrações (3,12 –500 µg/mL). O conteúdo fenólico total foi expresso em mg de GAE (equivalente de ácido gálico) por g de extrato. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5.2 Determinação do teor total de taninos

O teor de taninos totais no extrato hidroalcoólico foi previamente determinado por Nerys et al. (2022) e Maobe et al. (2022) com modificações. O extrato foi diluído em etanol 70% na concentração de 1000 µg/mL. O ensaio consistiu em 2 mL de extrato, 3 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente Folin-ciocalteu. O sistema reagiu por 3 min. Após esse período, 1,5 mL de carbonato de sódio a 17% (Na_2CO_3) e foram adicionados 3 mL de água destilada, totalizando 10 mL. As amostras foram homogeneizadas e incubadas no escuro por 2 horas. Após este período, a absorbância das amostras foi determinada por um espectrofotômetro UV/Vis (Hewlett-Packard, modelo 8453) no comprimento de onda de 725 nm. O branco do equipamento foi formado nas mesmas proporções da amostra, utilizando-se água ao invés do extrato. Após a incubação, o tanino total. O conteúdo presente no extrato foi calculado usando uma curva usando o ácido tânico padrão preparado com quercetina padrão em diferentes concentrações (3,12 -500 µg/mL). O teor de tanino

foi expresso em mg de TAE (equivalente de ácido tânico) por g de extrato. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5.3 Determinação do teor total de flavonóis

O teor de flavonóis totais no extrato hidroalcoólico foi previamente determinado por Nerys et al. (2022) com modificações. O extrato foi diluído em etanol 70% na concentração de 1000 µg/mL. O ensaio consistiu em 2 mL de extrato, 2 mL de AlCl_3 (2%)/etanol e 3 mL de acetato de sódio (50 g/L). A mistura foi agitada e incubada durante 2,5 h a 20°C. Após esse período, as absorbâncias foram determinadas em 440 nm em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453). O branco do equipamento foi formado nas mesmas proporções da amostra, utilizando-se água ao invés do extrato. Após a incubação, o flavonol total o conteúdo presente no extrato foi calculado usando uma curva de quercetina em diferentes concentrações (3,12 –500 µg/mL). O teor de flavonóis totais foi expresso em mg de QE (equivalente de quercetina) por g de extrato. Os testes foram realizados em triplicata.

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

4.6.1 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH

A atividade sequestrante de radicais livres de DPPH foi determinada pelo método descrito por Ita et al. (2022) e Nerys et al. (2022) com pequenas modificações. Para o ensaio de DPPH, 0,70 mL de extrato de amostra ou padrão (ácido ascórbico ou BHT) com concentrações variadas (0 a 1000µg/mL) foram adicionados ao mesmo volume de solução metanólica de DPPH (100 µM). As misturas foram agitadas vigorosamente e deixadas para incubar por 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Uma diminuição na absorbância foi medida a 515 nm contra um branco de metanol sem DPPH usando um espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453. A absorbância medida para a solução controle estava na faixa de $0,75 \pm 0,01$. A porcentagem de inibição da descoloração do DPPH foi calculado utilizando a Equação 1.

$$[\text{DPPH}](\%) = \left(\frac{\text{ABS controle} - \text{ABS amostra}}{\text{ABS controle}} \right) \times 100 \quad 1)$$

Onde: ABS controle: é a absorbância do controle; ABS amostra: absorbância das amostras em diferentes concentrações.

4.6.2 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método ABTS

A atividade de eliminação de radicais ABTS foi determinada de acordo com o método descrito por Ita et al. (2022) e Nerys et al. (2022) com algumas modificações. A solução estoque ABTS + foi produzida pela reação da solução aquosa ABTS (7 mM) com solução aquosa 2,45 mM de persulfato de potássio em quantidades iguais e permitiu que reagissem por 12-16 h à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, 1 mL de solução ABTS + foi misturado com 0,50 mL do extrato em diferentes concentrações (0 a 1000 µg/mL). A mistura foi então incubada à temperatura ambiente por exatamente 10 min no escuro. O controle foi preparado misturando 1 mL de ABTS + solução com 0,50 mL de água bidestilada. A absorbância medida para a solução controle estava na faixa de $0,38 \pm 0,04$. Os resultados percentuais da atividade de eliminação foram calculados como % de inibição usando a Equação 1. Os padrões experimentais foram o ácido ascórbico e o BHT nas mesmas concentrações do extrato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.3 Determinação do CE₅₀

A quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH ou ABTS em 50%, chamada de CE₅₀, foi determinada a partir de um ajuste não linear, obtida graficamente, através da plotagem da concentração das amostras em relação a capacidade antioxidante. Onde, quanto maior o consumo de DPPH ou ABTS por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante.

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Para avaliação da toxicologia aguda foi utilizada a metodologia recomendada

pela Organization for Economic Cooperation and Development Guideline⁴²³ (OECD, 2001). Camundongos fêmeas (60 dias) foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos de três animais. Uma dose única foi administrada oralmente aos grupos de animais teste. O grupo controle (n=3) recebeu o veículo água, o grupo tratado(n=3) recebeu o extrato hidroalcoólico(EHA-Lr) bruto na dose de 2.000mg/kg.

Os animais foram observados nas primeiras duas horas e depois a cada 24 horas diariamente durante 14 dias após a administração do extrato. A avaliação foi realizada pelo método de screening hipocrático, além disso, o peso, o consumo de água e ração foram avaliados diariamente. No 14º dia, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (2:1; v/v) por via intraperitoneal para coleta de sangue, por punção cardíaca, e realização dos exames hematológicos e bioquímicos. O fígado, rins, baço, cérebro, ovários, pulmão, coração e estômago foram coletados para análise micro e macroscópica bem como para a determinação do peso relativo dos órgãos.

Posteriormente foi repetido todo o experimento conforme as mesmas condições iniciais para confirmação dos resultados obtidos, os resultados encontrados foram analisados e avaliados todos os parâmetros de igual forma sendo expressos por média entre os grupos.

O peso relativo dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula:

$$\text{Peso relativo dos órgãos} = \frac{\text{Peso do órgão (g)}}{\text{Peso do animal (g)}} \times 10$$

4.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.8.1 Edema de pata induzido por carragenina em camundongos

O método de edema de pata é uma metodologia que permite a observação do efeito sistêmico da substância teste através da indução de um estímulo inflamatório local. Neste ensaio, os animais foram divididos em 5 grupos contendo um (n=8) animais por grupo, os grupos de forma geral receberam as substâncias por via oral, os grupos tratados com extrato hidroalcoólico (EHA-Lr) nas doses de 50, 100 e 200mg/kg mg/kg, cada. As doses do extrato foram escolhidas de acordo com os resultados apresentados em experimentos anteriores realizados pelo nosso grupo

de pesquisa. O padrão utilizado foi a indometacina (droga anti-inflamatória não esteroide) na dose de 10 mg/kg. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida por uma injeção intra-plantar (i.pl.) de 50 µL de carragenina (1%) na pata posterior direita (WINTER et al., 1962; HENRIQUES et al., 1987). A outra pata do animal também foi analisada para aferição do volume e comparada com as patas que receberam a carragenina. Os volumes das patas foram medidos antes da indução pelo agente flogístico e posteriormente a indução em 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a administração de carragenina. O volume do edema, em mililitros (mL), foi registrado através de um pletismômetro (Ugo Basile, Itália). A pata posterior do animal foi submersa até a junção tíbio-tarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado digitalmente e correspondeu ao volume da pata. Os resultados foram expressos com o a diferença de volume (mL) entre a pata que recebeu carragenina e a pata contra lateral que não recebeu a carragenina.

4.8.2 Inflamação pulmonar aguda induzida por LPS

Quarenta e oito camundongos Balb/c fêmeas foram divididos em seis grupos de (n=8) animais: grupo controle salina (NaCl 0,9 %); grupo LPS; grupo LPS+dexametasona (0,5 mg/kg); grupos LPS+extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* (50, 100 e 200 mg/kg). Os animais receberão solução salina, dexametasona ou o extrato, por gavagem, e após 1 h serão desafiados com 25 µL de lipopolissacarídeo (LPS 1 mg/mL de salina) por instilação intranasal. Vinte e quatro horas após o desafio com LPS, os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico (cetamina 300 mg/kg + xilazina 30 mg/kg) e o lavado broncoalveolar foi coletado para análise de migração leucocitária. O tecido pulmonar esquerdo foi coletado para o estudo histopatológico e o tecido pulmonar direito para a determinação dos níveis da enzima mieloperoxidase, dosagem de citocinas, quantificação de proteínas por western blot (LEE et al., 2016).

4.9 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

4.9.1 Concentração mínima inibitória (CIM)

As cepas testadas foram *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Serratia marcescens* (UFPEDA 352), *Escherichia coli* (UFPEDA 224) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138) da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Para preparar o inóculo, foram cultivados espécimes em Broth Heart Infusion (HIMEDIA®) mais 5% de sangue ovino desfibrado (Sigma) a 35°C durante 24-48 h. Após a incubação, as colônias obtidas foram suspensas em solução estéril de NaCl a 0,9% e ajustadas para obtenção de um inóculo a 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias CFU/mL (STOPPA et al., 2009).

A atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* foi avaliada quantitativamente usando a técnica de microdiluição do caldo (CLSI, 2021). Todas as amostras foram testadas em triplicata e a gentamicina foi usada como parâmetro de avaliação, como controle positivo e 5% de dimetil sulfoxido (DMSO), como controle negativo. Na técnica utilizada, 100 µL de caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA®) foram pipetados em cada poço da placa de microtitulação. Em seguida, 100 µL da solução de reserva do extrato hidroalcoólico foi adicionado ao primeiro poço, com posterior homogeneização, seguida de diluições em série, a fim de obter as 8 concentrações finais do extrato hidroalcoólico (30 mg/mL a 0, 23 mg/mL). Posteriormente, foi colocado cerca de 10 µL do inóculo das bactérias em todos os poços da microplaca e as placas foram incubadas por 24 horas a fim de determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM). Após a incubação, as placas foram lidas utilizando a resazurina, substância reveladora de crescimento bacteriano (0,01 mg/mL) distribuída a todos os poços e seguida de incubação por 1 hora, para posterior leitura das placas (CORTINHAS et al., 2013). As concentrações inibitórias mínimas foram consideradas aquelas capazes de inibir o crescimento do microrganismo em 90% dos isolados bacterianos.

4.10 ANÁLISE DOS DADOS

Os experimentos de edema de pata induzido por carragenina foram estatisticamente avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o

software Graph Pad prism.5.0. Valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os demais experimentos foram estatisticamente avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, utilizando-se o software Graph Pad prism. 7.0. Valores de “p” menores que 0,01 ($p < 0,01$) foram considerados como indicativos de significância.

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL POR ESPECTROSCOPIA DE UV/VISÍVEL

O rendimento de obtenção do extrato hidroalcólico obtido das folhas de *L. racemosa* foi de 12,7% um valor próximo ao obtido por Soares (2018) que avaliando o mesmo extrato obteve rendimento de 10,47%. Conhecer os constituintes do extrato hidroalcólico de *L. racemosa* é uma etapa importante para possíveis aplicações.

Tabela 1. Teores de fenólicos, flavonoides, flavonóis e ácido tânico determinados por espectroscopia UV/Vis presentes no extrato hidroalcólico.

Constituintes	Extrato Hidroalcólico
Conteúdo Fenólico Total (mg de EGA/g de extrato)	445,4 ± 0,1
Teor Total de Flavonóides (mg EQ/g extrato)	247, 2 ± 0,9
Teor total de flavonóis (mg EQ/g extrato)	155,7 ± 1,9

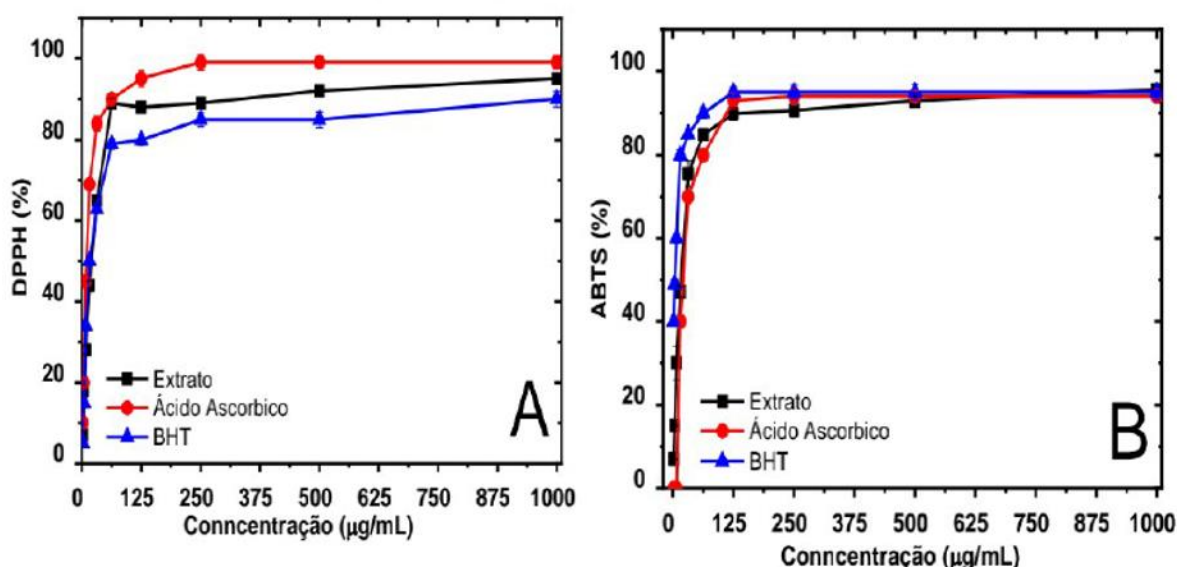
Poucos trabalhos são reportados na literatura realizando a caracterização do extrato hidroalcólico de *L. racemosa*. Dentre estes estão os realizados por Soares (2018) que verificou a presença de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas e quantitativamente apresentou teor de fenóis e taninos totais de 128, 24 ± 2,6 e 113 ± 0,43 mg EAT/g, respectivamente, de flavonoides 85,75 ± 7,19 mg ER/g e cumarinas 226,36 ± 8,7 mgEC/g. Além disso, Rodrigues *et al.* (2015), Mendes *et al.* (2018) e Costa *et al.* (2021) identificaram diferentes compostos fenólicos presentes no extrato de *L. racemosa*.

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Os extratos de diferentes plantas são descritos na literatura como bons agentes antioxidante. Em muitos casos esta atividade está diretamente relacionada a presença constituintes fenólicos presentes (WANG *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2021). Os compostos fenólicos atuam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, atuando tanto nas etapas de iniciação e propagação do

processo oxidativo (WANG et al. 2021). A Figura 5 apresenta as curvas de atividade antioxidante promovido pelo extrato hidroalcólico de *L. racemosa* em diferentes concentrações para os ensaios de DPPH (A) e ABTS (B) respectivamente.

Figura 5. Atividade antioxidante promovida pelo extrato hidroalcólico de *L. racemosa* por métodos *in vitro* DPPH (A) e ABTS (B) em diferentes concentrações comparados aos padrões ácido ascórbico e hidroxitolueno butilado (BHT) respectivamente.



Fonte: Autoria Própria, 2022

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que o extrato promove aumento da atividade antioxidante com o aumento da concentração para os dois ensaios de atividade. Perfil semelhante foram obtidos por Ahmed *et al.* (2014), Kaneria *et al.* (2018) e Bui *et al.* (2021) avaliando diferentes extratos de plantas pertencentes a família Combretaceae. Através das curvas obtidas foi possível determinar os valores de EC_{50} (concentração capaz de capturar radicais em 50%) para o extrato para cada um dos ensaios. A Tabela 2 apresenta os valores de CE_{50} para o extrato e para os padrões ácido ascórbico e hidroxitolueno butilado (BHT).

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que o extrato hidroalcólico apresentou resultados menores quando comparados aos padrões avaliados. Este fato indica que o extrato apresenta atividade antioxidante *in vitro* moderada. Além disso, apresentou melhores resultados para os ensaios de captura de radicais ABTS

quando comparados ao ensaio de DPPH. Este melhor resultado pode estar relacionado a versatilidade do método de captura de radicais ABTS quando comparado ao ensaio de captura de radicais DPPH sendo que este último apresenta melhores resultados quando as moléculas avaliadas tem caráter polar, já o ensaio de ABTS avalia compostos polares e apolares ao mesmo tempo (FLOEGEL et al. 2011; SCHAICH et al. 2015).

Dados semelhantes aos expressos na tabela 2 foram encontrados por Ibrahim e colaboradores (2022), do qual sua DPPH apresentou CE_{50} de 50,3 $\mu\text{g/ml}$ para o extrato de acetato de etila de mangue (MEE). Resultados semelhantes foram obtidos por Ahmed et al. (2014) obtiveram valores médios de CE_{50} dos extratos para os ensaios antioxidantes DPPH e ABTS variando de 0, 21–12 $\mu\text{g/mL}$ (*Combretum padoides*), 0, 25–16 $\mu\text{g/mL}$ (*Combretum vendae*), 0,33–9,41 $\mu\text{g/mL}$ (*Combretum woodii*) e 4,97–85 $\mu\text{g/mL}$ (*Combretum bracteosum*), respectivamente, enquanto os valores médios de CE_{50} para os controles positivos ácido ascórbico e trolox foram 1, 28–1,51 e 1,02–1,19 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Todos os extratos brutos inibiram a peroxidação lipídica do ácido linoléico em mais de 80% na concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$.

Awotunde et al. (2017) avaliando as frações hidroetanólicas e saponina da raiz de *Terminalia schimperiana* verificaram que a fração hidroetanol polar apresentou atividade antioxidante potente de DPPH com valor de CE_{50} de $19,36 \pm 0,436 \mu\text{g/mL}$ e atividade de eliminação de ABTS com valor de CE_{50} de $0,9420 \pm 0,011 \mu\text{g/mL}$, enquanto a fração saponina tem DPPH moderado atividade de eliminação com CE_{50} de $59,33 \pm 0,417 \mu\text{g/mL}$ e atividade de eliminação moderada de ABTS com valor de CE_{50} de $2, 273 \pm 0 \mu\text{g/mL}$.

Sousa et al. (2021) realizando diferentes ensaios antioxidantes, verificaram que a fração intermediária da casca do caule ($28,5 \pm 0,60 \mu\text{g/mL}$) e a fração acetato de etila das folhas ($40 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$) apresentaram maior % de inibição da atividade do radical livre DPPH, enquanto a fração intermediária da casca do caule ($27,5 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) e a fração hidrometanólica das folhas ($81 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$) demonstraram inibição do radical livre ABTS.

Estes resultados mostram que o extrato hidroalcóolico de *L. racemosa* pode ser utilizado como um promissor agente antioxidante.

Tabela 2. Resultados de CE_{50} para o extrato hidroalcóolico de *L. racemosa* e para

os padrões ácido ascórbico e hidroxitolueno butilado (BHT) frente aos ensaios de DPPH e ABTS.

Amostras				DPPH	ABTS
				CE ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)
Extrato	hidroalcoólico	de	<i>L. racemosa</i>	41,90 ± 3,15	21,78 ± 0,5
	Ácido Ascórbico			18,97 ± 0,4	5,24 ± 0,1
	Hidroxitolueno butilado (BHT)			7,75 ± 0,1	13,37 ± 0,01
Média ± Desvio padrão.					

5.3 TOXICIDADE AGUDA

A concepção geral de que as plantas medicinais são seguras e desprovidas de efeitos adversos não é apenas falsa, mas também enganosa. A propósito, muitos estudos mostram que as plantas medicinais são capazes de produzir uma variedade de reações indesejáveis e adversas, tais como carcinogenicidade, teratogenicidade, condições de risco de vida e até a morte (KRISTANC EKREFT, 2016; NDHLALA et al, 2013).

Desta maneira, na pesquisa das propriedades biológicas e de compostos bioativos naturais provenientes de plantas deve-se considerar a investigação da toxicidade aguda como uma das primeiras etapas na análise toxicológica (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2008). Nessa avaliação alguns parâmetros fisiológicos e comportamentais dos animais são avaliados durante a condução do experimento *in vivo*, tais como o consumo de água e ração, evolução ponderal, análise dos órgãos e valores bioquímicos e hematológicos (OECD, 2001).

Nessa perspectiva, a avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico da *L. racemosa* (EHA-Lr) foi realizada, tendo em vista a ausência de estudos toxicológicos e as possíveis atividades farmacológicas dessa espécie. Na avaliação hipocrática não houveram sinais de alterações significativas, sobretudo considerando o sistema nervoso central e autônomo. Assim, foi possível fazer uma estimativa inicial do potencial farmacológico e toxicológico dessa planta (MALONE; ROBICHAUD, 1962).

As substâncias consideradas tóxicas produzem sintomas e consequências diversas nos animais experimentais, que vão desde a alteração do peso corporal até modificações significativas dos pesos individuais de cada órgão na análise após eutanásia. Assim, estes indicadores também podem ser considerados consequência da administração de determina as substâncias quando o animal perde mais que 10% do peso corpóreo inicial (RAZA et al., 2002).

Considerando esses parâmetros supracitados observou-se que a administração do EHA-Lr não provocou alterações significativas no peso dos animais, nem dos seus respectivos órgãos em relação a o controle negativo, demonstrando que possivelmente esse extrato não exerce efeito toxicológico por essa via (Tabelas 1 e 2). Contudo, para uma avaliação minuciosa de possíveis danos teciduais é necessário a realização de análises histológicas para confirmar a integridade dos órgãos.

Tabela 3 - Evolução ponderal e consumo de água e ração dos grupos controle e tratado com o extrato hidroalcolólico das folhas de *Laguncularia racemosa* na toxicidade aguda na dose de 2.000mg/kg.

	Controle	EHA-Lr
Peso inicial (g)	25,1 ± 1,58	24,7±1,81
Peso final (g)	36,0 ± 1,08	34,4±2,67
Consumo de água por animal (mL)	10,67 ± 0,95	11, 20*± 0,74*
Consumo de alimento por animal (g)	5,69 ± 0,41	6,49* ± 0,18*

*p<0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

Tabela 4. Peso absoluto dos órgãos dos grupos controle e tratado com extrato hidroalcolólico das folhas de *Laguncularia racemosa* na toxicidade aguda na dose de 2.000 mg/kg.

Grupo	Índice dos órgãos							
	Pulmão	Ovário	Cérebro	Coração	Rim	Fígado	Baço	Estômago
Controle	9,70±0,46	0,04±0,01	4,17±0,46	1,82±0, 26	6,00±0,64	56,00±0, 64	6,27±0,69	10, 27±0,69
EHA-L.r	9,04±0,37	0,03±0,01	4,09±0,33	1,58±0,42	6, 27±0,69	53,15±5,86	7,30±0,85	10,01±0,47

*p<0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos permaneceram na faixa normal, sem diferença estatística significativa entre os camundongos dos grupos tratados como AHA-Lr e não tratados (Tabelas 3 e 4). Não existem estudos anteriores que demonstrassem o perfil toxicológico de algum extrato obtido de *L. racemosa* literatura, entretanto existem estudos que avaliaram o perfil toxicológico de outras combretáceas. Um estudo realizado por Jayesh et al. (2017), demonstrou baixa toxicidade para o extrato de *Terminalia bellirica* (Gaertn.). Enquanto isso, uma revisão sobre a toxicidade de *Terminalia sericea* Burch. ex DC. evidenciou que alguns compostos e extratos dessa planta apresentavam toxicidade moderada (MONGALO et al., 2016).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos dos grupos controle e tratado com extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* na toxicidade aguda na dose de 2.000 mg/kg.

Parâmetro hematológico	Controle	<i>Laguncularia racemosa</i>
Hemácias(mm ³)	5, 22±0,33	5,74±0,41
Hemoglobina(g/dL ⁻¹)	15,34±0,03	14,6±0,05
Hematócrito(%)	48±1,31	44±1,46
VCM(fL)	45,5±0,05	44, 2±0,07
HCM(pg)	16,54±0,07	15,39±0,01
CHCM(%)	35,67±0,32	34,93±0, 28
Plaquetas(mm ³)	162,08±0, 26	148,68±0, 21
Leucócitos totais (mm ³)		
Neutrófilos	6,00±0,48	4,50±0, 29
segmentados(%)	40	45
Eosinófilos(%)	01	04
Linfócitos(%)	57	50
Monócitos(%)	02	01

*p<0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos dos grupos controle e tratado com extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* na toxicidade aguda na dose de 2.000mg/kg.

Parâmetros	Controle	<i>Laguncularia racemosa</i>
Ureia(mg/dL)	49,4±9,73	57,4±7,33
Creatinina(mg/dL)	0,41±0,03	0,38±0,06
TGO(U/L)	184,8±63,3	186,4±24,6
TGP(U/L)	45,5±9,50	46, 2±23,6
F.Alcalina(U/L)	130,4±36,7	138,3±30,1
P.Total(g/dL)	5,67±1,12	4,93±0,52
Albumina(g/dL)	3,08±0, 26	2,68±0, 21
Glicose(mg/dL)	101,3±10,8	97,5±9, 29

*p<0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

Nesse contexto, Kpemissi e colaboradores (2020) avaliaram a toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Combretum micranthum* verificaram que durante o ensaio de toxicidade aguda, nenhuma mortalidade ou efeitos adversos foram observados na dose de 5.000 mg/kg. Daram et al. (2021) avaliando o extrato etanólico de *Terminalia catappa*,verificaram que durante os 14 dias de observação, nenhum sintoma adverso foi encontrado sem qualquer mortalidade para a dose máxima administrada durante o estudo (4.000 mg/kg). Resultados semelhantes foram obtidos por Viegas et al. (2018) que avaliando o extrato hidroetanólico de *Terminalia argentea* Mart. Folhas verificaram que as doses de 1000 e 2000 mg/kg não alteraram o ganho de peso dos camundongos no período de 14 dias nem alterou o peso relativo dos órgãos analisados. Não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos analisados.

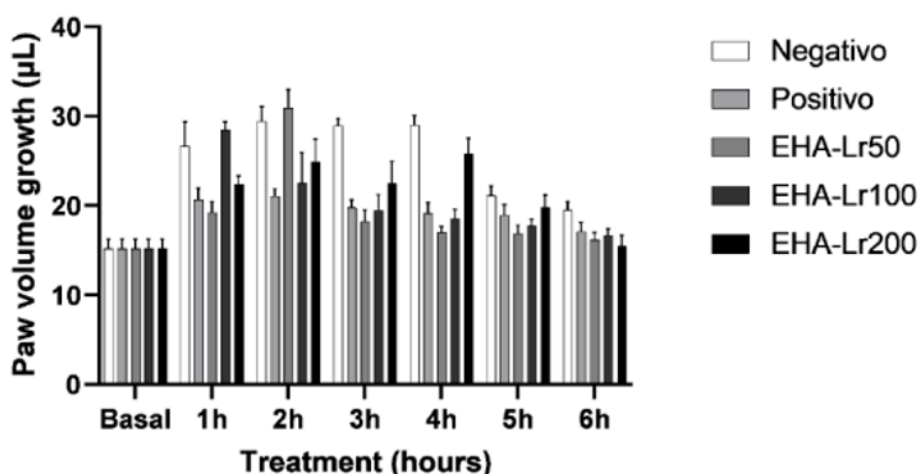
Para tanto, Jayesh et al. (2017), demonstrou baixa toxicidade para o extrato de *Terminalia bellirica* (Gaertn.). Enquanto isso, uma revisão sobre a toxicidade de *Terminalia sericea* Burch. ex DC. evidenciou que alguns compostos e extratos dessa planta apresentavam toxicidade moderada (MONGALO et al., 2016).Alem disso, os estudos citados mostram que os extratos avaliados não foram capazes de promover

alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de diferentes animais. Esses achados reforçam assim a importância de pesquisas farmacológicas em representantes desta família.

5.4 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Os animais que receberam a injeção na região intraplantar de carragenina demonstraram a indução do edema, que foi evidenciado pelo aumento do volume das patas que receberam o estímulo sendo analisadas em diferentes intervalos de tempo. O grupo de animais pré-tratados apenas com o veículo (água) apresentara edema extremamente significativo quando o mesmo foi comparado com a indometacina e com todas as doses do extrato EHA-Lr em todos os tempos correspondentes. O extrato AHE-Lr em todas as doses testadas demonstrou-se eficiente na redução do edema provocado pela carragenina em todos os tempos observados.

Figura 6. Efeito do extrato de EHA-Lr (50, 100 e 200mg/kg, v.o) e indometacina (10mg/kg, v.o) na formação de edema de pata em ratos.



Média $\pm$ Desvio Padrão; * $p < 0,05$. Significativo após análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida por teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95% quando comparado ao grupo controle. Fonte: Autoria Própria, 2022

Neste modelo de edema de pata realizado em camundongos o extrato EHA-Lr reduziu de maneira significativa o volume do edema demonstrando inclusive uma inibição superior quando comparado a indometacina.

O edema de pata induzido por carragenina em ratos está associado com a síntese de mediadores envolvidos com o processo inflamatório (FARÇA et al., 2001; HAMAD et al., 2019; SHARMA et al., 2020). Dentre estes podemos destacar alguns mais relevantes a exemplo da: histamina, serotonina, bradicinina, óxido nítrico e prostaglandinas, cuja liberação é intimamente relacionada com o processo de quimiotaxia de células em especial de leucócitos para os sítios inflamatórios (FARÇA et al., 2001; HAJARE et al., 2001)

Embora o modelo de edema de pata induzido por carrageninas e jamais resistente em camundongos, esse agente flogístico também é capaz de induzir a formação de edema. Estudos comprovam que a albumina em camundongos demonstra-se extravasada por um período superior a 24h após a sua estimulação. O edema de pata realizado em camundongos pode ser descrito através de duas fases bem distintas caracterizadas da seguinte forma: a 1º fase correspondente da (0–24h) após o estímulo inflamatório, e a 2º fase (posteriores 24h). No período inicial correspondente a 1º fase ocorre um predomínio de neutrófilos, eles por sua vez apresentam a capacidade de liberação de agentes inflamatórios como a histamina, bradicinina, serotonina e prostaglandinas (HENRIQUES et al., 1987). O mecanismo pelo qual ocorre a inibição da formação de edema encontra-se atrelado de forma direta a síntese das PGs, sendo compatível ao da ação gerada pelos fármacos classificados como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) onde a via da ciclooxigenases (COX's) são inibidas culminando na não formação das PG's (WU et al., 2013).

Extratos hidroalcóolicos de diferentes espécies pertencentes a família Combretaceae. Sharma et al. (2020) verificaram que a utilização do extrato etanólico da casca do caule de *Anogeissus latifolia* impediram o aumento do volume da pata em ambos os modelos *in vivo* com porcentagem de inibição de 44,40 e 46, 21, respectivamente às 5 horas. Para tanto, Hamad e colaboradores (2019) verificaram que o extrato etanólico de *Combretum aculeatum* Vent numa concentração de 400 mg/kg diminuiu o edema de pata (aumento de apenas 32±1,9% no peso da pata após 4 horas) em comparação com a indometacina (28,6±2,5%). Resultados

semelhantes aos do atual estudo (Figura 6), foram obtidos por Siraj et al. (2021) avaliando o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico de *Terminalia myriocarpa* em ensaios de edema de pata verificaram que as doses de 250 e 500 mg/kg foram capazes de reduzir o edema e apresentaram resultados promissores quando comparado a carragenina. Esses resultados mostram que, os extratos obtidos das diferentes espécies pertencentes a família Combretaceae apresentam capacidade de diminuir o edema de pata em diferentes animais.

5.5 INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS

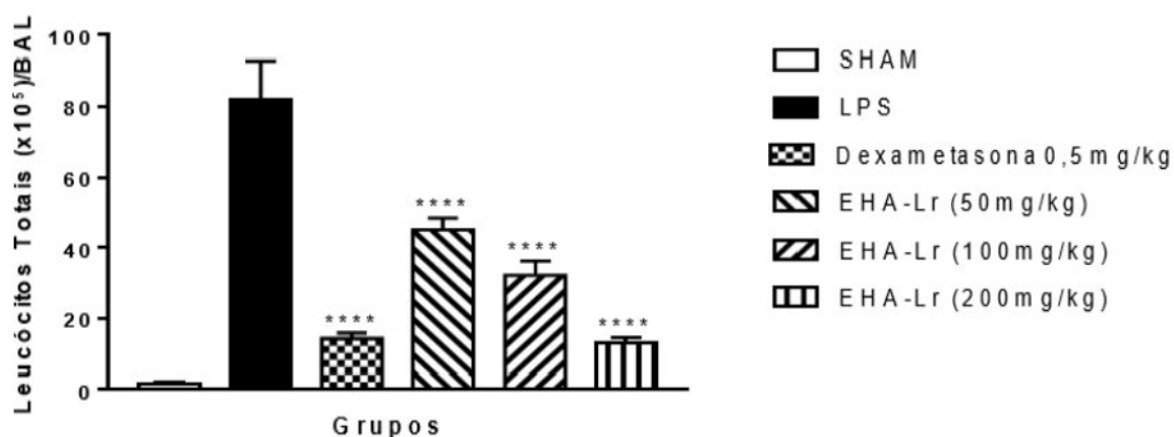
O extrato EHA-Lr demonstrou ser capaz de reduzir de forma significativa a migração de leucócitos polimorfo nucleados no lavado bronco alveolar dos animais submetidos a inflamação pulmonar aguda induzida por LPS.

Segundo (LIANG et al., 2018) o LPS é o principal ativador de células inflamatórias, sendo responsável ainda pela indução de neutrófilos e participação ativa na produção e liberação de citocinas inflamatórias, afirmando que a redução dessas citocinas inflamatórias exerce efeitos terapêuticos comprovados.

A redução da quantidade de leucócitos no exsudato inflamatório broncoalveolar quando comparada com a dos valores encontrados nos grupos veículo e do grupo que recebeu o fármaco de referência (dexametasona 0,5mg) são extremamente promissores.

Foi observado que a redução da migração leucocitária no lavado broncoalveolar no modelo de inflamação pulmonar aguda demonstrou-se intimamente relacionada com a dose utilizada do extrato EHA-Lr pelo fato que quanto maior a dose utilizada maior foi a redução no número de células observado.

Figura 7. Efeito do extrato EHA-Lr (50, 100 e 200 mg/kg, v.o) e dexametasona (0,5 vmg/kg,v.o) sobre a migração leucocitária na inflamação pulmonar aguda.



Fonte: Autoria Própria, 2022

Para Gao et al. (2020), a pleurisia está associada a inflamação pleural e ao estresse oxidativo. A lesão produzida nos pulmões e a indução inflamatória por carragenina aumenta os níveis de exsudatos de células inflamatórias, vazamento de proteínas e dos próprios mediadores pró-inflamatórios.

Resultados semelhantes aos apresentados na figura 7 foram obtidos por Moreira et al. (2020), que verificaram que o tratamento com extrato de *T. argentea* foi capaz de reduzir a produção de proteínas totais após estimulação com LPS, principalmente quando foi utilizada a concentração de 300 mg/kg, quando comparada às demais concentrações (5 e 60 mg /kg) ou veículo. Além disso, de acordo com a redução de proteínas totais no processo de pleurisia averiguado, o extrato vegetal na concentração mais alta (300 mg/kg), reduziu o número de neutrófilos e células mononucleares no mesmo local. Em menor grau, foi observada uma redução no número de neutrófilos em camundongos tratados com 5 e 60 mg/kg do extrato vegetal, quando comparados àqueles que receberam apenas o veículo.

Outros estudos utilizando o mesmo modelo de pleurisia, como o de Silva-Balin et al. (2018), demonstraram também atividade anti-inflamatória em 300 mg/kg, todavia, os autores utilizaram um extrato etanólico obtido do fruto de *Bromelia balansae*. Segundo Shorkry e colaboradores (2022), a indução da inflamação aguda *in vivo* por LPS fornece dados significativos para avaliação da atividade farmacológica de extratos. O mesmo destaca que o extrato etanólico de Hera em 200mg/kg diminuiu especialmente os mediadores pró-inflamatórios e o estresse oxidativos induzidos por LPS. Corroborando assim, com os achados deste estudo (Figura 4), tendo em vista que o extrato de EHA-Lra 200mg/kg reduziu o número de

neutrófilos tão quanto o seu tratamento com dexametasona.

Em outro estudo, Daram et al. (2021) avaliando o extrato etanólico de *Terminalia catappa* verificaram que na concentração de 500 mg/kg foi capaz de promover a diminuição a contagem total de leucócitos, a contagem de linfócitos e a atividade da enzima mieloperoxidase. Para tanto, a contagem de granulócitos foi aumentada em quase todos os três tratamentos e os dados da porcentagem da atividade total de leucócitos, granulócitos e MPO. Assim, o potencial anti-inflamatório sem causar toxicidade aguda de extratos provenientes de plantas medicinais, como as relatadas neste estudo, podem contribuir para novas aplicações farmacêuticas.

Desta forma, modelos murinos fornecem quadros adequados para o estudo da atividade anti-inflamatória de plantas medicinais, principalmente pela contagem da migração celular durante a um estímulo de um agente indutor de inflamação. Nesse contexto, Talwar et al. (2021) verificaram que o extrato aquoso de *Terminalia paniculata* (400 mg/kg) também reduziu a migração de leucócitos induzida por carragenina ($50,92 \pm 5$, 24%) em exsudatos encontrados devido ao estímulo com LPS. Esses resultados mostram que o extrato hidroalcolico de *Laguncularia racemosa* apresenta atividade anti-inflamatório promissora para o tratamento de inflamações pulmonares.

5.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

A Tabela 7 apresenta os resultados de atividade antibacteriana *in vitro* promovida pelo extrato hidroalcolico de *Laguncularia racemosa* frente a diferentes cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Serratia marcescens* (UFPEDA 352), *Escherichia coli* (UFPEDA 224) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138).

Tabela 7. Determinação da concentração mínima inibitória do EHA-Lr frente as cepas bacterianas testadas.

Microrganismos	Eritro micina (mg/m	EHA-Lr (mg/mL)
----------------	---------------------------	-------------------

L)		
02)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA	0,6 7,5
	<i>Micrococcus luteus</i> (UFPEDA 100)	0,6 0,9 3
	<i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA 86)	1, 2 7,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nd 3,7
	(UFPEDA 416)	5
	<i>Serratia marcescens</i> (UFPEDA 352)	0,6 3,7 5
	<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA 224)	1, 2 3,7 5
	<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA	0,3 3,7
	138)	5

Nd: Não determinado das concentrações avaliadas 0, 23 a 30mg/mL

Os resultados da atividade antibacteriana mostraram que o extrato EHA-Lr demonstrou-se bastante eficaz na inibição do crescimento bacteriano com valores consideravelmente satisfatórios, sendo capaz de inibir o crescimento da cepa *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100). Em relação as outras cepas apresentaram resultado de moderada a baixo quando comparado ao controle eritromicina. Os mecanismos de atividade antimicrobiana promovida por diferentes extratos ainda não estão bem elucidados, entretanto, sabe-se que os compostos fenólicos são responsáveis pela atividade *in vitro* (Puupponen-Pimiä et al. 2001; Gomes et al. 2022).

Philomène Kokora (2013) verificou que os extratos etanólico e aquoso de *Terminalia mantaly* H. Perrier (Combretaceae) apresentam atividade inibitória em todas as cepas testadas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). Os diâmetros inibitórios variam entre 7,66 mm e 35 mm. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos variaram de 0,78 mg/mL e 2,5 mg/mL. Os extratos etanólicos inibem o crescimento de bactérias em concentrações mais baixas que os extratos aquosos.

Kuet et al. (2010) ao avaliar as atividades antimicrobiana e antifúngica de uma

espécie da mesma família constatou que indivíduos pertencentes a família Combretaceae apresentam excelentes valores de concentração inibitória mínima para cepas bacterianas como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Para Anokwuru et al. (2021) avaliando o potencial antibacteriano de amplo espectro de extratos metanólicos de espécies que representam quatro gêneros de Combretaceae (*Combretum*, *Pteleopsis*, *Quisqualis*, *Terminalia* *Combretum* , *Pteleopsis*, *Quisqualis*, *Terminalia*). Verificaram que estes foram mais ativos frente a cepas de *Bacillus cereus* e *Salmonella typhimurium*, com valores médios de CIM de 0,70 mg/mL, 0,52 mg/mL e 0,45 mg/mL, respectivamente. esses achando mostram que o extrato hidroalcólico de *Laguncularia racemosa* apresenta atividade anti-inflamatório promissora para o tratamento de inflamações bacterianas.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo conclui-se que o extrato hidroalcólico das folhas de *L. racemosa*:

Apresentou um rendimento de 12,7 % da qual foi possível determinar as concentrações de fenólicos, flavonoides, flavonois e tatninos totais.

Mostrou atividade antimicrobiana frente as cepas de: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, com percentual de concentração inibitória mínima dentro dos padrões desejados e preconizados pelo NCCLS (2003).

Apresenta baixíssima toxicidade na dose testada (2.000mg/kg) demonstrando pequenas alterações a nível do perfil hipocrático e quanto ao consumo de água e ração quando comparados os grupos controle e tratados, não houveram alterações em relação a nenhum dos parâmetros bioquímicos e hematológico analisados das amostras de sangue dos grupos tratados em relação ao grupo controle, sendo então uma alternativa segura a ser explorada frente as diversas atividades biológicas em especial a investigação anti-inflamatória e antimicrobiana e antitumoral.

Apresentaram efeito antiquimiotático significativo, inibindo a migração leucocitária em direção ao fator quimioatrativo, tanto no modelo edema de pata quanto no modelo de migração leucocitária na inflamação pulmonar aguda, em todos os tempos analisados.

REFERÊNCIAS

- Al-Ansari, M., Al-Humaid, L. A., Vijayaraghavan, P., Ravindran, B., Chang, S. W., Agastian, P., Balasubramanian, B. Identification of phytochemical components from *Aerva lanata* (Linn.) medicinal plants and its in-vitro inhibitory activity against drug resistant microbial pathogens and antioxidant properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1129-1133, 2019. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.02.010.
- Abiodun, O. O., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Utrilla, M. P., Galvez, J. Anti-inflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): in vitro and in vivo evidences. **Journal of ethnopharmacology**, v. 192, p. 309-319, 2016.
- Alongi D. M. et al. Below-ground nitrogen cycling in relation to net canopy production in mangrove forests of southern Thailand. **Marine Biology**, v. 140, p. 855–64, 2002.
- Bandaranayake W. M. Traditional and medicinal uses of mangroves. **Mangroves and Salt Marshes**, v. 2, p. 133-148, 1998.
- Bannenberg, G.; Serhan, C. N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, p. 1260–1273, 2010.
- Bartz, M. C., de Melo Júnior, J. C. F., Larcher, L. Variação morfológica de *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn. (Combretaceae) em áreas de manguezal e de transição entre manguezal e floresta de restinga. **Biotemas**, n. 28, v. 1, p. 21-29, 2015.
- Bag, A., Bhattacharyya, S. K., & Chattopadhyay, R. R. The development of *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae) in clinical research. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 3, p. 244-252, 2013.
- Carvalho, W. A.; Lemônica, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.48, p. 137-158, 1998.
- Castanheira F. V.S.; Kubes, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood**, v. 16, n. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.
- Chapman, V.J. Mangrove biogeography. In: WALSH, G.E; SNEDAKER, S.C.; TEAS, H.J. (Eds.). **International symposium on biology and management of mangroves**, p.3-22, 1976.
- Chen L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 2018.
- Cunha J. M. et al. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, p. 1135–

1145, 2003.

De Freitas Guedes, F. A., de Barros Rossetto, P., Guimarães, F., Wilwerth, M. W., Paes, J. E. S., Nicolás, M. F., Alves-Ferreira, M. Characterization of *Laguncularia Racemosa* Transcriptome and molecular response to oil pollution. **Aquatic Toxicology**, v. 205, p. 36-50, 2018.

Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castaneda-Corral, G., Angeles-López, G. E., Navarrete, A., Mata, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 334-342, 2007.

Etienne, R.; Viegas, F.; J.R., C. Aspectos Fisiopatológicos Da Inflamação E O Planejamento De Fármacos: Uma Visão Geral Atualizada. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, 2021.

França, D. S.; Souza, A. L.; Almeida, K. R.; Dolabella, S. S.; Martinelli, C.; Coelho, M. M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.421, n.3, p.157-164, 2001.

Feghali, C. A.; Wright, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v. 2,p.12-26,1997.

Ferreira S. H.; Lorenzetti, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hiperalgesia. **British Journal of Pharmacology**.v.110, n.3, p.1227–1231.1993.

Francischetti, I. et al. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

Freire,M.O.;DYKE,T.E.V. Natural Resolution Of Inflammation. **Journal of Periodontology**, v. 63, p. 149–164, 2013.

Godoy S. A. P. et al. Teores de ligninas, nitrogênio e taninos em folhas de espécies típicas do mangue. **Revista brasileira de Botânica**. v. 20, n. 1, 1997.

Gonulalan, E. M., Nemutlu, E., & Demirezer, L. O. A new perspective on evaluation of medicinal plant biological activities: The correlation between phytomics and matrix metalloproteinases activities of some medicinal plants. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 3, p. 446-452, 2019.

Jayesh, K., Helen, L. R., Vysakh, A., Binil, E., Latha, M. S. In vivo toxicity evaluation of aqueous acetone extract of *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. fruit. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 86, p. 349-355, 2017.

Hajare Sw, Chandra S; Sharma J; Tandan SK; LalJ; TelangAG. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo leaves*. *Fitoterapia*, v.72,p. 131-139, 2001.

Henriques, M. G.; Silva, P. M.; Martins, M. A.; Flores, C. A.; Cunha, F. Q.; Assereuy-Filho, J.; Cordeiro, R. S. Mouse paw edema. A new model for inflammation?. **Brazilian Journal of medicine and Biological Research**, v. 20, n. 2, p.243-249. 1987.

Katerere, D. R., Gray, A. I., Nash, R. J., Waigh, R. D. Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5, p. 932-940, 2012.

Kelly, M.; Hwang, J. M.; Kubes, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.120, p.3-10, 2007.

Kristanc, L., & Kreft, S. European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part I: Plants with carcinogenic, teratogenic and endocrine-disrupting effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 92, p. 150-164, 2016.

Kirveskari, J. et al. Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients. **Experimental Eye Research**, v.77, n. 3, p. 387-390, 2003.

Kubo, M.; Motomura, Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 275, 2012.

Kumar V, Abbas Ak, Fausto N. Robbins & Cotran: **Bases Patológicas das Doenças**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Kuete, V., et al. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of *Terminalia superba* (Combretaceae). **South African Journal of Botany**, v.76, n.1, p.125-131, 2010.

Lee, S. Y. Mangrove out welling: a review. **Hydrobiologia**, v.295, p.203–12,1995.
Loiola, M. I. B. Flora da Paraíba, Brasil: Combretaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n.2, p. 330-342, 2009.

Lee, J. W., et al. Oh, S. R., Ahn, K.S. *Picrasma quassiodes* (D. Don) Benn. attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 38, p. 834-844, 2016.

Lui, Y., et al. Alpinetin Attenuates Persistent Inflammation, Immune Suppression, and Catabolism Syndrome in a Septic Mouse Model. *International immunopharmacology*, v.62, p.309-312, 2018.

Liporacci, H. S. N. Plantas medicinais e alimentícias na Mata Atlântica e Caatinga: Uma revisão bibliográfica de cunho etnobotânico. Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Florianópolis, 2014.

Majno, G.; Palace, G. E. Studies on inflammation.1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **Journal of**

Biophysical and Biochemical Cytology, v. 11, p. 571-605, 1961.

Mamta, G.; Bansal, Y. K.; Sandhu, S. S. Recent patents on flavonoids. **Recent Pat Biotechnol.**, v. 7, n. 3, p. 179-196, 2013.

Martín-Fontecha, A. et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. **Nature Immunology**, v. 5, n. 12, p. 1260-1265, 2004.

Matsuzawa-Ishimoto Y.; Hwang, S.; Cadwell, K. Autophagy and Inflammation, **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 73–101, 2018.

Mendonça, I. V. S.; Almeida-Cortez, J. S. Caracterização da galha induzida por ácaro em *Lagunculariaracemosa*(L.)Gaertn(Combretaceae). **BiotaNeotropica**, v. 7, n. 3, 2007.

Meyers, C.; Albitar, M.; Estey, E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. **Cancer**, v. 104, n. 4, p. 788-793, 2005.

Miles, A., et al. CCL25 and CCL28 promote $\alpha 4\beta 7$ -integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, p. 1257-1267, 2008.

Murakami, M.; Hirano, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1-2, 2012.

Mendes, R.; Filho, A; Nogueira, A.; *et al.* Evaluation of molluscicidal activity of three mangrove species (*Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*) and their effects on the bioactivity of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. n. 60, p. 1-9, 2018.

Malone, M. H., Robichaud, R. C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, n. 4, p. 320-332, 1962.

Mongalo, N. I., McGaw, L. J., Segapelo, T. V., Finnie, J. F., VanStaden, J. Ethnobotany, phytochemistry, toxicology and pharmacological properties of *Terminalia sericea* Burch. ex DC.(Combretaceae)—A review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 789-802, 2016.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Ninth informational supplement. NCCLS document M100-S11. Wayne, PA, 2003.

Neto, L. G.; Evaristo, F. F. V.; De Alencar Alves, M. F.; et al. Effect of the triterpene 3β , 6β , 16β -trihydroxylup-20(29)-ene isolated from the leaves of *Combretum leprosum* Mart. on cutaneous wounds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.

171, n. 29, p. 116–120, 2015.

Ndhlala, A. R., Ncube, B., Okem, A., Mulaudzi, R. B., & Van Staden, J. Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 609-621, 2013.

Patra, J. K.; Mohanta, Y. K. Investigation of potential aquatic plants as herbal biomedicine to treat fish diseases. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 20, n. 4, p.311-20, 2014.

Pinho, M. V. T. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica de extratos obtidos de *Laguncularia racemosa* e atividade inibitória sobre SPLA2extraída de *Bothrops jararacussu***. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual deCampinas,Campinas, São Paulo, 2014.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Guideline 423, Acute Oral Toxicity: Modified Up and Down Procedure, 2001.

Omoigui, S. The biochemical origin of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 2 of 3 - inflammatory profile of pain syndromes. **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 6, p. 1169-78. 2007.

Queiroz, E. F., Marcourt, L., Kicka, S., Rudaz, S., Diop, T., Soldati, T., Wolfender, J. L. Antimycobacterial activity in a single-cell infection assay of ellagitannins from *Combretum aculeatum* and their bioavailable metabolites. **Journal of ethnopharmacology**, 111832, 2019.

Raza, M. M.; Al-Shabanah, O.A.; El-Hadiyah, T. M.; Al-Majed, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment of hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swisalbinomice. **Journal of Scientia Pharmaceutica**, v.70, p.135-145, 2002.

Rajabpour, A., Mashahdi, A. R. A., Ghorbani, M. R. Chemical compositions of leaf extracts from *Conocarpus erectus* L. (Combretaceae) and their bioactivities against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 1, p. 333-337, 2019.

Reinert, F., de Pinho, C. F., & Ferreira, M. A. Diagnosing the level of stress on a mangrove species (*Laguncularia racemosa*) contaminated with oil: A necessary step for monitoring mangrove ecosystems. **Marine Pollution bulletin**, v. 113, n. 1-2, p. 94-99, 2016.

Rtibi, K., Jabri, M. A., Selmi, S., Souli, A., Sebai, H., El-Benna, J., ... & Marzouki, L. Gastroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) against ethanol-induced oxidativestressin rat. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1. p. 292, 2015.

Ribeiro D. et al. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. **Medicinal Research Reviews**, v.35, p. 877-936, 2015.

Ribeiro, R. T. M.; Marquet, N.; Loiola, M. I. B. *Combretaceae in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB6912>. Acesso em: 31 out. 2022.

Rodrigues, C. F. B. et al. Evaluation of Potential Evaluation of Potential Thrombin Inhibitors from the White Mangrove (*Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn.). **Marine Drugs**, v. 13, n. 7, p. 4505-4519, 2015.

Rodriguez-Vita, J.; Lawrence, L. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine Growth Factor Revista**, v. 21, n. 1, p. 611-5, 2010.

Santos, D. K. D. N.; De Almeida, V. S.; De Araujo, D. R. C.; et al. Evaluation of cytotoxic, immunomodulatory and antibacterial activities of aqueous extract from leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus (Combretaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 8, p. 1092-1101, 2018.

Sharma, A., del Carmen Flores-Vallejo, R., Cardoso-Taketa, A., & Villarreal, M. L. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 208, p. 264-329, 2017.

Shalapour, S.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 9, 2015.

Serhan, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? **Annual Review of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 1576-91, 2010.

Serhan, C. N.; Levy, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 7, 2018.

Shi, G. et al. Involvement of cholinergic system in suppression of formalin-induced inflammatory pain by cobratoxin. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, p. 1233–1238, 2011.

Siew, Y. Y., Yew, H. C., Neo, S. Y., Seow, S. V., Lew, S. M., Lim, S. W., ... & Tan, C. H. Evaluation of anti-proliferative activity of medicinal plants used in Asian Traditional Medicine to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 235, p. 75-87, 2019.

Silva, J. B. **Sensoriamento remoto aplicado ao estudo do ecossistema manguezal em Pernambuco**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2012.

Silva, M. S. et al. Citocinas, **ACTA MSM**. Rio de Janeiro . v.6, n.4, 2019.
Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; et al, Farmacognosia: da Planta ao medicamento, Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2017.

Sousa Jr., et al. Efeito da suplementação com vitamina D em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2017.

Sodré, V., Caetano, V. S., Rocha, R. M., Carmo, F. L., Medici, L. O., Peixoto, R. S., ...& Reinert, F. Physiological aspects of mangrove (*Laguncularia racemosa*) grown in microcosms with oil-degrading bacteria and oil contaminated sediment.

Environmental pollution, v. 172, p. 243-249, 2013.

Sultana, S., Asif, H. M., Akhtar, N., & Ahmad, K. Medicinal plants with potential antipyretic activity: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, p. S202-S208, 2015.

Stoppa, M. A.; Casemiro, L. A.; Vinholis, A. H. C.; Cunha, W. R.; Silva, M. L. A.; Martins, C. H. G.; Furtado, N. A. J. C. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Quim.Nova*, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

Tomlinson, P. B. **The Botany of Mangroves**. Cambridge: Cambridge University Press; p. 413, 1986.

Turner, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

Vale, M. L. Et Al. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics**, v.304, p. 102–108, 2003.

Valli, M. ; Russo, H. M. ; Bolzani, V. S. . The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, v. 90, p. 763-778, 2018.

Verri Jr, W. A., et al. Antigen-induced inflammatory mechanical hypernociception in mice is mediated by IL-18. **Brain Behavior and Immunity**, v. 21, p. 535–543, 2007.
Watkins, L. R., et al. Mechanisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) hyperalgesia. **Brain Research**. v. 692, p. 244–50, 1995.

Winter, C. A.; Risley, E. A.; Nuss, G. W. Carrageenin. induced edema in hind paw of threat as assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v.111, p.544-547. 1962.

Wu, M., et al. Enhancement of PLGF production by 15-(S)-HETE via PI3K-Akt, NF- κ B and COX-2 pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblast. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, n. 1-3, p. 388-396, 2013.

Xue, D. Q.; Wang, J. D.; Guo, Y. W. A new sulphated nor-sesquiterpene from mangrove *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. F. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n.4, p. 319–321, 2008.

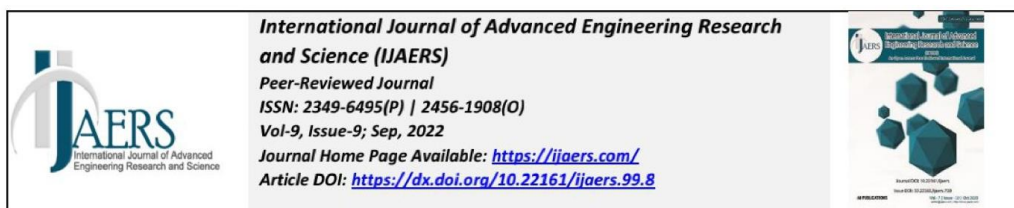
Yang, W.; Hu, P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 13, p. 25-32, 2018.

Zhang, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Researchin Cardiology**, v. 103, n. 5, p. 398-406, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Publicação oriunda do trabalho: **International Research of Advanced Engineering and Science**. Fator de Imapacto 7.32.

A1. Publicação oriunda do trabalho: **International Research Journal of Advanced Engineering and Science**. Fator de Imapacto 7.32.



Antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities promoted by hydroalcoholic extract of *Laguncularia racemosa* (L) c.f. leaves Gaert

Jhonatta Alexandre Brito Dias^{1*}, Antonio Carlos Vital Júnior², Fábio Miguel Santos Costa³, Priscilla Yevellin Barros de Melo Lima⁴, Helimarcos Nunes Pereira¹, Iranildo José da Cruz Filho¹, Cristiane Moutinho Lagos de Melo¹, Teresinha Gonçalves da Silva¹, Ivone Antônia de Souza¹

¹Department of Antibiotics, Center for Biosciences, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Department of Microbiology and Parasitology, Center of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

³Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy of the University of Porto, Porto, Portugal.

⁴Maurício de Nassau University Center - UNINASSAU, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

*Correspondence: Jhonatta Alexandre Brito Dias (jhontta@hotmail.com)

Received: 05 Aug 2022,

Received in revised form: 02 Sep 2022,

Accepted: 08 Sep 2022,

Available online: 12 Sep 2022

©2022 The Author(s). Published by AI Publication. This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords— Combretaceae, Hydroalcoholic extract, biological activities, antimicrobials

Abstract— This study aimed to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and toxicity potential of the hydroalcoholic extract of the leaves of *L. racemosa* (EHALr) a mangrove plant. The results showed that the extract was able to promote moderate antioxidant activity. In acute toxicity assays, EHA-Lr showed low toxicity, with no significant changes in animal and organ weights and in biochemical and hematological parameters. In the evaluation of anti-inflammatory activity, the 200 mg/kg dose of EHA-Lr was most effective in reducing leukocyte migration in the paw edema model and in the LPS-induced acute lung inflammation model the 50 mg/kg dose was most effective in reducing plantar volume. The antimicrobial potential of the hydroalcoholic extract was observed against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* strains, proving to be effective. However, the extract was most active against the *Micrococcus luteus* strain (0.93mg/mL). The hydroalcoholic extract of *L. racemosa* leaves showed anti-inflammatory and antimicrobial activities, with low toxicity, which makes it a strong promise to be applied or combined in clinical therapy.

I. INTRODUCTION

Medicinal plants have been used to combat different diseases since the earliest records of human civilization. According to the World Health Organization (WHO), approximately 80% of the population in developing countries face difficulties in acquiring synthetic

medicines and use traditional medicines, especially those of plant origin, to meet their basic health needs (SULTANA et al. 2015).

Through the development of research in the field of natural products, several biological activities have been systematically and widely studied using botanical material

as the main raw material, such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, gastroprotective, anxiolytic and, more recently, antineoplastic (RTIBI et al. 2015; AL-ANSARI et al. 2019; SHARMA et al. 2017; GONULALAN et al. 2019; SIEW et al. 2019). In this intention, several botanical families have been studied seeking the determination of medicinal properties or aiming at the prospection of bioactive compounds. In Brazil, plants from practically all ecosystems are studied, from the Amazon, Atlantic Forest and Caatinga to the Mangrove, which is still little explored (LIPORACCI, 2014; BARTZ et al. 2015).

Four species occur in Brazilian mangroves (*Rhizophora mangle* L. - Rhizophoraceae, *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke and *Avicennia germinans* (L.) Stearn - Acanthaceae, and *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn. - Combretaceae). The latter is popularly known as mangrove. It is of global range, with greater presence in North and South America, and overall, plays great importance for the ecosystem where it inhabits (SILVA, 2012; NETO et al. 2015). In this sense, *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn has been the target of several studies involving its interaction in the mangrove ecosystem, in terms of pollution monitoring and in interaction studies with some microorganisms, however, pharmacological and phytochemical studies with this species are scarce (DE FREITAS GUEDES et al. 2018; REINERT et al. 2016; SODRÉ et al. 2013).

Some pharmacological studies indicate that *L. racemosa* has potential molluscicidal activity (MENDES et al. 2018), antioxidant activity (XUE et al, 2008) and inhibition of PLA2 and other pathways of the inflammation cascade (PINHO et al, 2014). And a phytochemical study revealed in this plant the presence of some compounds, such as tannins and flavonoids, with possible antioxidant activity and protein kinase inhibitors (PINHO, 2014). The literature shows that other species representing the Combretaceae family showed antimicrobial, antioxidant and anticancer activities, a fact that reveals a huge potential for further investigation of *L. racemosa*, considering that chemotaxonomic factors determine that species of the same family may possess similarities in phytochemical constitution and, consequently, biological activities (RAJABPOUR et al, 2019; SANTOS et al. 2018 SIMÕES et al. 2017; KATERERE et al. 2012).

In view of these possible biological activities and facing the high cost, therapeutic limitations and side effects evidenced with the drugs currently employed for the treatment of pathologies. The present study proposes an evaluation of the antioxidant, toxicity, anti-inflammatory and antimicrobial activities of the hydroalcoholic extract of *L. racemosa*.

II. MATERIAL AND METHODS

Reagents

Ethanol 100% (Vetec), methanol (Merck) heparin sodium 5.000 IU/mL (Cristalia), Evans blue (Sigma), HEMSTAB EDTA 15 g/dL (Labtest), ketamine hydrochloride (Vetbrands), xylazine hydrochloride (Vetbrands); Griess reagent (Sigma), iodized alcohol, 70% alcohol, 9% saline, PBS (Phosphate Buffered Saline), carragenina e LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) indometacina, NaCl Mueller-Hinton (HIMEDIA®) resazurina dexametasona Broth Heart Infusion (HIMEDIA®), Folin-Ciocalteu (Merck) carbonato de sódio (Merck), ácido ascórbico (Merck), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Merck), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Merck), butylated hydroxytoluene (Merck), cloreto de alumínio (Merck), acetato de sódio (Merck).

Collecting plant material and obtaining extract from the leaves *Laguncularia racemosa*

The leaves of the species *L. racemosa* were collected in the mangrove of Tamandaré (8° 44' 54" South, 35° 6' 14" West), southern coast of the State of Pernambuco, identified and deposited in the Herbarium UFP- Geraldo Mariz, located in the center of Biocências of the Federal University of Pernambuco, with the accession number *Laguncularia racemosa* (Combretaceae); Soares, C. (01) UFP 83.203. Then, the plant material was dried in an oven (Tecnal, TE-393/1) at 45 °C for 48 hours, then ground in a knife mill (FRITSCH- Pulverisette 14) and sieved in a 80 mesh particle size range according to the methodology proposed by Melo et al. (2022).

To obtain the hydroalcoholic extract, 50 g of the plant material was used for 500 mL of ethanol/water solution 70% (v/v), in which it was macerated at room temperature for 48 hours, kept in amber glasses, under the shelter of sunlight and with occasional agitation. After that, this extractive material was filtered, concentrated in a rotary evaporator, under reduced pressure, at a temperature of 40-50°C and then lyophilized to obtain the hydroalcoholic extract of *Laguncularia racemosa* dry leaves. The yield of the extract was determined by Equation 1.

$$\text{Yield (\%)} = \left(\frac{\text{Mass of the extract obtained (g)}}{\text{Mass of leaves (g)}} \right) * 100\% \quad (1)$$

Partial characterization of the hydroalcoholic extract by UV/Visible spectroscopy

Determination of total phenolic content

Total phenolic content was determined according to Nerys et al. (2022) and Royani et al. (2022) with modifications. For this, 1 mL of extract at the concentration of 1000 µg/mL was added to 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1/10 v/v) and allowed to react for 1 minute. Subsequently, 2 mL of sodium carbonate (2% w/v) was added to the system (extract + reagent), homogenized in vortex and incubated for 2 hours in the absence of light under ambient conditions (25°C). The samples were analyzed at a wavelength of 765 nm in a UV-vis spectrophotometer (Hewlett-Packard, model 8453).

The equipment blank was formed under the same conditions as the sample, using distilled water instead of the extract. After incubation, the total phenolic content of the extract was calculated using a curve prepared with standard gallic acid at different concentrations (3.12 -500 µg/mL). The total phenolic content was expressed as mg GAE (gallic acid equivalent) per g extract. The tests were performed in triplicate.

Determination of total flavonoid content

The assay for determination of total flavonoid content was performed according to the methodology proposed by Nerys et al. (2022) and Royani et al. (2022) with few modifications. The extract was diluted in 70% ethanol at a concentration of 1000 µg/mL. In a 10 mL volumetric flask, 1.0 mL of the extract solution, 1.0 mL of the 2% ethanol-aluminum chloride reagent was added and the volume was made up with ethanol. The absorbances were determined after 30 min at 425 nm in a spectrophotometer (Hewlett-Packard, model 8453). The equipment blank was formed under the same conditions as the sample, using water instead of the extract. After incubation, the total flavonoid content present in the extract was calculated using a curve with the quercetin standard at different concentrations (3.12 -500 µg/mL). The total flavonoid content was expressed as mg QE (quercetin equivalent) per g extract. The tests were performed in triplicate.

Determination of total flavonols content

The content of total flavonols in the hydroalcoholic extract was previously determined by Nerys et al. (2022) with modifications. The extract was diluted in 70% ethanol at a concentration of 1000 µg/mL. The assay consisted of 2 mL of extract, 2 mL of AlCl₃ 3 (2%)/ethanol, and 3 mL of sodium acetate (50 g/L). The mixture was stirred and incubated for 2.5 h at 20°C. After this period, the absorbances were determined at 440 nm in a spectrophotometer (Hewlett-Packard, model 8453). The equipment blank was formed in the same proportions as the sample, using water instead of the extract. After incubation, the total flavonol content present in the extract was calculated using a quercetin curve at different concentrations (3.12 -500 µg/mL). The total flavonol content was expressed as mg QE (quercetin

equivalent) per g extract. The tests were performed in triplicate.

Determination of total tannin content

The total tannin content in the hydroalcoholic extract was previously determined by Nerys et al. (2022) and Maobe et al. (2022) with modifications. The extract was diluted in 70% ethanol at a concentration of 1000 µg/mL. The assay consisted of 2 mL extract, 3 mL distilled water, 0.5 mL Folin-ciocalteu reagent. The system was reacted for 3 min. After this period, 1.5 mL of 17% sodium carbonate (Na₂CO₃) and 3 mL of distilled water were added, totaling 10 mL. The samples were homogenized and incubated in the dark for 2 hours. After this period, the absorbance of the samples was determined by a UV/Vis spectrophotometer (Hewlett-Packard, model 8453) at a wavelength of 725 nm. The equipment blank was formed in the same proportions as the sample, using water instead of the extract. After incubation, the total tannin. The content present in the extract was calculated using a curve using standard tannic acid prepared with standard quercetin at different concentrations (3.12 -500 µg/mL). The tannin content was expressed as mg TAE (tannic acid equivalent) per g extract. The tests were performed in triplicate.

In vitro antioxidant activity

The DPPH free radical scavenging activity was determined by the method described by Ita et al. (2022) and Nerys et al. (2022) with minor modifications. For the DPPH assay, 0.70 mL of sample or standard (ascorbic acid or BHT) extract with varying concentrations (0 to 1000 µg/mL) were added to the same volume of DPPH methanolic solution (100 µM). The mixtures were shaken vigorously and left to incubate for 20 minutes in the dark at room temperature. A decrease in absorbance was measured at 515 nm against a methanol blank without DPPH using a Hewlett-Packard spectrophotometer, model 8453. The absorbance measured for the control solution was in the range of 0.75 ± 0.01. The percentage of DPPH discoloration inhibition was calculated using Equation 2.

$$[\text{DPPH}](\%) = \left(\frac{\text{ABS control} - \text{ABS sample}}{\text{ABS control}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Control ABS: is the absorbance of the control; sample ABS: absorbance of the samples at different concentrations.

ABTS method

ABTS radical scavenging activity was determined according to the method described by Ita et al. (2022) and Nerys et al. (2022) with some modifications. The ABTS + stock solution was produced by reacting the aqueous ABTS solution (7 mM) with 2.45 mM potassium persulfate aqueous solution in equal amounts and allowed to react for

12-16 h at room temperature in the dark. Then, 1 mL of ABTS + solution was mixed with 0.50 mL of the extract at different concentrations (0 to 1000 µg/mL). The mixture was then incubated at room temperature for exactly 10 min in the dark. The control was prepared by mixing 1 mL of ABTS+solution with 0.50 mL of double-distilled water. The absorbance measured for the control solution was in the range of 0.38 ± 0.04 . The percent elimination activity results were calculated as % inhibition using Equation 2. The experimental standards were ascorbic acid and BHT at the same concentrations as the extract. All experiments were performed in triplicate.

Determination of EC₅₀

The amount of antioxidant required to decrease the initial concentration of DPPH or ABTS by 50%, called EC₅₀, was determined from a non-linear fit, obtained graphically by plotting the concentration of the samples against the antioxidant capacity. Where, the higher the consumption of DPPH or ABTS by a sample, the lower its EC₅₀ and the higher its antioxidant activity.

Experimental animals

For the biological activity studies, 40 adult male Swiss albino mice (*Mus musculus*) weighing between 25 and 35g - from the bioterium of the Antibiotics Department of the Federal University of Pernambuco - were used. In addition, 48 albino *Mus musculus* mice of the Balb/c strain were used (6 to 8 weeks old), which were bred and maintained in the Keizo Asami Laboratory of Immunopathology (LIKA), also located in the Federal University of Pernambuco.

The animals were housed in polyethylene cages with stainless steel bars. They had free access to water and balanced feed (Labina/Presence), and were kept in an environment with a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and controlled light providing a 12-hour light-dark cycle. All animals were submitted to fasting, with the withdrawal of the feed about 4 hours before the beginning of the experiment. However, during the experiment, the animals had free access to drinking water. The animals were kept according to the international guidelines of the Council for Experimental Laboratory Animals Council for Experimental Laboratory Animals (ICLAS).

Ethical Procedures

All experiments were performed according to the standards established by the Brazilian Society of Animal Science (SBCAL) and the standards established by the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. This work was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Pernambuco (CEUA-UFPE), under protocol number 23076.030374/2018-85. In addition, it is in accordance with

current regulations in Brazil, especially Law 9.605 - art. 32 and decree 3.179 - art. 17, of 21/09/1999, which deals with the issue of animal use for scientific purposes.

Acute Toxicity Evaluation

The methodology recommended by the Organization for Economic Cooperation and Development Guideline 423 (OECD, 2001) was used for acute toxicology evaluation. Female mice (60 days old) were randomly assigned to two groups of three animals. A single dose was administered orally to the groups of test animals. The control group (n=3) received the vehicle water, the treated group (n=3) received the crude hydroalcoholic extract (EHA-Lr) at a dose of 2,000mg/kg.

The animals were observed for the first two hours and then every 24 hours daily for 14 days after administration of the extract. The evaluation was performed by the hypocratic screening method, in addition, weight, water and feed consumption were evaluated daily. On the 14th day, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (2:1; v/v) intraperitoneally to collect blood by cardiac puncture and perform hematological and biochemical tests. The liver, kidneys, spleen, brain, ovaries, lung, heart, and stomach were collected for micro and macroscopic analysis as well as to determine the relative weight of the organs.

Afterwards the whole experiment was repeated under the same initial conditions to confirm the results obtained. The results were analyzed and all parameters were evaluated in the same way and expressed as means between the groups. The relative weight of the organs was determined by Equation 3.

$$\text{Relative weight (\%)} = \left(\frac{\text{Organ weight (g)}}{\text{Animal weight (g)}} \right) * 100 \quad (3)$$

Anti-inflammatory activity

For the evaluation of the anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract, the carrageenan-induced paw edema technique (Carrageenan-induced paw edema test) and LPS (bacterial lipopolysaccharide) described by Winter et al. (1962), Henriques et al, (1987) Hamad et al. (2019), Siraj et al. (2021) with modifications. Thus, the animals were divided into 5 groups containing one (n=8) animal per group, the groups generally received the substances orally, the groups treated with hydroalcoholic extract (EHA-Lr) at doses of 50, 100 and 200mg/kg. one. The standard used was indomethacin (non-steroidal anti-inflammatory drug) at a dose of 10 mg/kg. The negative control group received only water. One hour after treatment, inflammation was induced by an intra-plantar (i.pl.) injection of 50 µL of carrageenan (1%) in the right hind leg. The other leg of the animal was also analyzed for volume and compared to the paws that

received the carrageenan. The paw volumes were measured before induction by the flogging agent and after induction at 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 hours after carrageenan. The volume of edema, in milliliters (mL), was recorded using a plethysmometer (Ugo Basile, Italy). The animal's hind paw was submerged up to the tibio-tarsal junction in the reading chamber of the device. The volume of fluid displacement was digitally recorded and corresponded to the volume of the paw. The results were expressed as the difference in volume (mL) between the foot that received carrageenan and the contralateral paw that did not receive carrageenan.

LPS-induced acute lung inflammation

Forty-eight female Balb/c mice were divided into six groups of (n=8) animals: control group with saline solution (NaCl 0.9%); LPS group; LPS + dexamethasone group (0.5 mg/kg); LPS + hydroalcoholic extract of *L. racemosa* groups (50, 100 and 200 mg/kg). The animals received saline, dexamethasone or the extract, by gavage, and after 1 hour were challenged with 25 μ L of lipopolysaccharide (LPS 1 mg/mL saline) by intranasal instillation. Twenty-four hours after LPS challenge, the animals were euthanized by anesthetic overdose (ketamine 300mg/kg + xylazine 30mg/kg) and bronchoalveolar lavage was collected for leukocyte migration analysis. Following the protocols described by Lee et al. (2016), Daram et al. (2021) and Talwar et al. (2021) respectively.

Bacterial strains and inoculum preparation

The strains tested included the species *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Serratia marcescens* (UFPEDA 352), *Escherichia coli* (UFPEDA 224) and *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138) from the microorganism collection of the Antibiotic Department of the Federal University of Pernambuco. To prepare the inoculum, the bacteria were cultured in Broth Heart Infusion (HIMEDIA®) plus 5% defibrinated sheep blood (Sigma) at 35°C for 24-48 hours. After incubation, the obtained colonies were suspended in sterile 0.9% NaCl solution and adjusted according to McFarland 0.5, corresponding to a concentration of 1.5×10^8 colony forming units CFU/mL (Stoppa et al. 2009).

In vitro antimicrobial activity

The antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of *L. racemosa* was quantitatively evaluated by the broth microdilution technique (CLSI, 2021). All samples were tested in triplicate and Erythromycin was used as an evaluation parameter, as a positive control and dimethylsulfoxide (DMSO) 5%, as a negative control. In the technique used, 100 μ L of Mueller-Hinton broth (HIMEDIA®) was pipetted into each well of the microtiter plate. Then, 100 μ L of the stock solution of the

hydroalcoholic extract was added to the first well, with subsequent homogenization, followed by serial dilutions to obtain the 8 final concentrations for the hydroalcoholic extract (0.23 to 30 mg/mL). Then, the plates were incubated for 24 hours to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). After incubation, the plates were read, using the bacterial growth developer resazurin (0.01 mg/mL) was added to all wells, followed by incubation for 1 hour and subsequent reading of the plates (Cortinhas et al. 2013). The minimum inhibitory concentrations were considered those capable of inhibiting the growth of the microorganism in 90% of the bacterial isolates. The experiments were performed in triplicate. The standard drug used was streptomycin, under the same conditions as the hydroalcoholic extract of *L. racemosa*.

Statistical analysis

The carrageenan-induced paw edema experiments were statistically evaluated statistically evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test with 95% confidence interval, using Graph Pad prism 5.0 software. Values of "p" less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as indicative of significance. The others experiments were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman-Keuls test with a 99% confidence interval, using Graph Pad Prism 7.0 software. P-values less than 0.01 ($p < 0.01$) were considered indicative of significance as indicative of significance. In parallel, the antimicrobial activity (MIC) data obtained were plotted using Microsoft Excel® version 2010.

III. RESULTS AND DISCUSSION

Yield of obtaining the hydroalcoholic extract and partial characterization by UV/Visible spectroscopy

The yield of the hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *L. racemosa* was 12.7% a value close to that obtained by Soares (2018) who evaluating the same extract obtained a yield of 10.47%. Knowing the constituents of the hydroalcoholic extract of *L. racemosa* is an important step for possible applications. In table 1 presents the total contents of phenols, flavonoids, flavonols, and tannins respectively.

Table 1. Content of phenolics, flavonoids, flavonols and tannic acid determined by UV/Vis spectroscopy present in the hydroalcoholic extract.

Constituents	Hydroalcoholic Extract
Total Phenolic Content (mg EGA/g extract)	445,4 ± 0,1
Total Flavonoid Content (mg EQ/g extract)	247,2 ± 0,9
Total Flavonols content (mg EQ/g extract)	155,7 ± 1,9
Tannin content (mg ETA/g extract)	34,7 ± 0,8

Average ± standard deviation. EAG: gallic acid equivalent. EQ: quercetin equivalent. ETA: tannic acid equivalent.

Few works are reported in the literature performing the characterization of the hydroalcoholic extract of *L. racemosa*. Among these are those performed by Soares

(2018) who verified the presence of total phenols, tannins, flavonoids and coumarins and quantitatively presented total phenols and tannins content of 128.24 ± 2.6 and 113 ± 0.43 mg EAT/g, respectively, of flavonoids 85.75 ± 7.19 mg ER/g and coumarins 226.36 ± 8.7 mgEC/g. In addition, Rodrigues et al. (2015), Mendes et al. (2018) and Costa et al. (2021) identified different phenolic compounds present in *L. racemosa* extract.

In vitro antioxidant activity

Extracts of different plants are described in the literature as good antioxidant agents. In many cases this activity is directly related to the presence phenolic constituents present (Wang et al. 2021; Xu et al. 2021). Phenolic compounds act as radical scavengers and sometimes as metal chelators, acting at both the initiation and propagation stages of the oxidative process Wang et al. (2021). Figure 1 shows the antioxidant activity curves promoted by hydroalcoholic extract of *L. racemosa* at different concentrations for DPPH (A) and ABTS (B) assays respectively.

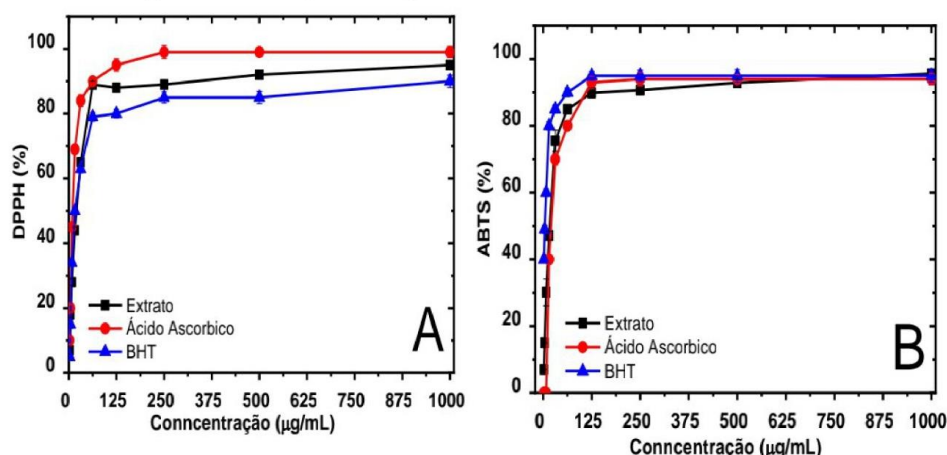


Fig.1. Antioxidant activity promoted by hydroalcoholic extract of *L. racemosa* by in vitro DPPH (A) and ABTS (B) methods at different concentrations compared to ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) standards, respectively.

The results presented in Figure 1 show that the extract promotes increased antioxidant activity with increasing concentration for both activity assays. Similar profile were obtained by Ahmed et al. (2014), Kaneria et al. (2018) and Bui et al. (2021) evaluating different extracts of plants belonging to the Combretaceae family. Through the

obtained curves it was possible to determine the EC50 values (concentration capable of capturing radicals by 50%) for the extract for each of the assays. Table 2 shows the EC50 values for the extract and for the standards ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT).

Table 2. EC50 results for *L. racemosa* hydroalcoholic extract and for ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) standards against DPPH and ABTS assays

Samples	DPPH EC ₅₀ (µg/mL)	ABTS EC ₅₀ (µg/mL)
<i>L. racemosa</i> extract	41,90 ± 3,15	21,78 ± 0,5
Ascorbic Acid	18,97 ± 0,4	5,24 ± 0,1
Butylated Hydroxytoluene (BHT)	7,75 ± 0,1	13,37 ± 0,01

Average ± Standard Deviation

The results presented in Table 2 show that the hydroalcoholic extract presented lower results when compared to the evaluated standards. This fact indicates that the extract presents moderate antioxidant activity in vitro. Moreover, it showed better results for the ABTS radical scavenging assays when compared to the DPPH assay.

This better result may be related to the versatility of the ABTS radical scavenging method when compared to the DPPH radical scavenging assay, since the latter shows better results when the molecules evaluated are polar, while the ABTS assay evaluates polar and apolar compounds at the same time (Floegel et al. 2011; Schaich et al. 2015). Similar data to those expressed in Table 2 were found by Ibrahim and collaborators (2022), of which their DPPH showed IC 50 of 50.3 µg/ml for mangrove ethyl acetate extract (MEE).

Similar results were obtained by Ahmed et al. (2014) obtained mean EC 50 values of the extracts for DPPH and ABTS antioxidant assays ranging from 0.21 - 12 µg/mL (*Combretum padoides*), 0.25 - 16 µg/mL (*Combretum vendae*), 0.33-9.41 µg/mL (*Combretum woodii*) and 4, 97-85 µg/mL (*Combretum bracteosum*), respectively, while the mean EC 50 values for the positive controls ascorbic acid and trolox were 1.28 - 1.51 and 1.02-1.19 µg/mL, respectively. All crude extracts inhibited lipid peroxidation of linoleic acid by more than 80% at the concentration of 64 µg/mL.

Awotunde et al. (2017) evaluating the Hydroethanol and Saponin fractions from *Terminalia schimperiana* root found that the polar hydroethanol fraction showed potent DPPH

antioxidant activity with EC50 value of 19.36 ± 0.436 µg/mL and ABTS elimination activity with EC50 value of 0.9420 ± 0.011 µg/mL, while the Saponin fraction has moderate DPPH elimination activity with EC50 of 59.33 ± 0.417 µg/mL and moderate ABTS elimination activity with EC50 value of 2.273 ± 0 µg/mL.

Sousa et al. (2021) performing different antioxidant assays, found that the intermediate fraction of the stem bark (28.5 ± 0.60 µg/mL) and the ethyl acetate fraction of the leaves (40 ± 0.56 µg/mL) showed higher % inhibition of DPPH free radical activity, while the intermediate stem bark fraction (27.5 ± 0.9 µg/mL) and the hydromethanol fraction of the leaves (81 ± 1.4 µg/mL) demonstrated inhibition of the ABTS free radical. These results show that the hydroalcoholic extract of *L. racemosa* can be used as a promising antioxidant agent.

Acute Toxicity Evaluation

The results of the toxicity assays showed that the hydroalcoholic extract of *L. racemosa* was not able to promote signs of toxicity and mortality within a period of 14 days after administration of the extract. The lethal dose, 50% (LD50) of this extract was estimated to be above 2000 mg/kg. Furthermore, the results indicated no statistically significant differences between control and extract treated mice in the amount of food, weight, water consumed and the relative weight of different organs (lung, ovary, brain, heart, kidney, liver, spleen and stomach) as presented in Table 3.

Table 3. Ponderal evolution, water and feed consumption, and relative weight of the organs of mice in the control group and the group treated with hydroalcoholic extract of *L. racemosa* leaves at a dose of 2,000 mg/kg.

Parameters	Control	EHA-L.r
Initial weight (g)	25,1 ± 1,58	24,7 ± 1,81
Final weight (g)	36,0 ± 1,08	34,4 ± 2,67
Water consumption per animal (mL)	10,67 ± 0,95	11,20* ± 0,74*
Feed consumption per animal (g)	5,69 ± 0,41	6,49* ± 0,18*
Relative weight of organs (%)	Control	EHA-L.r
Lung	9,70 ± 0,46	9,04 ± 0,37
Ovary	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Brain	4,17 ± 0,46	4,09 ± 0,33
Heart	1,82 ± 0,26	1,58 ± 0,42
Kidney	6,00 ± 0,64	6,27 ± 0,69
Liver	56,00 ± 0,64	53,15 ± 5,86
Spleen	6,27 ± 0,69	7,30 ± 0,85
Stomach	10,27 ± 0,69	10,01 ± 0,47

Mean ± Standard Deviation; *p<0.05. Significant after two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test with 95% confidence interval when compared to the control group.

In addition to weight, water consumption, food consumption, and relative organ weight, the effects of the hydroalcoholic extract of *L. racemosa* on biochemical and hematological parameters were analyzed. These results are presented in Table 4.

Table 4. Biochemical and hematological parameters of the control and treated groups with hydroalcoholic extract of *Laguncularia racemosa* in acute toxicity at a dose of 2,000 mg/kg.

Biochemical parameters	Control	EHA-L.r
ng/dL)	: 9,73	: 7,33
ine (mg/dL)	0,03	: 0,06
J/L)	± 63,3	± 24,6
I/L)	: 9,50	: 23,6
e Phosphatase (U/L)	± 36,7	± 30,1
Total (g/dL)	: 1,12	: 0,52
n (g/dL)	: 0,26	: 0,21
z (mg/dL)	± 10,8	: 9,29
Hematological Parameters	Control	EHA-L.r
RBC (mm ³)	: 0,33	: 0,41
Hemoglobin (g/dL-1)	± 0,03	: 0,05
Hematocrit (%)	,31	,46
MCV (fL)	: 0,05	: 0,07

MCHC (pg)	± 0,07	± 0,01
MCHC (%)	± 0,32	± 0,28
Platelets (mm3)	3 ± 0,26	3 ± 0,21
Total Leukocytes (mm3)	: 0,48	: 0,29
Segmented neutrophils (%)	40	45
Eosinophils (%)	01	04
Lymphocytes (%)	57	50
Monocytes (%)	02	01

Mean ± Standard Deviation; *p<0.05. Significant after two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test with 95% confidence interval when compared to the control group.

Biochemical and hematological parameters remained in the normal range, with no statistically significant difference between the mice in the EHA-Lr treated and untreated groups (Table 3). Non-significant levels of toxicity of other hydroalcoholic extracts obtained by different species of the Combretaceae family in animal models have been described in the literature.

Kpemi et al. (2020) evaluating the toxicity of the hydroalcoholic extract of *Combretum micranthum* found that during the acute toxicity assay, no mortality or adverse effects were observed at the dose of 5,000 mg/kg. Daram et al. (2021) evaluating the ethanolic extract of *Terminalia catappa*, found that during the 14-day observation period, no adverse symptoms were found without any mortality for the maximum dose administered during the study (4,000 mg/kg). Similar results were obtained by Vilegas et al. (2018) who evaluating the hydroethanolic extract of *Terminalia argentea* Mart. Leaves found that the doses of 1000 and 2000 mg/kg did not alter the weight gain of mice over the 14-day period nor did it alter the relative weight of the organs analyzed. No macroscopic changes were observed in the organs analyzed.

Jayesh et al. (2017), demonstrated low toxicity for *Terminalia bellirica* (Gaertn.) extract. Meanwhile, a review on the toxicity of *Terminalia sericea* Burch. ex DC. evidenced that some compounds and extracts of this plant had moderate toxicity (Mongalo et al. 2016).

Moreover, the cited studies show that the evaluated extracts were not able to promote changes in biochemical and hematological parameters of different animals. These findings thus reinforce the importance of pharmacological research on representatives of this family.

Carrageenan-induced paw edema test

The results of the carrageenin-induced paw edema test were presented in Figure 2. The animals that received the intraplantar injection of carrageenan demonstrated the

induction of edema, which was evidenced by the increase in volume of the paws that received the stimulus being analyzed at different time intervals. The group of animals pre-treated only with the vehicle (water) showed extremely significant edema when compared to indomethacin and to all doses of the extract EHA-Lr at all corresponding times. The extract EHA-Lr in all doses tested proved to be efficient in reducing the edema provoked by carrageenan at all observed times.

In this mouse model of paw edema, the extract EHA-Lr significantly reduced edema volume and showed superior inhibition compared to indomethacin. The paw edema induced by carrageenan in rats is associated with the synthesis of mediators involved in the inflammatory process (Farça et al. 2001; Hamad et al. 2019; Sharma et al. 2020). Among these we can highlight some of the most relevant ones such as: histamine, serotonin, bradykinin, nitric oxide and prostaglandins, whose release is closely related to the chemotaxis process of cells in particular leukocytes to the inflammatory sites (Farça et al. 2001; Hajare et al. 2001).

Although the carrageenan-induced paw edema model is more resistant in mice, this logistic agent is also capable of inducing edema formation. Studies have shown that albumin in mice demonstrates extravasation for more than 24 hours after its stimulation (Henriques et al. 1987; Farça et al. 2001; Hajare et al. 2001; Hamad et al. 2019; Siraj et al. 2021). The paw edema performed in mice can be described through two very distinct phases characterized as follows: the 1st phase corresponding to (0 - 24 hours) after the inflammatory stimulus, and the 2nd phase (after 24 hours). In the initial period corresponding to the 1st phase a predominance of neutrophils occurs, they in turn have the ability to release inflammatory agents such as histamine, bradykinin, serotonin, and prostaglandins (Henriques et al. 1987; Farça et al. 2001; Hajare et al. 2001; Hamad et al. 2019; Siraj et al. 2021).

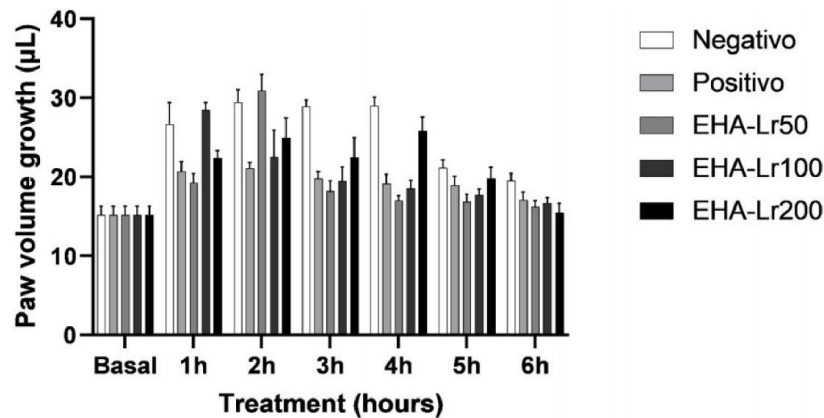


Fig.2. Effect of EHA-Lr extract (50, 100 and 200mg/kg, v.o) and indomethacin (10mg/kg, v.o) on paw edema formation in mice. Mean $\pm$ Standard Deviation; * $p < 0.05$. Significant after two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test with 95% confidence interval when compared to the control group.

The mechanism by which the inhibition of edema formation occurs is directly linked to the synthesis of PGs, and is compatible with the action generated by drugs classified as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), where the cyclooxygenases pathway is involved.

Hydroalcoholic extracts of different species belonging to Combretaceae family. Sharma et al. (2020) found that using the ethanolic extract of the stem bark of *Anogeissus latifolia* prevented paw volume increase in both in vivo models with percentage of inhibition of 44.40 and 46.21, respectively at 5 hours. To this end, Hamad and colleagues (2019) found that the ethanolic extract of *Combretum aculeatum* Vent at a concentration of 400 mg/kg decreased paw edema (only $32 \pm 1.9\%$ increase in

paw weight after 4 hours) compared to indomethacin ($28.6 \pm 2.5\%$). Similar results to the current study (Figure 2), were obtained by Siraj et al. (2021) evaluating the anti-inflammatory effect of *Terminalia myriocarpa* ethanolic extract in paw edema trials found that doses of 250 and 500 mg/kg were able to reduce edema and showed promising results when compared to carrageenan. These results show that the extracts obtained from different species belonging to the Combretaceae family are able to reduce paw edema in different animals.

LPS-induced acute lung inflammation

Figure 3 presents the results of the effect of EHA-Lr extract (50, 100 and 200mg/kg, v.o) and dexamethasone (0.5mg/kg, v.o) on leukocyte migration in acute lung inflammation.

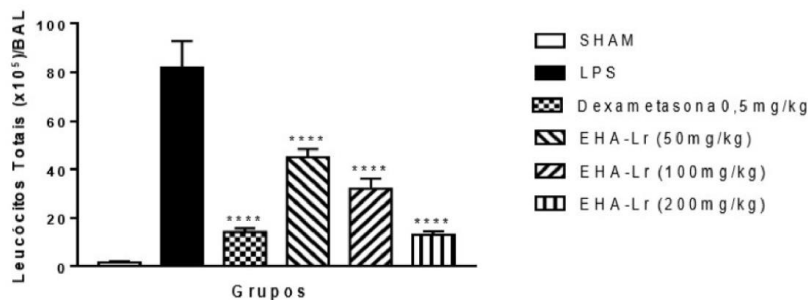


Fig.3. Effect of EHA-Lr extract (50, 100 and 200mg/kg, v.o) and dexamethasone (0.5mg/kg, v.o) on leukocyte migration in acute lung inflammation.

EHA-Lr extract has been shown to significantly reduce the migration of polymorphic nucleated leukocytes in the

brochoalveolar lavage of animals subjected to LPS-induced acute lung inflammation. According to Liang et al. (2018) LPS is the main activator of inflammatory cells, being further responsible for the induction of neutrophils and active participation in the production and release of inflammatory cytokines, stating that the reduction of these inflammatory cytokines exerts proven therapeutic effects.

The reduction in the amount of leukocytes in the inflammatory brochoalveolar exudate when compared to the values found in the vehicle group and the group that received the reference drug (dexamethasone 0.5mg/kg, v.o.). It was also observed that the reduction of leukocyte migration in the brochoalveolar lavage in the model of acute lung inflammation was closely related to the dose used of EHA-Lr extract because the higher the dose used the greater was the reduction in the number of cells observed.

For Gao et al. (2020), pleurisy is associated with pleural inflammation and oxidative stress. The injury produced in the lungs and the inflammatory induction by carrageenan increases the levels of inflammatory cell exudates, protein leakage, and the pro-inflammatory mediators themselves. Similar results to those presented in figure 3 were obtained by Moreira et al. (2020), who found that treatment with *T. argentea* extract was able to reduce total protein production after stimulation with LPS, especially when the 300 mg/kg concentration was used, when compared to the other concentrations (5 and 60 mg/kg) or vehicle. Furthermore, according to the reduction of total proteins in the pleurisy process ascertained, the plant extract at the highest concentration (300 mg/kg), reduced the number of neutrophils and mononuclear cells at the same site. To a lesser extent, a reduction in the number of neutrophils was observed in mice treated with 5 and 60 mg/kg of the plant extract, when compared to those that received vehicle alone.

Other studies using the same pleurisy model, such as that of Silva-Balin et al. (2018), also demonstrated anti-inflammatory activity at 300 mg/kg, however, the authors used an ethanolic extract obtained from the fruit of *Bromelia balansae*. According to Shorkry and colleagues (2022), the induction of acute inflammation in vivo by LPS provides significant data for evaluating the pharmacological activity

of extracts. The same highlights that Ivy ethanolic extract at 200mg/kg especially decreased LPS-induced pro-inflammatory mediators and oxidative stress. Thus, corroborating with the findings of this study (Figure 3), considering that the EHA-Lr extract at 200mg/kg reduced the number of neutrophils as much as its treatment with dexamethasone.

In another study, Daram et al. (2021) evaluating the ethanolic extract of *Terminalia catappa* found that at the concentration of 500 mg/kg it was able to promote the decrease in total leukocyte count, lymphocyte count and myeloperoxidase enzyme activity. To this end, the granulocyte count was increased in almost all three treatments and the percentage data of total leukocyte, granulocyte, and MPO activity. Thus, the anti-inflammatory potential without causing acute toxicity of extracts from medicinal plants, such as those reported in this study, may contribute to new pharmaceutical applications.

Thus, murine models provide suitable frameworks for studying the anti-inflammatory activity of medicinal plants, mainly by counting cell migration during a stimulation of an inflammation-inducing agent. In this context, Talwar et al. (2021) found that the aqueous extract of *Terminalia paniculata* (400 mg/kg) also reduced carrageenan-induced leukocyte migration ($50.92 \pm \pm 5.24\%$) in exudates found due to stimulation with LPS. These results show that the hydroalcoholic extract of *Laguncularia racemosa* has promising anti-inflammatory activity for the treatment of lung inflammation.

In vitro antibacterial activity

The results of antibacterial activity showed that the extract EHA-Lr proved to be very effective in inhibiting bacterial growth with considerably satisfactory values, being able to inhibit the growth of *Micrococcus luteus* strain (UFPEDA 100). The other strains showed moderate to low results when compared to the erythromycin control (Table 5). The mechanisms of antimicrobial activity promoted by different extracts are not yet well elucidated, however, it is known that phenolic compounds are responsible for the in vitro activity (Puupponen-Pimiä et al. 2001; Gomes et al. 2022).

Table 5. Determination of the minimum inhibitory concentration of EHA-Lr against the tested bacterial strains

Nd: Not determined of the evaluated concentrations 0.23 to 30mg/mL

Microorganisms	Erythromycin (mg/mL)	EHA-Lr (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 02)	0,6	7,5
<i>Micrococcus luteus</i> (UFPEDA 100)	0,6	0,93
<i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA 86)	1,2	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 416)	Nd	3,75
<i>Serratia marcescens</i> (UFPEDA 352)	0,6	3,75
<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA 224)	1,2	3,75
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA 138)	0,3	3,75

Philomène-Kokora (2013) found that the ethanolic and aqueous extracts of *Terminalia mantaly* H. Perrier (Combretaceae) show inhibitory activity on all tested strains (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*). The inhibitory diameters ranged from 7.66 mm to 35 mm. The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of the extracts ranged from 0.78 mg/mL and 2.5 mg/mL. The ethanolic extracts inhibit the growth of bacteria at lower concentrations than the aqueous extracts.

Kuet et al. (2010) when evaluating the antimycobacterial, antimicrobial and antifungal activities of a species from the same family found that individuals belonging to the combretaceae family have excellent minimum inhibitory concentration values for bacterial strains such as: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Anokwuru et al. (2021) evaluated the broad-spectrum antibacterial potential of methanolic extracts of species representing four genera of Combretaceae (*Combretum*, *Pteleopsis*, *Quisqualis*, *Terminalia*). They found that these were more active against *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium* strains, with mean MIC values of 0.70 mg/mL, 0.52 mg/mL and 0.45 mg/mL, respectively. These findings show that the hydroalcoholic extract of *Laguncularia racemosa* has promising anti-inflammatory activity for the treatment of bacterial inflammation.

IV. CONCLUSION

The hydroalcoholic extract of *Laguncularia racemosa* showed moderate antioxidant and antibacterial activity in vitro. Regarding anti-inflammatory activity, it was able to reduce paw edema in mice and prevent acute lung inflammation. The results obtained in this study provide supportive data for the use of *Laguncularia racemosa* for therapeutic purposes.

V. CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CNPQ and CAPES for the structural and financial support to this work.

REFERENCES

- [1] Ahmed, A. S., McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2014). Polarity of extracts and fractions of four Combretum (Combretaceae) species used to treat infections and gastrointestinal disorders in southern African traditional medicine has a major effect on different relevant in vitro activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(2), 339-350.
- [2] Ahmed, A. S., McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2014). Polarity of extracts and fractions of four Combretum (Combretaceae) species used to treat infections and gastrointestinal disorders in southern African traditional medicine has a major effect on different relevant in vitro activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(2), 339-350.
- [3] Albuquerque Nerys, L. L., Jacob, I. T. T., da Silva, A. R., de Oliveira, A. M., da Rocha, W. R. V., Pereira, D. T. M., ... & de Lima, M. D. C. A. (2022). Photoprotective, biological activities and chemical composition of the non-toxic hydroalcoholic extract of *Clarisia racemosa* with cosmetic and pharmaceutical applications. *Industrial Crops and Products*, 180, 114762.
- [4] Anokwuru, C. P., Sandasi, M., Chen, W., van Vuuren, S., Elisha, I. L., Combrinck, S., & Viljoen, A. M. (2021). Investigating antimicrobial compounds in South African Combretaceae species using a biochemometric approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 269, 113681.
- [5] Awotunde, O. S., Dhanabal, S. P., Rajeshkumar, R., & Chasitainya, M. V. N. L. (2017). Antioxidant activities of

- Hydro-ethanol and Saponin extracts of Terminalia schimperi ana root.
- [6] Bui, N. T., Pham, T. L. T., Nguyen, K. T., Le, P. H., & Kim, K. H. (2021). Effect of Extraction Solvent on Total Phenol, Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of Avicennia Officialis.
 - [7] Costa, F. D. N., Jerz, G., Hewitson, P., Figueiredo, F. D. S., & Ignatova, S. (2021). Laguncularia racemosa phenolics profiling by three-phase solvent system step-gradient using high-performance countercurrent chromatography with off-line electrospray mass-spectrometry detection. *Molecules*, 26(8), 2284.
 - [8] Daram, P., Jitta, S. R., Shreedhara, C. S., Misra, C. S., Gourishetti, K., & Lobo, R. (2021). Investigation of anti-inflammatory and anti-arthritis potentials of Terminalia catappa bark using in vitro assays and carrageenan-induced inflammation, complete Freund's adjuvant induced arthritis model in rats. *South African Journal of Botany*, 141, 313-321.
 - [9] Daram, P., Jitta, S. R., Shreedhara, C. S., Misra, C. S., Gourishetti, K., & Lobo, R. (2021). Investigation of anti-inflammatory and anti-arthritis potentials of Terminalia catappa bark using in vitro assays and carrageenan-induced inflammation, complete Freund's adjuvant induced arthritis model in rats. *South African Journal of Botany*, 141, 313-321.
 - [10] de Araújo Moreira, M. D. R., Sales-Campos, H., Fontanari, C., Meireles, A. F. G., Prado, M. K. B., Zoccal, K. F., ... & Faccioli, L. H. (2020). The ethanolic extract of Terminalia argentea Mart. & Zucc. bark reduces the inflammation through the modulation of cytokines and nitric oxide mediated by the downregulation of NF- κ B. *Journal of Ethnopharmacology*, 261, 113150.
 - [11] do Nascimento Santos, D. K., de Melo, C. M. L., da Silva, E. M., de Almeida, V. S., da Cruz Filho, I. J., de Souza Lima, G. M., ... & Vieira, J. R. C. (2021). Investigation of Nutritional Contents, Antioxidant and Immunostimulatory Activities of Aqueous Extract from Laguncularia racemosa Leaves. *The Natural Products Journal*, 11(2), 231-243.
 - [12] Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.
 - [13] Gao, Y., Lv, X., Yang, H., Peng, L., & Ci, X. (2020). Isoliquiritigenin exerts antioxidative and anti-inflammatory effects via activating the KEAP-1/Nrf2 pathway and inhibiting the NF- κ B and NLRP3 pathways in carrageenan-induced pleurisy. *Food & function*, 11(3), 2522-2534.
 - [14] Gomes, L., Monteiro, P., Cotas, J., Gonçalves, A. M., Fernandes, C., Gonçalves, T., & Pereira, L. (2022). Seaweeds' pigments and phenolic compounds with antimicrobial potential. *Biomolecular Concepts*, 13(1), 89-102.
 - [15] Hamad, K. M., Sabry, M. M., Elgayed, S. H., El Shabrawy, A. R., El-Fishawy, A. M., & Jaleel, G. A. A. (2019). Anti-inflammatory and phytochemical evaluation of Combretum aculeatum Vent growing in Sudan. *Journal of ethnopharmacology*, 242, 112052.
 - [16] Ibrahim, H. A., Abdel-Latif, H. H., & Zaghloul, E. H. (2022). Phytochemical composition of Avicennia marina leaf extract, its antioxidant, antimicrobial potentials and inhibitory properties on Pseudomonas fluorescens biofilm. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 48(1), 29-35.
 - [17] Ita, B. N., & Eduok, S. I. (2022). In vitro antioxidant and antifungal activities of Rhizophora racemosa GFW Mey. stem bark extracts. *Scientific African*, 15, e01091.
 - [18] Kaneria, M. J., Rakholiya, K. D., Marsonia, L. R., Dave, R. A., & Golakiya, B. A. (2018).
 - [19] Nontargeted metabolomics approach to determine metabolites profile and antioxidant study of Tropical Almond (Terminalia catappa L.) fruit peels using GC-QTOF-MS and LC-QTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 160, 415-427.
 - [20] Kpemi, M., Metowogo, K., Melila, M., Veerapur, V. P., Negru, M., Taulescu, M., ... & Aklikokou, K. (2020). Acute and subchronic oral toxicity assessments of Combretum micranthum (Combretaceae) in Wistar rats. *Toxicology reports*, 7, 162-168.
 - [21] Maobe, M. A. G., Gitu, L., & Gatebe, E. (2022). Evaluation of total content phenolic, flavonoid and tannin of herbs used in treatment of ailments in Kisii and Nyamira Counties region, Kenya. *Herbal Medicines Journal (Herb Med J)*, 7(1).
 - [22] Melo, C. M. L. D., Sousa, G. F. D., Silva, G. A. D. S., Silva, R. S. D., Bezerra Júnior, N. D. S., Santos, D. K. D. D. N., ... & Cruz Filho, I. J. D. (2022). Pectin-like Polysaccharide Extracted from the Leaves Caesalpinia pulcherrima is a Promising Antioxidant and Immunomodulator Agent. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65.
 - [23] Mendes, R. J. D. A., Pereira Filho, A. A., Nogueira, A. D. J. L., Araújo, K. R. F., França, C. R. C., Carvalho, I. B. D., ... & Rosa, I. G. (2018). Evaluation of molluscicidal activity of three mangrove species (Avicennia schaueriana, Laguncularia racemosa and Rhizophora mangle) and their effects on the bioactivity of Biomphalaria glabrata Say, 1818. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 60.
 - [24] Philomène KOKORA, A. (2013). Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of four medicinal plants on the in vitro growth of escherichia coli and staphylococcus aureus. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 3(3), 113-116.
 - [25] Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*, 90(4), 494-507.
 - [26] Rodrigues, C. F. B., Gaeta, H. H., Belchor, M. N., Ferreira, M. J. P., Pinho, M. V. T., de Oliveira Toyama, D., & Toyama, M. H. (2015). Evaluation of potential thrombin inhibitors from the white mangrove (Laguncularia racemosa (L.) CF Gaertn.). *Marine Drugs*, 13(7), 4505-4519.
 - [27] Royani, A., Hanafi, M., Julistiono, H., & Manaf, A. (2022). The total phenolic and flavonoid contents of Aloe vera and Morinda citrifolia extracts as antibacterial material against Pseudomonas aeruginosa. *Materials Today: Proceedings*.
 - [28] Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical

- evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functional foods*, 14, 111-125.
- [29] Sharma, V. C., Kaushik, A., Dey, Y. N., Srivastava, B., Wanjari, M., & Jaiswal, B. (2020). Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of ethanolic extract of stem bark of *Anogeissus latifolia* Roxb. *Clinical Phytoscience*, 6(1), 1-9.
- [30] Shokry, A. A., El-Shiekh, R. A., Kamel, G., Bakr, A. F., & Ramadan, A. (2022). Bioactive phenolics fraction of *Hedera helix* L. (Common Ivy Leaf) standardized extract ameliorates LPS-induced acute lung injury in the mouse model through the inhibition of proinflammatory cytokines and oxidative stress. *Heliyon*, e09477.
- [31] Silva Balin, P., Zanatta, F. C., Jorge, B. C., Leitão, M., Kassuya, R. M., Cardoso, C. A. L., ... & Arena, A. C. (2018). Toxicological evaluation and anti-inflammatory potential of an ethanolic extract from *Bromelia balansae* (Bromeliaceae) fruit. *Journal of ethnopharmacology*, 222, 79-86.
- [32] Siraj, M. A., Howlader, M. S. I., Islam, M. A., Irin, T., & Simal-Gandara, J. (2021). Regulation of the redox signaling and inflammation by *Terminalia myriocarpa* leaves and the predictive interactions of its major metabolites with iNOS and NF- κ B. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, 114459.
- [33] SOARES, C. L. R. (2018). *Avaliação da atividade cicatrizante in vitro e in vivo do extrato hidroalcoólico de Laguncularia racemosa (L) CF Gaertn* (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco).
- [34] Sousa, H. G., Uchoa, V. T., Cavalcanti, S. M. G., de Almeida, P. M., Chaves, M. H., Lima Neto, J. D. S., ... & de Sousa, E. A. (2021). Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant and cytogenotoxicity activities of *Combretum leprosum* Mart (Combretaceae). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 84(10), 399-417.
- [35] Stoppa, M. A., Casemiro, L. A., Vinholis, A. H. C., Cunha, W. R., Silva, M. L. A., Martins, C. H. G., & Furtado, N. A. J. C. (2009). Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Química Nova*, 32, 498-502.
- [36] Talwar, S., Nandakumar, K., Nayak, P. G., Bansal, P., Mudgal, J., Mor, V., ... & Lobo, R. (2011). Anti-inflammatory activity of *Terminalia paniculata* bark extract against acute and chronic inflammation in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 134(2), 323-328.
- [37] Vilegas, W., Tangerina, M. M. P., Ascêncio, S. D., Soares, I. M., Pavan, E., Damazo, A. S., ... & de Oliveira Martins, D. T. (2018). Chemical characterisation and toxicity assessment in vitro and in vivo of the hydroethanolic extract of *Terminalia argentea* Mart. leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 227, 56-68.
- [38] Wang, W., Xiong, P., Zhang, H., Zhu, Q., Liao, C., & Jiang, G. (2021). Analysis, occurrence, toxicity and environmental health risks of synthetic phenolic antioxidants: A review. *Environmental Research*, 201, 111531.
- [39] Xu, X., Liu, A., Hu, S., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Wang, X., ... & Martínez, M. A. (2021). Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. *Food Chemistry*, 353, 129488.