



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PEDRO PAULO MARCELINO NETO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS
EXTRATOS DE *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn EM MODELO DE LESÃO
PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM
CAMUNDONGOS**

Recife
2023

PEDRO PAULO MARCELINO NETO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS
EXTRATOS DE *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn EM MODELO DE LESÃO
PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito para obtenção do título de doutor em Ciências
Biológicas. Área de Concentração: Biologia Química para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Co-orientadora: Profa. Dra. Leydianne Leite de Siqueira Patriota

Recife
2023

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Marcelino Neto, Pedro Paulo.

Avaliação da toxicidade e da atividade anti-inflamatória dos extratos de *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos / Pedro Paulo Marcelino Neto. - Recife, 2023.
120f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2023.

Orientação: Emmanuel Viana Pontual.

Coorientação: Leydianne Leite de Siqueira Patriota.

Inclui referências e anexos.

1. Combretaceae; 2. Antioxidante; 3. Anti-inflamatório; 4. Lesão pulmonar aguda; 5. COVID-19. I. Pontual, Emmanuel Viana. II. Patriota, Leydianne Leite de Siqueira. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

PEDRO PAULO MARCELINO NETO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS
EXTRATOS DE *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn EM MODELO DE LESÃO
PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito para obtenção do título de doutor em Ciências
Biológicas. Área de Concentração: Biologia Química para Saúde.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Cristiane Maria Varela de Araújo de Castro (Examinadora externa)
Universidade de Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Cynthia Layse Ferreira de Almeida (Examinadora externa)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Profa. Dra. Natalie Emanuelle Ribeiro Rodrigues (Examinadora externa)
Universidade de Pernambuco

*Dedico ao Senhor Jesus, para
a honra e glória do Seu Nome*

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as vezes que Ele mostrou que os seus planos são maiores que os meus, segurando a minha mão e me fazendo continuar até onde Ele quer que eu chegue. Obrigado Pai, pois foi só por meio da Tua graça que eu cheguei até aqui.

À Michelly, minha linda esposa, e aos meus amados filhos, Pietro e Lucca, por renovarem as minhas forças todos os dias. Meu amor, só nós sabemos contar quantas noites em claro, quantas farmácias credenciadas, quantas idas as unidades de saúde, quantos abraços e lágrimas. Mas também só nós sabemos valorizar cada sorriso que trocamos após cada dia do renovo de Deus entrar pela nossa porta através desses meninos. Amo vocês demais!

Aos meus pais, Fernando e Solange, por serem o meu alicerce e o lugar de conforto onde posso sempre me sentir seguro. Obrigado por serem esse porto para mim e por todo o sangue que suaram em favor da minha educação, espero ter conseguido honrar esse esforço. Amo vocês demais!

Às minhas sogras, Cláudia e Odete, as quais ainda procurarei formas de agradecê-las por longo período. Numa fase onde tempo para escrever foi escasso, vocês o transbordaram na minha caminhada. O acolhimento, a atenção e o carinho das senhoras aquecem o meu coração e me fazem chama-las de mães. Obrigado pela paciência e por tornarem o cantinho de vocês um lar para mim. Abraço ao meu cunhado Antonildo!

Ao meu orientador, Emmanuel, por sua extrema competência e parceria, mas principalmente por ter aceitado o desafio dessa orientação e ter me ajudado a erguer esse trabalho. Mano, você se mostrou um grande companheiro, além de um excelente profissional, comprovando que a pós-graduação não precisa ser um pesadelo a despeito das estatísticas, mas pode ser leve e prazerosa. És um exemplo de profissional para mim, onde almejo chegar. Menção honrosa para Welton, por ter sido a via expressa dessa parceria, então, muito obrigado grandão e um beijo para Bellinha!

À irmã Amara por ser uma bênção de Deus na minha vida. Seus ouvidos e conselhos me guiaram até o fim desse ciclo. No período onde eu não via como seguir em frente, a graça de Deus se fez presente também através da senhora. I love you, Baby!

À minha irmã, Thayana, e meu sobrinho Saulo, por serem uma luz na minha vida. Sou muito orgulhoso da mãe que você se tornou para esse gordinho lindo. Amo vocês e grande abraço para meu cunhado Sudarsam.

À madrinha de Pietro e também prima minha, Bruna, por nos socorrer sempre que precisamos e pelo zelo que tem pelos meninos. Apesar do seu jeito peculiar, te agradeço muito e amo você entre uma torta de bacalhau e outra!

À minha família por ser a base de tudo. Tias e tios; e, agora, mais primos e primas. Meu grande amor por vocês se mistura às nossas trocas de sorrisos, que me dão forças para continuar. Obrigado a todos!

À família da minha esposa por serem tão adoráveis e leves. Obrigado pelo acolhimento e pelas risadas proporcionadas.

À Gênesis por ser o exemplo da frase "há amigos mais chegados que irmãos". Todo o seu amor me sustentou por diversas vezes, irmão, e obrigado por ter sido meus olhos e ouvidos em ambiente hostil. Meu amor por você vai além dessa vida. Um beijão para Andrezza!

À Carol e Caio por terem se tornado verdadeiros amigos, para além da pesquisa, e irmãos em Cristo. Uma grande fatia desse trabalho pertence a vocês. Obrigado pela parceira e amizade que cultivamos, vencendo tudo e todos ao longo desses anos. Amo vocês!

Aos amados amigos, Larissa e Henrique; Gabi e Cristiano, com os pequeninos Larinha e Pedrinho. Ver como nossa amizade evoluiu para um nível verdadeiramente familiar acalenta o meu coração. Obrigado por estarem comigo em todos os momentos. Amo vocês!

Ao querido amigo, Rafael, por ser tão companheiro e carinhoso. Por vezes, chato, mas sempre amoroso. A distância não diminui nem um pouco meu amor por você. Um abraço gigante para o adorável Ademílton.

À turma que representa o banquinho do BO e os seus, respectivos, cônjuges. Amigos, nos tornamos uma família apesar da distância, e as nossas risadas juntos, trocas de experiência e parceria é sempre um gás a mais nessa vida. Amo vocês!

Aos queridos companheiros do Sesc, Cleidinha, Paulinho, Mylenna e Cleitinho que levarei para a vida por serem pessoas tão incríveis. Em especial, Serginho, por ser esse queridão de coração enorme que não cabe no peito, obrigado pelo carinho e atenção de todas as horas; Renatinho, meu irmão em Cristo Jesus, você é um dos grandes presentes que Deus me proporcionou, obrigado por ser tão parceiro e me aperriar todo dia pra saber como está minha família e eu; Carolzinha por ser tão atenciosa em todos os momentos, principalmente na preocupação com meus filhos, obrigado pela sua amizade; Por fim, o grão mestre Laércio, que de mestre têm pouca coisa, mas de “pós-doutoramento” tem muita. Obrigado querido amigo por me tornar um pouco mais erudito a cada dia, e as tuas ironias e sarcasmos tornam a vida mais divertida, obrigado pelas conversas de sempre. Abraço gigante para todos!

À todos que contribuíram para essa Tese, ao longo desses anos. Em especial, para minha co-orientadora, Leyde e o parceiro de reta final, Jainaldo. Essa vitória pertence a vocês também. Obrigado!

Às minhas mentoras, Tati e Fernanda, por terem ensinado as minhas primeiras passadas. Em especial, para Marllon, que nunca desistiu de mim e me carregou pelo braço diversas vezes até chegar onde cheguei. Sem você eu não estaria aqui. Abraço, querido amigo!

À minha eterna IC, Alícia, por ter me ensinado a sorrir para Cristo nos momentos mais difíceis. Um beijo, minha filha!

À Lidiane, cuja parceria e o carinho romperam as paredes da pesquisa. Torço de longe sempre para o seu sucesso e sei que a recíproca é verdadeira. Beijos!

À Sylvania por ter oferecido, além da sua colaboração com o trabalho, um lugarzinho aconchegante e uma boa prosa. Obrigado por ter renovado minha percepção de um ambiente saudável de trabalho.

Aos professores Jeymesson e Teresinha por terem auxiliado os meus passos e servirem de exemplo profissional. Em especial, Jeymesson pelo seu sorriso fácil e o acolhimento enquanto eu ainda era uma criança perdida na universidade. Obrigado!

Aos membros da banca por sua vasta competência e profissionalismo. À professora Cristiane por ter aceitado o convite. Ao professor Thiago por ser um incrível coordenador humano, elogiado pela maioria esmagadora dos alunos. E as minhas adoráveis colegas, Cynthia e Natalie, às quais caminham comigo e hoje servem de exemplos brilhantes, como pessoas e profissionais. Estou muito honrado por terem aceitado o convite. Muito obrigado!

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Um grande abraço a todos!

RESUMO

A pandemia de Covid-19 intensificou as buscas por novos agentes terapêuticos no combate de doenças respiratórias visto o aumento da ocorrência de lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome respiratória aguda grave (SRAG). *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn (Combretaceae), conhecida popularmente como “mangue branco”, é amplamente distribuída no ecossistema manguezal e usada na medicina popular para tratamento de diarreia, feridas bucais e febre. Neste contexto, o objetivo desta Tese foi avaliar a toxicidade e as atividades antioxidante e anti-inflamatória dos extratos hexânico (EHLr), acetato de etila (EALr) e etanólico (EELr) das folhas de *L. racemosa* frente à LPA induzida por LPS em camundongos. Os extratos foram preparados pelo método de maceração e o seu perfil fitoquímico analisado por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo fotodiodo (CLAE-DAD). O teor de fenóis totais, flavonóis e proantocianidinas foi determinado e a atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelos métodos de DPPH, ABTS e fosfomolibdênio. A toxicidade *in vitro* dos extratos foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e pela atividade hemolítica, e o efeito na liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos intraperitoneais foi investigado. Os testes *in vivo* foram realizados com o extrato mais ativo de acordo com o perfil fitoquímico e a atividade antioxidante. Foi realizado o ensaio toxicológico agudo em camundongos com o EELr na dose de 2.000 mg/kg. O ensaio de LPA induzida por LPS foi realizado com o EELr nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e foram analisados a quantidade de leucócitos totais e diferenciada, além da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), níveis de óxido nítrico e citocinas, e análise histopatológica e histoquímica do colágeno nos pulmões. Foi identificado um maior teor de fenóis totais no EELr ($241,77 \pm 3,6$ mg EAG/g) quando comparado aos demais extratos, enquanto as proantocianidinas foram indicadas em maior quantidade no EHLr ($39,88 \pm 12,57$ mg EC/g). Na atividade antioxidante, do EELr apresentou uma concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH (CE_{50}) de $178,8 \pm 0,8$ μ g/mL e $275,5 \pm 0,9$ μ g/mL para ABTS em relação ao padrão trolox ($56,56 \pm 0,5$ μ g/mL e $36,7 \pm 0,6$ μ g/mL, respectivamente), enquanto EHLr e EALr não apresentaram atividade. Na avaliação da viabilidade de PBMC, os extratos apresentaram $CI_{50} > 100$ μ g/mL e, na atividade hemolítica, não foi detectada hemólise significativa. EELr não causou

alterações comportamentais, nas massas corporais e no consumo de água e ração pelos camundongos, e sua DL_{50} foi superior a 2.000 mg/kg. No ensaio de LPA, EELr reduziu significativamente o número de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células mononucleares sanguíneas presentes no lavado broncoalveolar dos camundongos inflamados. Ademais, EELr reduziu a atividade da MPO, os níveis de NO, IL-6, TNF- α e INF- γ , além de reestabelecer a integridade pulmonar e reduzir a fibrose, conforme as análises histológicas. Com base nos dados aqui apresentados, pode-se concluir que as folhas de *L. racemosa* são fonte de compostos fenólicos e possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória, com baixa toxicidade.

Palavras-chave: Combretaceae. Antioxidante. Anti-inflamatório. Lesão pulmonar aguda. Covid-19.

ABSTRACT

The Covid-19 pandemic has intensified the search for new therapeutic agents to combat respiratory diseases given the increase in the occurrence of acute lung injury (ALI) and severe acute respiratory syndrome (SARS). *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn (Combretaceae), popularly known as “white mangrove”, is widely distributed in the mangrove ecosystem and used in folk medicine to treat diarrhea, mouth sores and fever. In this context, the aim of this Thesis was to evaluate the toxicity and antioxidant and anti-inflammatory activities of hexane (EHLr), ethyl acetate (EALr) and ethanolic (EELr) extracts from *L. racemosa* leaves against LPS-induced ALI in mice. The extracts were prepared by the maceration method and their phytochemical profile was analyzed by thin layer chromatography (TLC), gas chromatography coupled to a mass spectrophotometer (GC-MS) and high performance liquid chromatography coupled to a photodiode array detector (HPLC- DAD). The content of total phenols, flavonols and proanthocyanidins was determined and the in vitro antioxidant activity was evaluated by DPPH, ABTS and phosphomolybdenum methods. The in vitro toxicity of the extracts was evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and by hemolytic activity, and the effect on the release of nitric oxide (NO) by intraperitoneal macrophages was investigated. In vivo tests were carried out with the most active extract according to the phytochemical profile and antioxidant activity. An acute toxicological test was carried out in mice with EELr at a dose of 2,000 mg/kg. The LPS-induced ALI assay was performed with EELr at doses of 50, 100 and 200 mg/kg and the amount of total and differentiated leukocytes were analyzed, in addition to the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO), levels of nitric oxide and cytokines, and histopathological and histochemical analysis of collagen in the lungs. A higher content of total phenols was identified in EELr (241.77 ± 3.6 mg EAG/g) when compared to the other extracts, while proanthocyanidins were indicated in greater quantities in EHLr (39.88 ± 12.57 mg EC/ g). In terms of antioxidant activity, EELr presented a concentration necessary to inhibit 50% of the DPPH radical (EC_{50}) of 178.8 ± 0.8 μ g/mL and 275.5 ± 0.9 μ g/mL for ABTS in relation to the trolox standard (56.56 ± 0.5 μ g/mL and 36.7 ± 0.6 μ g/mL, respectively), while EHLr and EALr showed no activity. In evaluating PBMC viability, the extracts showed $IC_{50} > 100$ μ g/mL and, in hemolytic activity, no significant hemolysis was detected. EELr did not cause behavioral changes, body masses or water and food consumption by the mice, and its

DL₅₀ was greater than 2,000 mg/kg. In the LPA assay, EELr significantly reduced the number of total leukocytes, neutrophils, eosinophils, macrophages and blood mononuclear cells present in the bronchoalveolar lavage of inflamed mice. Furthermore, EELr reduced MPO activity, levels of NO, IL-6, TNF- α and INF- γ , in addition to reestablishing lung integrity and reducing fibrosis, according to histological analyses. Based on the data presented here, it can be concluded that *L. racemosa* leaves are a source of phenolic compounds and have antioxidant and anti-inflammatory activity, with low toxicity.

Keywords: Combretaceae. Antioxidant. Anti-inflammatory. Acute lung injury. Covid-19.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS.....	19
2.1.1 Agentes Infecciosos	20
2.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO	23
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
2.4 LESÃO PULMONAR AGUDA.....	26
2.4.1 Fisiopatologia da Lesão Pulmonar Aguda	27
2.4.2 Tratamentos Atuais	29
2.5 PLANTAS MEDICINAIS	29
2.5.1 Metabólitos Secundários	30
2.5.2 Potencial Toxicológico	31
2.6 ECOSSISTEMA MANGUEZAL	32
2.7 FAMÍLIA COMBRETACEAE.....	34
2.7.1 <i>Laguncularia racemosa</i>	34
2.7.1.1 Aspectos Morfológicos.....	35
2.7.1.2 Considerações Biológicas	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>L. racemosa</i>	38
3.2 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	40
3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	40
3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector arranjo fotodiodo (CLAE-DAD)	41
3.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas (GC- MS)	41
3.2.4 Determinação do conteúdo de fenóis totais, flavonóis e proantocianidinas dos extratos de <i>L. racemosa</i>	42
3.2.4.1 Teor de fenóis totais dos extratos de <i>L. racemosa</i>	42

3.2.4.2 Teor de proantocianidina dos extratos de <i>L. racemosa</i>	42
3.2.4.3 Teor de flavonóis dos extratos de <i>L. racemosa</i>	43
3.3 ESTUDO ANTIOXIDANTE	43
3.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH.....	43
3.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS.....	44
3.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio	44
3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS	45
3.4.1 Obtenção e cultura de células.....	45
3.4.2 Animais.....	46
3.5 ESTUDO TOXICOLÓGICO	46
3.5.1 Ensaio de viabilidade celular frente a PBMC	46
3.5.2 Avaliação da atividade hemolítica.....	47
3.5.3 Ensaio toxicológico não clínico agudo	47
3.6 ESTUDO ANTI-INFLAMATÓRIO.....	48
3.6.1 Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>.....	48
3.6.2 Lesão pulmonar aguda induzida por LPS	49
3.6.2.1 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	49
3.6.2.2 Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO).....	50
3.6.2.3 Quantificação das concentrações de citocinas.....	50
3.6.2.4 Análise histopatológica e histoquímica do colágeno.....	50
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE <i>L. racemosa</i>	52
4.2 PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE <i>L. racemosa</i>	53
4.1.1 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD).....	53
4.1.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).....	54
4.1.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas (GC-MS).....	58
4.1.4 Determinação do teor de fenóis totais, flavonóis e proantocianidinas dos .. extratos de <i>L. racemosa</i>.....	62
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>L. racemosa</i>	64
4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE <i>L. racemosa</i>	67
4.3.1 Ensaio de viabilidade celular frente à PBMC.....	67

4.3.2 Avaliação da atividade hemolítica.....	70
4.3.3 Ensaio toxicológico não clínico agudo.....	72
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE <i>L. racemosa</i>	75
4.3.4 Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>.....	75
4.3.5 Lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	78
4.9.2.1 Avaliação da atividade da mieloperoxidase	84
4.9.2.2 Determinação dos níveis de óxido nítrico	85
4.9.2.3 Determinação dos níveis de citocinas	86
4.9.2.4 Análise histopatológica dos pulmões.....	89
5 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO A – FICHA SISGEN.....	119
ANEXO B – FICHA DE APROVAÇÃO CEUA.....	120

1 INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório agudo grave (SRAG) é um quadro clínico caracterizado pela insuficiência respiratória em decorrência de uma lesão pulmonar aguda (LPA) no epitélio alveolar, que, por sua vez, é uma doença inflamatória gerada pela migração leucocitária para o interior dos pulmões, causando o acúmulo de líquido intersticial. A liberação de mediadores pró-inflamatórios nesse processo, como as citocinas, levam ao aumento de agentes oxidantes no local da inflamação (LEI et al., 2018; LIU et al., 2019; GAUDET et al., 2019).

As principais causas dessa desordem são de origem infecciosa quando micro-organismos, como vírus e bactérias, agem no organismo humano das mais variadas formas. Os vírus respiratórios, como foi visto na pandemia de Covid-19, podem acarretar uma superprodução de citocinas levando a um quadro pneumático. Enquanto as bactérias Gram-negativas, em especial, se utilizam de um componente da sua membrana externa, chamado de lipopolissacarídeo (LPS), como indutor da resposta imunológica. As estratégias de tratamento mais eficientes estão resumidas a procedimentos ventilatórios, o que carece de ser a solução definitiva para o problema e intensifica as buscas por novos agentes terapêuticos (NOVA; SKOVIEROVA; CALKOVSKA, 2019; LI et al., 2020; CARSETTI et al., 2020).

Desde os primórdios da humanidade, as civilizações antigas têm feito uso das plantas para fins medicinais, em virtude das suas propriedades terapêuticas, objetivando alcançar a cura para os mais variados tipos de enfermidades que lhes afligiam (BERNARDIN et al., 2018; SILE et al., 2020). Em função disso, os produtos naturais passaram a ser observados sob a ótica da ciência na busca por compostos biologicamente ativos e para comprovação das suas atividades biológicas e com a perspectiva da sua ampla utilização na terapêutica moderna. Muito do seu potencial medicinal se deve à produção fisiológica de componentes do metabolismo secundário, condicionados ao ambiente ao qual essas espécies são encontradas (WANGKHEIRAKPAM, 2018; JAIN; KHATANA; VIJAYVERGIA, 2019).

Nesse contexto, o Brasil aparece no cenário mundial com um rico arsenal genético no que diz respeito à biodiversidade botânica. O País é considerado o maior detentor de espécies florísticas nativas em seu território quando comparado com os demais países do globo. Isso muito se deve às suas características climáticas e de solo, que fazem com que ele abranja uma variedade de biomas e ecossistemas

peculiares em muitas partes do mundo (DALCIN; JACKSON, 2018; LACERDA-JÚNIOR et al., 2019).

O ecossistema manguezal, por exemplo, apresenta uma importância ecológica elevada por possuir um papel crucial no equilíbrio biológico da fauna e da flora do ambiente estuarino, além de servir como fornecedor de recursos etnobotânicos (ELLISON et al., 2021). Por conta das condições ambientais características desse ecossistema, que incluem uma alta taxa de salinidade e grande quantidade de matéria orgânica em decomposição, as espécies botânicas do mangue se tornaram candidatas à descoberta de novos compostos bioativos em virtude das suas adaptações fisiológicas ao meio (VINOTH; KUMARAVEL; RANGANATHAN, 2019). No Nordeste brasileiro, esse tipo de vegetação é encontrado em quase todo o litoral, possuindo grandes concentrações no estado de Pernambuco. Entretanto, a escassez de áreas de conservação e a poluição antropogênica têm feito com que esse ecossistema seja posto em estado de alerta para preservação (ARAÚJO et al., 2021).

Laguncularia racemosa (L.) C. F. Gaertn é uma planta da família Combretaceae, conhecida popularmente como "mangue-branco", amplamente distribuída no manguezal. Estudos etnobotânicos apontam que as folhas da espécie são usadas na medicina popular principalmente por suas propriedades antidiarreicas, antipiréticas e antiulcerogênicas (BANDARANAYAKE, 2002; RODRÍGUEZ, 2007; SERENESKI-LIMA et al., 2021).

Porém, mesmo em ciência de todos os benefícios fornecidos pelas plantas, o uso exacerbado dos seus recursos pelas comunidades tradicionais no tratamento de doenças se torna uma escolha perigosa quando não se conhecem os seus possíveis efeitos toxicológicos, tendo em vista que muitas delas possuem constituintes nocivos à saúde quando utilizadas na forma e dose inadequados (MENDONÇA et al., 2019; DANTAS-MEDEIROS et al., 2021).

Apesar da grande representatividade da família Combretaceae no Brasil, são poucos os registros na literatura científica acerca das suas atividades farmacológicas de suas espécies no tratamento de doenças inflamatórias e ligadas ao estresse oxidativo. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade e as atividades antioxidante e anti-inflamatória das folhas de *L. racemosa* em modelo de lesão pulmonar aguda.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade e as atividades antioxidante e anti-inflamatória dos extratos brutos de *Laguncularia racemosa* em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

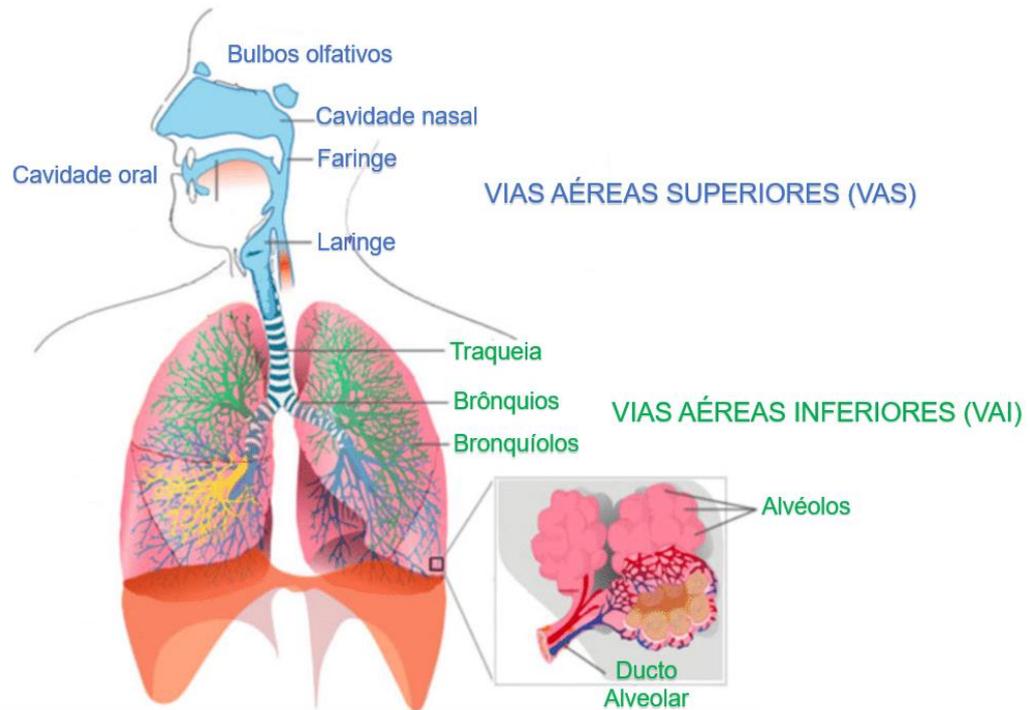
- Obter os extratos hexânico, etanólico e em acetato de etila das folhas de *L. racemosa* e analisar seus perfis fitoquímicos;
- Determinar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos das folhas de *L. racemosa*;
- Indicar o teor de fenóis totais, flavonóis e proantocianidinas dos extratos das folhas de *L. racemosa*;
- Investigar o efeito citotoxicológico dos extratos das folhas de *L. racemosa* frente a células mononucleares de sangue periférico - PBMC e eritrócitos;
- Avaliar o efeito *in vitro* dos extratos das folhas de *L. racemosa* na produção de óxido nítrico por macrófagos intraperitoneais;
- Selecionar o extrato com maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante e:
 - Investigar seu efeito toxicológico *in vivo* sobre camundongos no ensaio de toxicidade aguda;
 - Avaliar a atividade anti-inflamatória sobre a lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos através da quantificação de leucócitos e da determinação dos níveis de óxido nítrico, citocinas, atividade da enzima mieloperoxidase, além da análise histopatológica dos pulmões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS

O sistema respiratório (Figura 1) tem a função de realizar o fluxo de gases respiratórios através de um conjunto de órgãos e estruturas bem articuladas entre si chamados de vias aéreas, que abrangem o pulmão como principal órgão envolvido (ISLAM et al., 2020). Essas passagens podem ser divididas anatomicamente em duas porções. A primeira delas, as vias aéreas superiores (VAS), vão desde as narinas até a laringe, incluindo as três divisões da faringe (orofaringe, nasofaringe e laringofaringe), enquanto as vias aéreas inferiores (VAI) compreendem a traqueia até os alvéolos pulmonares, passando pelos brônquios e bronquíolos (ASGARI et al., 2019; AHOOKHOSH et al., 2020).

Figura 1 - Esquema do sistema respiratório.



Fonte: Grzywalski et al., 2019 (Adaptado).

Por se tratar de um sistema com ligação direta ao ambiente externo por meio da respiração, ele está constantemente exposto a agentes agressores e desencadeadores de doenças, como os micro-organismos (GARCÍA et al., 2020).

As Infecções Respiratórias Agudas (IRAs) se caracterizam por acometer as vias aéreas, superiores ou inferiores, por meio da ação de uma variedade de micro-organismos (SOUZA et al., 2018). Grande parte dessas infecções costumam ocorrer em épocas do ano propícias à ação desses agentes microscópicos, aumentando rapidamente o número de casos quando em situações epidêmicas. Esse fato, além de representar uma das principais causas de morbidade e mortalidade, pode ser considerado um problema grave para os sistemas de saúde, em função dos aumentos dos casos que levam à procura mais intensa por unidades públicas de assistência (SOUZA et al., 2018; GARCÍA et al., 2020).

Dentre os micro-organismos que mais causam IRAs destacam-se os vírus e as bactérias, por sua facilidade de propagação pelo ambiente aéreo, via transmissão horizontal ou através de objetos inertes, classificados como fômites (GARCÍA et al., 2020). Através desses meios de transmissão, as infecções acontecem seja em interiores residenciais ou no ambiente externo, mas, principalmente, em espaços hospitalares, como as Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), o que acaba por dificultar o prognóstico (HESPANHOL et al., 2019). Na grande maioria dos casos, esse quadro infeccioso causa uma atenuação celular do sistema imunitário, o que facilita as infecções secundárias por agentes oportunistas (STICH et al., 2021).

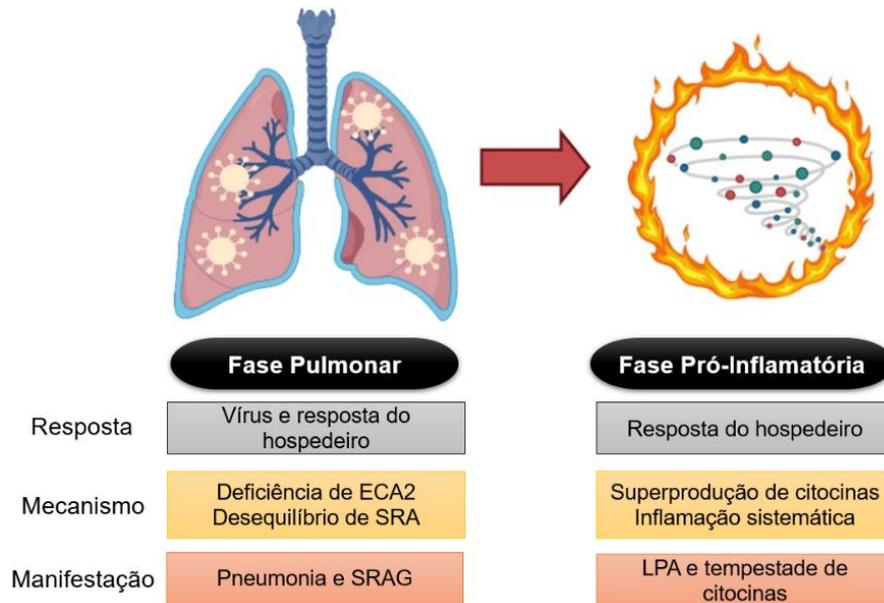
2.1.1 Agentes Infecciosos

Em meados do ano 2019, surgiu em Wuhan, na China, um vírus da família *Coronaviridae* que provocou uma pandemia cujas consequências se prolongaram durante meses. O vírus SARS-CoV-2, causador da Covid-19, foi denominado assim por desenvolver numa grande parcela dos infectados a SRAG, além de outros impactos fisiológicos no organismo acometido (ZHOU et al., 2020; LEE; CHOI, 2021).

A Covid-19 pode ser dividida em duas fases principais, sendo elas a fase pulmonar e a fase pró-inflamatória (Figura 2). Na fase pulmonar, o SARS-CoV-2 infecta o trato respiratório superior causando deficiência na produção da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA₂), juntamente com o desequilíbrio do sistema renina-angiotensina (SRA). Essas alterações levam a um quadro de pneumonia intersticial e SRAG (TABOADA et al., 2020; LEE; CHOI, 2021).

Na fase pró-inflamatória, os linfócitos produzem de maneira exacerbada citocinas pró-inflamatórias, evento conhecido como tempestade de citocinas, resultando em uma LPA (MANGALMURTI; HUNTER,2020; MCELVANEY et al., 2020; LEE; CHOI, 2021).

Figura 2 - Modelo de patogênese da Covid-19, em duas fases: pulmonar e pró-inflamatória. Respostas, mecanismos patogênicos e manifestações clínicas em casa fase.



Fonte: LEE; CHOI, 2021 (Adaptado).

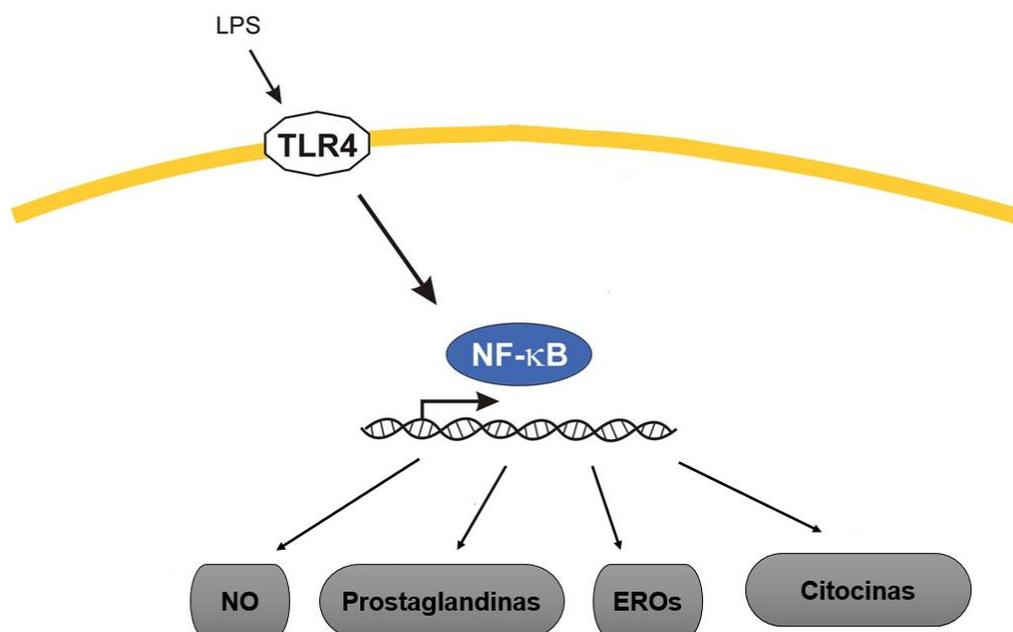
Nessa fase, ao atingir as células ciliadas dos alvéolos, que, conseqüentemente, param de realizar sua atividade normal de limpar as vias aéreas, há o acúmulo de detritos e influxo de exsudato pulmonar e, por fim, o aumento da possibilidade de infecções secundárias por bactérias (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020).

As bactérias são responsáveis por altos índices das IRAs, dificultando a melhora dos pacientes por se tratar de micro-organismos que possuem uma característica mutagênica elevada, baseada em um complexo sistema de produção enzimático capaz de burlar muitos dos antimicrobianos utilizados atualmente (RAWSON et al., 2017; METOK et al., 2020). As bactérias Gram-negativas são apontadas com um sistema infeccioso mais complexo que as Gram-positivas por possuírem um componente a mais em sua estrutura morfológica, o LPS (SPERANDEO; MARTORANA; POLISSI 2017).

Nesse contexto e por sua característica de resistência aos antibióticos, algumas espécies multirresistentes são classificadas como causadoras de infecções respiratórias, urinárias, peritonites e meningites. São exemplos de espécies de bactérias Gram-negativas: *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (LYNCH; ZHANEL; CLARK, 2017; KHAN et al., 2019).

O LPS é um glicolipídio apontado como um potente ativador da resposta imunológica envolvendo infecções por bactérias Gram-negativas. Essa macromolécula, que apresenta em sua composição uma cadeia de sacarídeo ligada a uma região lipídica bifosforilada (lipídio A), está presente na membrana externa desses micro-organismos (ZÄHRINGER; LINDNER; RIETSCHEL, 2020). A reação imune do organismo humano se dá por meio da ligação do LPS ao receptor TLR4, que é um receptor do tipo *Toll* encontrado em células fagocitárias, como neutrófilos e macrófagos, capaz de reconhecer padrões moleculares presentes em patógenos microbianos (YE; LIU, 2020). Ao acontecer o reconhecimento, o fator nuclear κ B (NF- κ B) é translocado para o interior do núcleo, onde irá conduzir a transcrição dos reguladores relacionados a citocinas específicas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Figura 3) (LAI et al., 2017) que estão associadas à ativação macrofágica (CHEN et al., 2020).

Figura 3 - Ativação do receptor TLR4 pelo LPS e subsequente transcrição de mediadores inflamatórios pelo NF- κ B.

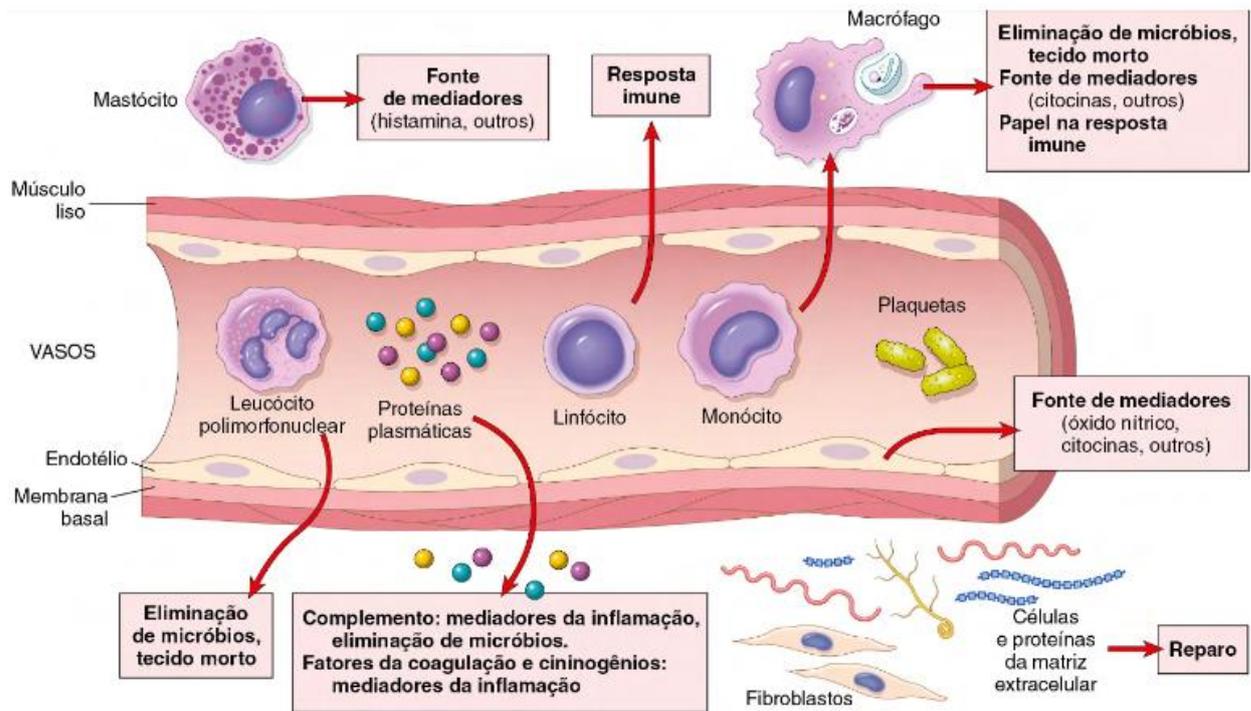


Fonte: SAAVEDRA, 2012 (Adaptado).

2.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo decorrente muitas vezes de um estímulo de origem exógena, em sua maior parcela causado por microorganismos patogênicos ou traumas, que levam à ativação do sistema imunológico (HUBER-LANG; LAMBRIS; WARD, 2018). Com isso, ocorre o aumento da permeabilidade vascular causada pela dilatação dos vasos sanguíneos, o que influencia a migração leucocitária e a liberação de mediadores inflamatórios (Figura 4) (LUDEWIG; WINNEBERGER; MAGNUS, 2019).

Figura 4 - Processo inflamatório agudo, mediadores envolvidos e suas funções.



Fonte: AMORIM, 2014, p.47.

A vasodilatação é considerada o primeiro evento inflamatório e é mediada pelas aminas vasoativas liberadas, como a histamina e a serotonina. Estas são liberadas especificamente pelos mastócitos e neutrófilos, que são células do sistema imune responsáveis por aumentar o fluxo sanguíneo, caracterizando, assim, a fase vascular inflamatória (FORSYTHE, 2019).

O principal papel da vasodilatação é a intensificação do fluxo sanguíneo associada ao aumento da permeabilidade vascular, o que facilita a migração leucocitária para o local da lesão. As proteínas que passam para o espaço extravascular ajudadas pelos leucócitos em sua adesão ao endotélio, além de serem responsáveis pela formação do exsudato que é um líquido rico em proteínas, como a albumina e o fibrinogênio (FORSYTHE, 2019; GAUDET et al., 2019).

As principais células recrutadas na inflamação aguda são os neutrófilos e macrófagos. Ambas possuem função fagocitária e têm o objetivo de remover o agente patogênico para possibilitar os eventos conseguintes de reparo tecidual. Além disso, essas células são conhecidas por liberar mediadores químicos chamados de citocinas (KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018).

As citocinas são comunicadores proteicos intercelulares responsáveis por orientar o funcionamento das células envolvidas na inflamação, mais especificamente atuando em sítios reguladores de reações químicas nos processos biológicos, envolvendo ativação, crescimento e reparo tecidual (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). Esses mediadores podem ser divididos em grupos, sendo eles: fatores de crescimento (TGF), interferons (IFN), interleucinas (IL) e do fator de necrose tumoral (TNF) (GHAZAVI et al., 2021). Este último é uma das principais classes das citocinas pró-inflamatórias, destacando-se o TNF- α por ser liberado no momento da lesão pelas células mononucleares. O que resulta no recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da inflamação (KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018; GHAZAVI et al., 2021). As IL também ocupam um papel importante no evento inflamatório, podendo ser divididas em pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL6 e IL-7) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13) (TAIPA et al., 2019). A maioria dos fármacos anti-inflamatórios têm como objetivo atuar na inibição desses mediadores químicos, que exercem funções específicas em tecidos diferentes (LITTLE, 2020).

O óxido nítrico (NO), por exemplo, é um radical livre sintetizado a partir da NG-hidroxi-L-arginina, sendo produto da reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Esse e outros radicais livres possuem papel importante no agravamento da inflamação pela potencialização do estresse oxidativo (ARRAL; HALPERN, 2018).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo ligado à inflamação é caracterizado pelo aumento na quantidade dos compostos oxidantes em detrimento dos antioxidantes, havendo assim um desequilíbrio entre eles. A superprodução de radicais livres pelo organismo influencia diretamente nesse fenômeno que acaba afetando as respostas celulares (SIES; BERNDT; JONES, 2017; LIGUORI et al., 2018)

O aumento das espécies reativas (ERs) podem desencadear efeitos danosos aos organismos, sendo elas classificadas como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As EROs mais conhecidas são o radical hidroxila (OH) e o ânion superóxido (O_2^-), enquanto o óxido nítrico, nocivo ao reagir com O_2^- , é a ERNs mais frequentemente estudada (FERREIRA et al., 2018; SIES, 2018).

Os radicais livres são ERs capazes de capturar elétrons de outras moléculas biológicas estáveis, instabilizando-as. Por isso são conhecidos por serem sistemas oxidantes que agem por meio da interrupção das reações químicas (ALKADI, 2020). Muitos deles possuem funções importantes na defesa imunológica do organismo contra patógenos e nas sinalizações celulares, todavia o seu excesso nos sistemas biológicos pode causar diversos problemas de saúde pela degradação das moléculas orgânicas (DI MEO, S.; VENDITTI, 2020; ALKADI, 2020).

Durante a inflamação aguda, as células envolvidas no processo produzem diversas ERs por meio da liberação dos mediadores celulares, como é o caso das prostaglandinas e leucotrienos, além principalmente das citocinas (POPRAC, 2017; YE et al., 2018) Um exemplo dessas células tem ação oxidante indireta são os neutrófilos, ao serem liberados para fagocitose de micro-organismos, também aumentam a quantidade de NO (KELLNER et al., 2017).

Em geral, para combater os efeitos oxidativos ao organismo utilizam-se compostos antioxidantes que, diferentemente dos anteriores, doam elétrons para estabilização dos radicais livres, neutralizando a sua ação (ALKADI, 2020). Eles comportam-se de duas formas: na forma enzimática, o início da oxidação é bloqueado pela ação de enzimas, como o superóxido dismutase (SOD) e a catalase; na forma não-enzimática atuam os compostos naturais a base de fenóis e a glutathiona reduzida (GSH) na interação e consumo dos radicais livres (IFEANYI, 2018; MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018; RAN et al., 2020).

Como visto anteriormente, os antioxidantes não-enzimáticos podem ser sintetizados ou encontrados naturalmente no ambiente, na forma de produtos naturais de origem, principalmente, botânica. Estudos têm demonstrado a ênfase dos antioxidantes naturais no tratamento de doenças dos mais variados tipos, incluindo desordens inflamatórias e infecções respiratórias (ATTA; MOHAMED; SILAEV, 2017).

2.4 LESÃO PULMONAR AGUDA

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) é um quadro clínico inflamatório caracterizado pelo influxo desbalanceado de células imunológicas para os pulmões. O dano causado ao epitélio alveolar tem por consequência a insuficiência respiratória do paciente, fazendo com que a LPA seja comumente associada à SRAG. Pessoas acometidas por essas desordens podem apresentar hipoxemia prolongada, dispneia e taquipneia graves (HERRERO; SANCHEZ; LORENTE, 2018; KELLNER et al., 2019; CHRISTIANI, 2020).

A diferença entre a LPA e a SRAG foram mais claramente definidas na “*American-European Consensus Conference on ARDS*”, onde a SRAG foi caracterizada pela presença de hipoxemia aguda com relação entre a pressão parcial de oxigênio arterial e a fração inspirada de oxigênio ($\text{PaO}_2:\text{FiO}_2$) de 200 mmHg ou menos, enquanto a LPA é uma forma menos grave definida com os mesmos critérios, mas com uma $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2$ de 300 mg Hg, ambas apresentando o dano alveolar difuso (DAD) (MONTERO-FERNANDEZ; PARDO-GARCIA, 2021).

Desde a sua descoberta em 1967, inicialmente pela constatação de infiltrados pulmonares e perda da complacência pulmonar em 12 pacientes hospitalares, a LPA tem sido estudada por seu desenvolvimento multifatorial (ASHBAUGH et al., 1967; REZOAGLI; FUMAGALLI; BELLANI 2018). Hoje, sabe-se que algumas das causas diretas incluem inalação de poluentes, contusões torácicas, aspiração de refluxos gástricos e, principalmente, infecções por micro-organismos que envolvam para pneumonias. Indiretamente, e poucos comuns, as transfusões de sangue, uso de substâncias psicoativas e traumas não pulmonares também fazem parte da estatística de influências para essa doença (LI et al., 2017; LEE et al., 2020; KOHNE; FLORI, 2020).

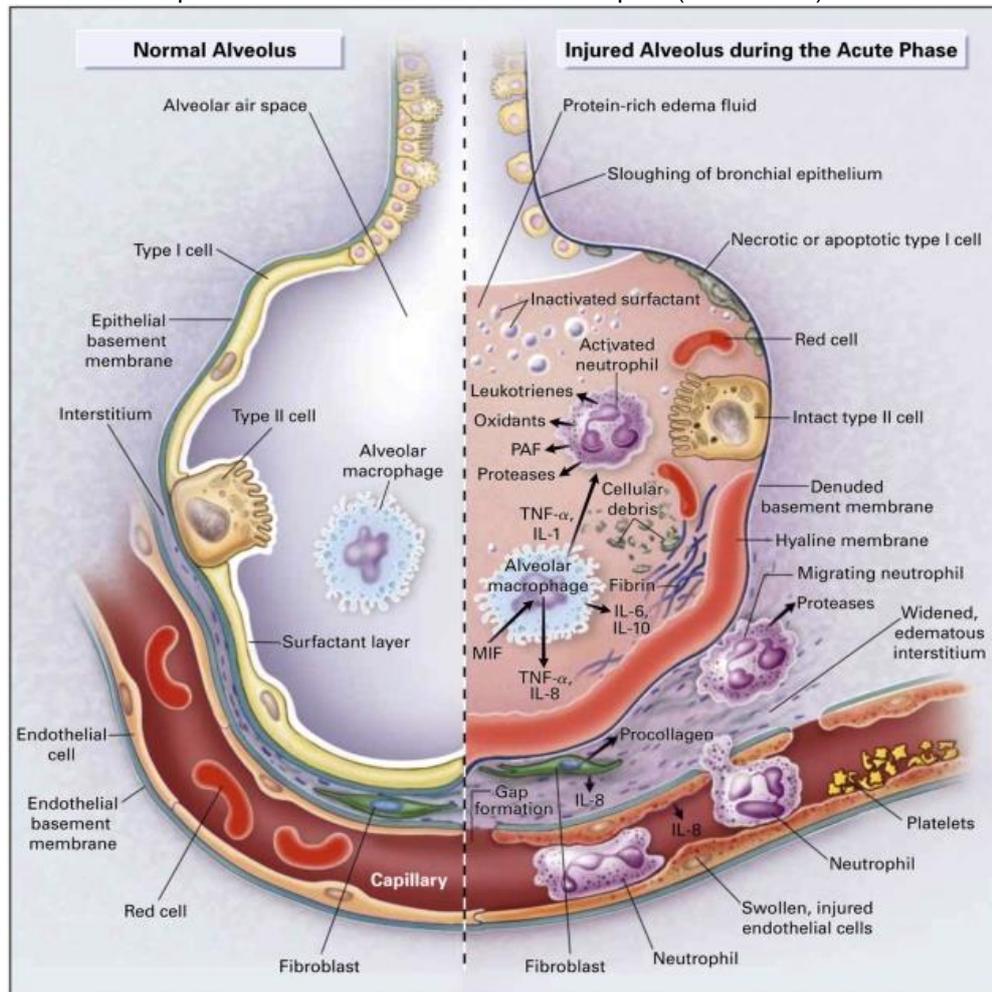
2.4.1 Fisiopatologia da Lesão Pulmonar Aguda

A LPA pode ser dividida em três fases, sendo elas: exsudativa, proliferativa e fibrótica (BEASLEY et al, 2021). Na fase exsudativa, estágio inicial da lesão, há o dano ao epitélio alvéolo-capilar que leva à formação de um edema intersticial. No espaço intra-alveolar é preenchido por um fluido rico em proteínas que leva à formação da membrana hialina, prejudicando assim as trocas gasosas (THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017). Esse líquido proteico também é responsável por diminuir a complacência pulmonar em consequência da inativação do surfactante, o que resulta no colapso dos alvéolos (HERRERO, R.; SANCHEZ, G.; LORENTE, 2018; NOVA; SKOVIEROVA; CALKOVSKA, 2019).

A fase proliferativa inicia-se com a diminuição desse fluido e o aumento da proliferação de fibroblastos que influenciam na fibrose intersticial nos espaços entre a membrana hialina. A formação do tecido fibrótico provoca o comprometimento da barreira alvéolo-capilar (Figura 5) e a subsequente migração leucocitária para o interior dos alvéolos (NOVA; SKOVIEROVA; CALKOVSKA, 2019; BEASLEY et al, 2021).

Durante o influxo celular, os macrófagos desempenham papel importante no início da resposta inflamatória ao serem ativados por meio dos seus receptores TLRs, ativando a sua resposta imunológica inata (LIU et al, 2019; NOVA; SKOVIEROVA; CALKOVSKA, 2019). Isso se dá pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β , IL-8 e, principalmente, a IL-6 que é associada como influenciadora na taxa de mortalidade (LAGUNA-GOYA et al., 2019).

Figura 5 – Contraste entre a estrutura e função alveolar normal (lado esquerdo) e as múltiplas respostas dos mediadores celulares após a lesão da membrana alvéolo-capilar (lado direito) na LPA.



Fonte: MATTHAY; ZIMMERMAN, 2005.

Com o aumento no número de macrófagos alveolares, há liberação de quimiocinas por ação dessas células que leva a ativação de neutrófilos, e por sua vez liberam proteases, leucotrienos e o fator de ativação plaquetária (PAF) no espaço intra-alveolar, potencializando ainda mais o processo inflamatório pulmonar (CHEN et al., 2020). É através da ativação neutrofílica que desencadeia-se o estresse oxidativo, que envolve a liberação de radicais livres e enzimas proteolíticas oxidantes, como NO e a mieloperoxidase (MPO), respectivamente (KELLNER et al., 2017). Na última etapa, a fase fibrótica, há intensa atuação de fibroblastos no reparo tecidual com a produção da rede de fibras a base de colágeno (HUGHES; BEASLEY, 2017; BEASLEY et al, 2021).

2.4.2 Tratamentos Atuais

Os tratamentos para LPA e a SRAG consistem no uso de técnicas e equipamentos ventilatórios mecânicos para combate dos sintomas, focando especialmente na insuficiência respiratória hipoxêmica desenvolvida (DOS SANTOS SILVA et al., 2017; LI et al., 2020; CARSETTI et al., 2020). Outros métodos terapêuticos visam à diminuição do processo inflamatório pela administração de corticoesteroides e vasodilatadores (FIELDING-SINGH; MATTHAY, 2018). A maioria dos fármacos procura inibir a cascata inflamatória, como é o caso dos agonistas beta 2-adrenérgicos, antagonistas dos receptores de leucotrienos e inibidores da fosfodiesterase (VADÁSZ; SZNAJDER, 2017; KOSUTOVA, 2018; KIM et al., 2020).

Apesar do uso difundido das técnicas ventilatórias e não-ventilatórias, as pesquisas estatísticas apontam que ainda não foi possível achar uma solução concreta para o problema em função do expresso índice de mortalidade dessa doença (CARSETTI et al., 2020; LITTLE, 2020). Muitos dos fármacos utilizados acarretam em efeitos adversos ao paciente por suas dosagens elevadas que trazem problemas toxicológicos e oxidativos, levando à busca por compostos terapêuticos alternativos (WAKASKAR, 2017).

2.5 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais é uma prática popular comum que vem desde os tempos antigos. Quando não se havia um sistema de saúde estruturado, essa era a única alternativa medicinal conhecida pelos povos do passado. Hoje não é diferente em muitos locais do mundo, onde o acesso à saúde continua precário (BERNARDIN et al., 2018; SARGIN, 2021).

Dessa forma, as plantas nunca foram vistas somente como fonte de alimentação e ornamentação, mas como importantes recursos terapêuticos. Essas propriedades são reconhecidas pelo olhar da ciência, que cada vez mais busca se aprofundar em seus estudos com objetivo de fundamentar seus usos etnobotânicos e encontrar novos compostos bioativos para aplicação na medicina moderna (MALEKI; AKHANI, 2017; SILE et al., 2020).

Plantas medicinais são utilizadas na forma de extratos vegetais considerados misturas complexas que oferecem uma variedade de componentes botânicos com atividades biológicas específicas (ALTEMIMI et al., 2017). A extração é um procedimento base para obtenção de componentes químicos produzidos pelas plantas, consistindo em um processo físico-químico de transferência de massa. Normalmente, em laboratório são empregadas técnicas extrativas sólido-líquido envolvendo o uso de solventes orgânicos, que são líquidos voláteis com capacidade de dissolver uma grande variedade de compostos, sejam eles biológicos ou sintéticos (SOQUETTA; TERRA; BASTOS, 2018; PANJA, 2018).

A escolha do solvente deve levar em consideração a afinidade molecular entre soluto e solvente, refletido na polaridade do composto alvo a ser extraído (MUKHOPADHYAY; DUTTA; DAS, 2020). Os métodos de extração também variam de acordo com os constituintes a serem identificados, destacando-se a infusão e o uso de Soxhlet como técnicas convencionais, além da maceração que é caracterizada por ser a extração líquido-sólido mais utilizada para compostos não voláteis. No caso dos solventes orgânicos, os mais frequentemente utilizados são o ciclohexano, diclorometano, tolueno, acetato de etila, metanol e o etanol (CHUO et al., 2020).

2.5.1 Metabólitos Secundários

O metabolismo é o conjunto de reações químicas que são responsáveis por modular o funcionamento correto do organismo. Através de reações químicas, produzem substâncias chamadas de metabólitos, podendo estes serem de metabolismo primário ou secundário (WHITE, 2018; CHANDEL, 2021). Os produtos de metabolismo secundário nas plantas possuem um papel de extrema importância no uso medicinal dessas (VETTER, 2018).

Os metabólitos secundários são produzidos para proteção contra herbivoria e ataque de patógenos, em contraste com os metabólitos primários mais associados as funções vitais do organismo. A produção desses produtos bioativos beneficia as espécies vegetais na competição específicas, além de favorecer a polinização por animais (YANG et al., 2018; ISAH, 2019).

Outros benefícios desses metabólitos para as plantas é a proteção contra fatores abióticos do meio, como climas extremos, recursos nutritivos escassos do solo, alto ou baixo índice pluviométrico e quantidade de radiação solar (THIRUMURUGAN et al., 2018; KHARE et al., 2020).

Muitas dessas substâncias bioativas têm importância nos hábitos da humanidade, incluindo benefícios cosméticos, alimentares, medicinais e farmacêuticos (SARKER; NAHAR, 2018; SWALLAH et al., 2020). Por isso, os metabólitos secundários são indicados por vários estudos como possuidores de atividades biológicas comprovadas, como antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, entre outras (ZHAO; WANG; XU, 2021).

As principais classes de metabólitos secundários são os compostos fenólicos, dentre eles estão os flavonoides, como os flavonóis e as antocianidinas, além dos alcaloides; terpenos, saponinas e esteroides (THIRUMURUGAN et al., 2018).

2.5.2 Potencial Toxicológico

Apesar dos inúmeros benefícios, o uso exacerbado desses recursos naturais pode ser prejudicial à saúde humana. Por se tratar de organismos complexos, as plantas podem produzir substâncias nocivas através do seu metabolismo para sua proteção, devendo o indivíduo atentar para alguns fatores que influenciam níveis de toxicidade ao utilizá-las, como dosagem, modo de utilização e frequência de administração (HUDSON et aç., 2018; ODEYEMI; BRADLEY, 2018). Dessa maneira, cresce o número de pesquisas científicas que buscam investigar o potencial toxicológico das plantas visando mitigar esses efeitos para usufruto de suas atividades biológicas (TROTTER; LOGAN, 2019; SÜNTAR, 2020).

Muitas dessas pesquisas envolvem o uso de animais experimentais, tendo em vista que a segurança para a realização de testes em humanos como primeira avaliação é incerta (SAGANUWAN, 2017; BELOVICOVA et al., 2017 LILLEY et al., 2020). Dessa maneira, apesar dos grandes avanços da ciência no emprego de técnicas *in vitro*, esses experimentos continuam a utilizar rotineiramente modelos animais por sua homologia comparada ao organismo humano a nível fisiológico e de resposta medicamentosa, sendo as espécies de pequeno porte, incluindo camundongos e ratos, as mais utilizadas (SAGANUWAN et al., 2017; RAMAKER, M. J.; DULAWA, 2017; REINER et al., 2019).

As informações toxicológicas não só de produtos naturais, como sintéticos também, são essenciais para a condução de um tratamento adequado para pacientes, independente da enfermidade (SAGANUWAN et al., 2017). Por isso, o foco no estudo toxicológico de espécies pertencentes a biomas e ecossistemas que imponham diferentes características adaptativas para as plantas é crescente, tendo em vista as funcionalidades fisiológicas e metabólicas dessas plantas na produção de compostos orgânicos com atividades biológicas que reflitam sua utilização etnobotânica no tratamento de doenças (PIERCE et al., 2021; KUMAR et al., 2021).

2.6 ECOSSISTEMA MANGUEZAL

O manguezal pode ser classificado como um ecossistema estuarino de transição entre os biomas terrestres e marinhos, possuindo plantas e animais com adaptações fisiológicas e morfológicas para sobrevivência nesse meio (WANG et al., 2019; STEINMULLHER et al., 2020). Conhecido popularmente como mangue, é amplamente distribuído em regiões de climas tropicais e subtropicais que facilitam a interação de uma diversidade de macro e micro-organismos (DOS SANTOS; LANA, 2017).

No Brasil, os manguezais podem ser encontrados por quase toda a costa, estimando-se segundo o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBIO (2018) cerca de 1,3 milhões de hectares (ha) existentes. Ainda de acordo com esse estudo, é muito provável que 25% dos manguezais brasileiros tenham sido destruídos desde o início do século 20, sendo que as regiões Nordeste e Sudeste estão à frente no quesito desmatamento. Apesar disso, cresceu o número de Áreas de Preservação Permanente (APP) que cobrem uma área de 1.211.444 hectares, o que representa 87% de todo ecossistema no Brasil.

Uma característica importante dos seus solos é a grande quantidade de matéria orgânica, devido à decomposição superficial de fatores bióticos, o que lhes proporciona uma coloração cinza-escura (ATWOOD et al., 2017; KIDA et al., 2017). A alta salinidade é outro fator característico desses solos, em decorrência da sua proximidade com o mar, o que força as espécies representantes da flora desse ecossistema a possuírem estruturas adaptativas excretoras de sal (KIDA et al., 2017; GARCIA et al., 2017).

O manguezal possui uma grande importância biológica para os processos de transferência de energia que abastece as relações específicas nas cadeias alimentares nele presentes (ENGLU ARIFF; SEMAN KAMARULZAMAN; SURATMAN, 2021). Além de fornecer abrigo para inúmeras espécies, o mangue modula a manutenção do equilíbrio ecológico, através do fornecimento e reciclagem de nutrientes em diferentes escalas de disponibilidade (ALONGI, 2018). Na fauna desse ambiente estão presentes moluscos, crustáceos, peixes, anfíbios, répteis e mamíferos que se beneficiam em seus ciclos reprodutivos na alimentação, reprodução e proteção em sua subsistência (IDRUS; SYUKUR; ZULKIFLI, 2019).

Apesar dos esforços para preservar sua importância ecológica, o ecossistema manguezal encontra-se entre os ambientes naturais mais ameaçados do mundo. Muito desse fato se deve pelas destruições causadas pela ação antrópica ao passo que, por meio desta, são construídas áreas de urbanização, que por sua vez levam ao desmatamento e à poluição por resíduos nocivos a biosfera (SANTOS et al., 2019; KESAVAN et al., 2021). O desmatamento está associado as práticas de agricultura, aquicultura e extração madeireira o que acarreta em impactos irreversíveis para esse ecossistema. Entre os principais impactos ocasionados por essa prática, temos a perda de um rico material botânico que só existe exclusivamente nesse ecossistema (CHOWDHURY et al., 2017).

Muitos desconhecem as capacidades medicinais que possuem as espécies representantes da flora do mangue. Em sua grande maioria halófitas e capazes de suportar solos com alto teor salino e baixa oxigenação por conta de suas adaptações fisiológicas (KODIKARA et al., 2017). No manguezal do Nordeste brasileiro são encontradas as seguintes espécies botânicas: *Rhizophora mangle* L., *Avicennia schaueriana* Stapf. & Leech, *A. germinans* L., *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn e *Conocarpus erectus* L. (COSTA; MAIA; CAVALCANTI, 2012). Tendo em vista o potencial medicinal dessas espécies, torna necessário uma maior intensificação das políticas públicas através do aperfeiçoamento das APP para a preservação desse habitat e suas famílias botânicas (DE ANDRADE; FONSECA, 2020).

2.7 FAMÍLIA COMBRETACEAE

A família Combretaceae abrange mais de 600 espécies distribuídas em cerca de 20 gêneros, que ocorrem em clima tropical e ambientes quentes em todos os continentes, apresentando diversidade maior na Ásia e África. Seus representantes podem ir desde regiões semiáridas a florestas úmidas e de mangue (FAMEN et al., 2020; MANOHAR, 2021).

Com relação à classificação, essa família pode ser dividida em duas subfamílias. A Strephonematoideae possui um único gênero, o *Strephonema*, distribuído exclusivamente no continente africano, enquanto a subfamília Combretoideae possui distribuição mais ampla e também uma diversidade maior de espécies representantes dos seus 19 gêneros, sendo seis destes presentes no Brasil, como é o caso dos gêneros: *Buchenavia*, *Combretum*, *Canocarpus*, *Laguncularia*, *Quisqualis* e *Terminalia* (GERE et al., 2015; MAURIN et al., 2017; ONEFELI; STANYS, 2019).

A literatura científica indica o vasto potencial medicinal dessa família através de atividades biológicas comprovadas como atividade cicatrizante (BARBOZA et al., 2020), antiasmática (CHEDI; MANDAWARI, 2018), antioxidante e antibacteriana (ELVIRE et al., 2018). Muitas dessas atividades podem estar relacionadas à presença de compostos bioativos identificados e isolados por meios de estudos fitoquímicos, como é o caso dos flavonoides, taninos, cumarinas, triterpenos pentacíclicos, saponinas e derivados do ácido elágico (TÓTH; HOHMANN; VASAS, 2017; SOBEH et al., 2019).

2.7.1 *Laguncularia racemosa*

Laguncularia racemosa (L.) C. F. Gaertn (Figura 6) pertence à família Combretaceae e é a única espécie representante do gênero *Laguncularia*, sendo popularmente conhecida como mangue branco ou tinteira. É uma planta halófito exclusiva do ecossistema manguezal, frequentemente encontrada em regiões próximas ao ambiente marinho (LONARD et al., 2020). Ela possui ampla distribuição geográfica nas três porções do continente americano e em partes da África e Ásia, ocorrendo predominante em países com clima tropical e subtropical como é o caso do Brasil (HAYES et al., 2020; LONARD et al., 2020)

Figura 6 – *Laguncularia racemosa* (Combretaceae).



Fonte: <http://cifonauta.cebimar.usp.br/media/549/> - Acesso em: 03 Jan 2023.

2.7.1.1 Aspectos Morfológicos

Em relação a sua morfologia, o mangue branco possui raízes pneumatóforas com geotropismo negativo, uma característica adaptativa em função do baixo percentual de oxigênio presente no solo dos manguezais provocado pelo processo de encharcamento (ATWOOD et al., 2017; LONARD et al., 2020). Essas raízes possuem estruturas chamadas lenticelas que fazem o papel de auxiliar nas trocas gasosas. O caule confere um porte arbóreo e possui casca áspera e dura, de coloração acinzentada e superfície fissurada (HE et al., 2019; LONARD et al., 2020).

As folhas (Figura 7) são coriáceas arredondadas de pecíolo avermelhado curto e limbo alongado, se apresentando em disposição geralmente oposta, mas também aparecem em espiral (LONARD et al., 2020). São nas folhas que encontramos uma das características mais marcantes da espécie, as glândulas de sal. Essas estruturas adaptativas são responsáveis por conferir a *L. racemosa* a capacidade de eliminar o excesso de sal absorvido do solo e suportar ambientes limítrofes entre o mar e o manguezal (LÜTTGE et al., 2019; LONARD et al., 2020).

Figura 7 - Folhas e flores de *L. racemosa* (Combretaceae).



Fonte: <http://cifonauta.cebimar.usp.br/media/568/> - Acesso em: 03 Jan 2023.

As flores se apresentam em aglomerados, unissexuais ou bissexuais, com pétalas arredondas e cobertas de pelos (Figura 7). Os frutos são do tipo drupa com sementes globosas, produzidos em grandes quantidades por plantas ovuladas (LONARD et al., 2020).

2.7.1.2 Considerações Biológicas

Apesar dos inúmeros relatos sobre a ecologia de *L. racemosa* são poucos os estudos que retratam suas atividades biológicas, bem como a sua caracterização fitoquímica. Os estudos que envolvem ecologia encontrados em periódicos costuma focar nas adaptações fisiológicas relacionadas ao meio, principalmente no que diz respeito as trocas gasosas e resistência à salinidade (SOBRADO, 2005; SOBRADO, 2007). Além das interações específicas com outros organismos do seu habitat (SMITH; WILCOX; LESSMANN, 2009; LIU, 2020).

No que diz respeito ao potencial farmacológico, os poucos estudos que foram realizados estão relacionados à atividade antioxidante, relatada por Xue et al. (2008), atividade moluscicida descrita por Mendes et al. (2018) e a pesquisa desenvolvida por Pinho et al. (2014) sobre as atividades antibacteriana e, também, anti-inflamatória na inibição da fosfolipase A2 (PLA-2). No mesmo estudo, também foram analisados o perfil fitoquímico do extrato metanólico da planta e descritos a presença de taninos e 10 flavonoides glicosados. Anteriormente, já havia sido relatado o isolamento de

compostos fenólicos pertencentes à classe das flavonas e flavononas (SHI et al., 2010).

Nesse contexto, tendo em vista o potencial metabólico, o presente trabalho visou utilizar as folhas do mangue branco, coletadas no manguezal da Ilha de Itamaracá - PE, como alternativa medicinal associada ao tratamento de infecções respiratórias e fornecer *insights* sobre a segurança do uso.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *L. racemosa*

As folhas da espécie *L. racemosa* foram coletadas no manguezal de Itamaracá (7° 14' 17" Sul, 35° 36' 57" Oeste – 247 m), litoral Norte do Estado de Pernambuco, identificada e depositada no Herbário UFP- Geraldo Mariz, localizado no centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número de tombamento 83.203. O acesso ao material vegetal foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen sob o protocolo A32BAC6 (Anexo A).

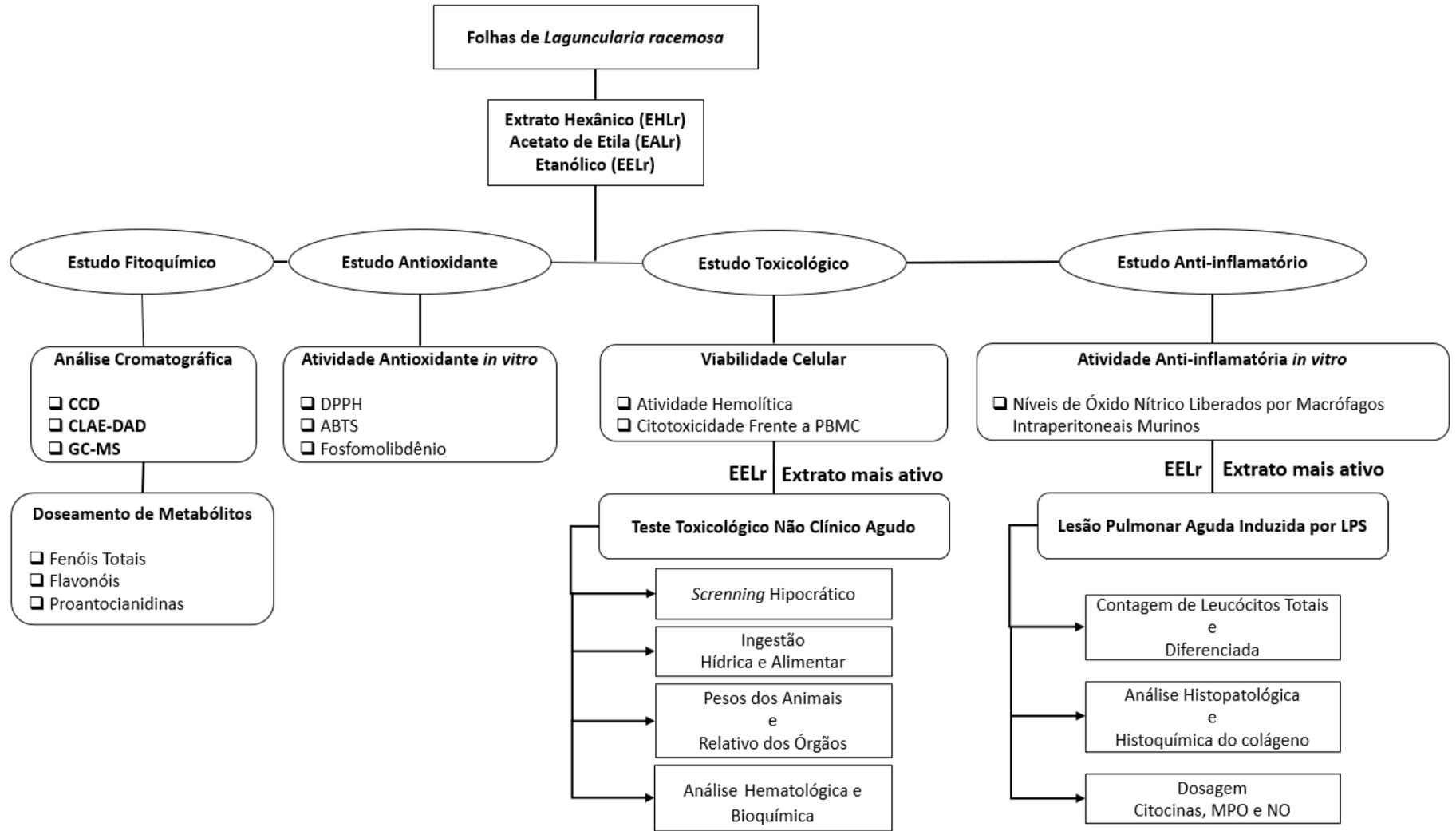
Os extratos hexânico (EHLr), etanólico (EELr) e em acetato de etila (EALr) de folhas de *L. racemosa* foram obtidos no Laboratório de Prospecção Farmacotóxica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX), do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

O material foi submetido à secagem em estufa (40 °C) por um período de 14 dias e, posteriormente, trituradas em moinho de facas. Em seguida, o material vegetal (200 g) foi submetido à maceração com solventes (2 litros) em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e etanol), sob agitação, por três vezes consecutivas, em intervalos de 72 h cada. Os extratos foram filtrados e os solventes foram totalmente retirados com o auxílio de um evaporador rotativo à baixa pressão.

O desenho experimental do trabalho está expresso na Figura 8. Calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula:

$$\text{Re (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato}}{\text{Massa de folhas}} \times 100$$

Figura 8 - Desenho experimental.



3.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As amostras (EHLr, EELr e EALr) e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Alemanha). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (Quadro 1). A cuba foi saturada durante 15 minutos à temperatura ambiente. As bandas foram aplicadas com largura de 1,0 cm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 0,5 cm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 10 cm. As amostras foram aplicadas a 0,5 cm da origem e com término 0,5 cm do final da placa. Após a eluição das placas, as mesmas foram secas à temperatura ambiente, e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível em seguida foram digitalizadas. Na sequência, foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Tabela 1). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes. A aplicação nas placas sempre seguiu a ordem: acetato de etila-etanol-hexano-padrão.

Tabela 1 – Condições cromatográficas para identificação do perfil químico por CCD.

Classe de metabólito	Sistema	Padrão	Revelador
Derivados cinâmicos	(90:5:5)	Ácido clorogênico	AlCl ₃
Flavonoides	(90:5:5)	Rutina	AlCl ₃
Taninos hidrolisáveis	(90:5:5)	Ácido gálico	FeCl ₃
Taninos condensados	(90:5:5)	Catequina	Vanilina Clorídrica + Δ
Cumarinas	(50:50:50)	Cumarina	KOH
Terpenos/Esteroides	(90:10)	β-sitosterol	Liebermann-Burchard + Δ
Saponinas	(16:10:2,5)	Escina	Liebermann-Burchard + Δ
Antracênicos	(20:30:15:0,5)	Senosídeo B	HNO ₃ + Δ + KOH
Açúcares	(100:11:11:27)	Frutose	Timol + H ₂ SO ₄ + Δ
Alcaloides	(70:20:10)	Piperina	Dragendorff

AlCl₃: Cloreto de alumínio a 5% em metanol; FeCl₃: Cloreto férrico; Δ: Aquecimento; KOH: hidróxido de potássio; HNO₃: Ácido nítrico; H₂SO₄: Ácido sulfúrico. 90:5:5 = Acetato de etila, ácido fórmico e água; 50:50:50 = Tolueno, eter etílico e ácido acético glacial (saturação); 90:10 = Tolueno, acetato de etila; 100:11:11:26 = Acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água; 16:10:2,5 = Clorofórmio, metanol e água; 20:30:15:0,5 = Acetato de etila, álcool n-butílico, água e ácido acético glacial; 70:20:10 = Tolueno, acetato de etila, dietilamina.

3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector arranjo fotodiodo (CLAE-DAD)

A análise do EELr por CLAE foi realizada num sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), degaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 μ L (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). Os comprimentos de onda de análise foram 270 e 350 nm. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 μ m) Supelco[®] equipada com pré-coluna (C18 de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex[®]). As separações foram efetuadas a temperatura de 24 ± 1 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0-10 min, 5-20% de B; 10-14 min, 20-25% de B; 14-18 min, 25-40% de B; 18-25 min, 40-80 de B; 25-30 min, 80% de B; 30-34 min, 80% de B; 34-3 min, 5%B. Os dados foram analisados, após a injeção em triplicata, e processados usando o *software* Chromeleon (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas (GC-MS)

Para a análise dos EHLr e EALr por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), fez-se o uso de um cromatógrafo gasoso modelo CG-MSQP5050 A, marca Shimadzu, com fonte impacto de elétrons e analisador quadrupolo. As colunas utilizadas foram CarbolWAX e 5% metil-fenil silicone. As condições de corrida foram: temperatura do forno 70 °C com um aumento de 4 °C/min até 280 °C, quando alcançada a temperatura a mesma foi mantida durante 15 min. O gás transportador foi hélio, com uma velocidade de fluxo constante de 1,4 mL/min. A temperatura da fonte de ionização foi mantida a 280 °C, a energia de ionização 70 eV e a corrente de ionização 0,7 kV. Os espectros de massa foram registados em 30-450 m/z. Os componentes individuais foram identificados pelo seu espectro de massa correspondentes a 70 eV.

3.2.4 Determinação do conteúdo de fenóis totais, flavonóis e proantocianidinas dos extratos de *L. racemosa*

3.2.4.1 Teor de fenóis totais dos extratos de *L. racemosa*

As dosagens de compostos fenólicos dos extratos (EHLr, EELr e EALr) foram determinadas por meio do reagente de Folin-Ciocalteu, como modificações e em triplicata, segundo a metodologia proposta por Li et al. (2008). Os extratos (1 mg/mL), separadamente, foram adicionados em tubos de ensaios contendo 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:1 v/v) e permaneceram em repouso (protegidos da luz) por 3 minutos. Em seguida, 0,8 mL de carbonato de sódio 7,5% foram adicionados e a mistura foi incubada durante 120 minutos em ambiente escuro. Em seguida, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda = 765$ nm. O ácido gálico foi utilizado para a calibração da curva padrão. Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico (mg EAG/g).

3.2.4.2 Teor de proantocianidina dos extratos de *L. racemosa*

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

3.2.4.3 Teor de flavonóis dos extratos de *L. racemosa*

Uma alíquota de solução de AlCl_3 a 2% (0,5 mL) foi adicionada a 1 mL dos extratos (EHLr, EELr e EALr) e posteriormente 0,5 mL de água, HCl, CH_3COONa (cada na concentração de 1 M) foi adicionado. As concentrações das soluções padrão de flavonóis foram de 100 μM . A quercetina (faixa de concentração de 50-500 μM) foi escolhida como o composto de referência. A mistura foi agitada vigorosamente e após 10 min de incubação em temperatura ambiente, foi submetida a análise espectral na faixa de 300-600 nm. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em miligramas equivalentes de quercetina (mg EQ/g) (PEKAL et al., 2014).

3.3 ESTUDO ANTIOXIDANTE

3.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH

Neste ensaio, a atividade sequestradora de radical livre dos extratos (EHLr, EELr e EALr) foi medida em termos de doação de hidrogênio, com a utilização do radical estável 2,2-difenil1- picrilhidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS, 1995 com modificações). Foram misturados 250 μL da solução de DPPH (1 mM) a 40 μL de diferentes concentrações dos extratos (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1.000 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata. Após 30 minutos, sob proteção da luz, foi medida a absorvância com o auxílio de um espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm. O ácido gálico foi utilizado como referência. O sequestro de radicais DPPH foi calculado pela fórmula:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

3.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS

O ensaio de eliminação de radicais ABTS foi realizado de acordo com Re et al. (1999) com modificações. Foi preparada uma solução do radical ABTS dissolvendo 7 mM do ABTS em 2,45 mM de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$). A mistura foi deixada em repouso durante 16 horas (tempo necessário para a formação do radical) no escuro e à temperatura ambiente antes da utilização. Esta solução previamente preparada foi diluída em etanol para se obter uma absorvância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. Para o método de ABTS, foram misturados 20 μ L dos extratos com a solução de ABTS e deixados em repouso durante 6 min. Em seguida, foi lida a absorvância a 734 nm. A eliminação dos radicais ABTS foi estimada em porcentagem após o cálculo da inibição dos radicais, feito pela seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Absorvância do controle} - \text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do controle}} \times 100$$

3.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio

A atividade antioxidante determinada pelo método do fosfomolibdênio se baseia na determinação espectrofotométrica da redução do Mo^{+4} a Mo^{+5} , com formação subsequente de fosfato de Mo^{+5} , que apresenta absorção máxima a 695 nm (PRIETO et al., 1999). Alíquotas de 0,1 mL de cada extrato (1 mg/mL) foram dissolvidas em água destilada e acrescidas de 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). As amostras (EHLr, EELr e EALr) foram mantidas em tubos fechados e incubados a 90 °C por 90 minutos. Após resfriamento, à temperatura ambiente, foi determinada a absorvância no comprimento de onda de 695 nm. A atividade capacidade antioxidante total (CAT) foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela fórmula:

$$\text{CAT (\%)} = \frac{\text{Absorvância do branco} - \text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do ácido ascórbico} - \text{Absorvância do branco}} \times 100$$

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.4.1 Obtenção e cultura de células

Para a obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC - linfócitos e monócitos) foi utilizado o sangue de voluntários sadios coletados em tubos tipo Vacutainer contendo solução de Heparina (BD Vacutainer®) como anticoagulante. Após a coleta, 6 mL de sangue foram diluídos em 3 mL de tampão fosfato-salino (PBS) e adicionados vagarosamente em outro tubo contendo 2 mL de Ficoll®-Hypaque (Sigma). Em seguida, o tubo foi centrifugado a 1500 rpm por 30 minutos para a separação das fases da solução. Devido à formação de um gradiente de densidade pelo Ficoll, as células mononucleares concentraram-se na camada localizada ao meio, entre o plasma (fase clara) e os eritrócitos (fase escura). O experimento foi realizado de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 61757616.0.0000.508). As PBMC foram transferidas para outro tubo ao qual foram acrescentados PBS até o volume final de 11 mL, sendo então centrifugados por 20 minutos a 1000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de PBMC foi ressuscitado em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para obter uma concentração final de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Fitohemaglutinina 2% (Sigma), um agente mitogênico, foi adicionado ao meio para estimular a proliferação dos linfócitos. As células foram contadas e diluídas para uma concentração final de 1×10^6 células/mL.

Para obtenção de hemácias, foi utilizado o sangue periférico de camundongos. Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina (NaCl 0,9% + CaCl₂ 10 mM) e centrifugados (790 g/5 min). O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram ressuscitados em solução de NaCl 0,9% para se obter uma suspensão de eritrócitos a 2%. Já para coleta de macrófagos, foi injetado 1,5 ml de tioglicolato à 4% via intraperitoneal em camundongos e, 5 dias após, as células foram colhidas por lavagem peritoneal com 5 mL de RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para obter uma concentração final de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). As células foram lavadas uma vez com o mesmo meio e 5×10^5 de células peritoneais no mesmo meio de cultura foram então

adicionadas a cada poço de placas de 98 poços. As células foram incubadas durante a noite a 37°C. As placas foram então lavadas duas vezes com 0,5 mL de HBSS (solução de sais balanceados de Hank) sem Ca²⁺ e Mg²⁺, para remover as células não aderentes. Os procedimentos *in vitro* e *in vivo* envolvendo camundongos foram submetidos à aprovação do Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 0076/2022) (Anexo B).

3.4.2 Animais

Para os experimentos com animais, foi utilizado o extrato que demonstrou ser mais ativo nos testes antioxidantes *in vitro* e com perfil fitoquímico promissor. Foram utilizados camundongos albinos Swiss de ambos os sexos e Balb/c fêmeas (massa = 30-35g), provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno à temperatura de 22 ± 2 °C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*. O projeto foi devidamente aprovado pela CEUA (Processo nº 0076/2022).

3.5 ESTUDO TOXICOLÓGICO

3.5.1 Ensaio de viabilidade celular frente a PBMC

As PBMC foram plaqueadas (placa de 96 poços) na concentração de 1,0 x 10⁶ células/mL e mantidas sob incubação por 24 horas a 37° C e 5% CO₂. Os extratos (EHLr, EELr e EALr), previamente dissolvidos em DMSO 10% (5 mg/mL), foram diluídos em série em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,048-25µg/mL) e foram adicionados (100 µL/poço) às placas contendo os linfócitos. A doxorrubicina foi utilizada como padrão nas mesmas concentrações. Após um período de incubação de 72 horas, foi adicionado 25 µL de solução de MTT (5 mg/mL), e a placa foi colocada na estufa a 5% de CO₂ por 3 horas. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuscitado em 100 µL de DMSO e agitado por 30 minutos, até completar a dissolução dos cristais de formazan (BUARQUE et al., 2011).

3.5.2 Avaliação da atividade hemolítica

Este ensaio foi realizado em placas de 96 poços, distribuídos da seguinte forma: 100 µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo (DMSO 10%); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X – 100 a 1% (controle positivo); 100 µL de solução salina + 100 µL dos extratos (EHLr, EELr e EALr) separadamente diluídos em DMSO a 10% e distribuídos nos poços. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram distribuídos em todos os poços.

Após incubação de 1 h, sob agitação constante em aparelho agitador de Kline à temperatura ambiente, a placa permaneceu em repouso por um período de 1 h, onde o sobrenadante foi transferido para outra placa e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Amostras com valores de CH% (concentração capaz de hemolisar 50% das hemácias) >200 µg/mL foram consideradas hemolíticas. O experimento foi realizado em triplicata (COSTA-LOTUFO et al., 2002, com modificações).

3.5.3 Ensaio toxicológico não clínico agudo

Este experimento foi realizado de acordo com as normas descritas na OECD nº423 (2001) e na Resolução nº 90 de 2004, que dispõe sobre a publicação do "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos".

Os camundongos foram submetidos a um jejum 12 horas e divididos em 2 grupos (n = 3 fêmeas). Os grupos receberam veículo (NaCl 0,9%) como controle e EELr na dose única de 2.000 mg/kg, por via oral (gavagem). Os animais foram observados na primeira hora, após a administração, pelo método de *screening* hipocrático (MALONE, ROBICHAUD, 1962). Durante os 14 dias de observação, foram mensurados diariamente o consumo de água, ração e a massa corpórea dos animais.

Ao término desse período, os animais foram anestesiados (cetamina 300 mg/kg + xilazina 30 mg/kg) para a coleta de uma amostra de sangue destinada à realização de exames hematológicos e bioquímicos. Após a coleta, os animais foram eutanasiados e seus órgãos vitais retirados (fígado, baço, rim direito e rim esquerdo), pesados e examinados macroscopicamente.

Como não houve nenhum evento de morte, o experimento foi repetido (n =3 fêmeas), para se obter um número final de 6 animais por grupo, conforme recomendado pela OECD. A massa relativa dos órgãos foi mensurada pela fórmula:

$$\text{Massa Relativa: } \frac{\text{Massa do órgão}}{\text{Massa do animal}} \times 100$$

3.6 ESTUDO ANTI-INFLAMATÓRIO

3.6.1 Atividade anti-inflamatória *in vitro*

Os macrófagos peritoneais murinos foram plaqueados a concentração de 3×10^5 células/mL, em placa de 96 poços com meio DMEM suplementado com 10 % de SFB e 1% de antibiótico e incubados a 37 °C, por 24 horas, para aderência. Após esse tempo, as células foram estimuladas com LPS (*Escherichia coli* 055: B5; Sigma, St. Louis, MO, USA), por 1 h (5 µg/mL) e em seguida, tratadas com os extratos de *L. racemosa* por 24 h, nas concentrações de 1,56 – 12,5 µL (concentrações estabelecidas através do intervalo de viabilidade celular averiguado pelo ensaio de MTT) em triplicata de poços.

A dexametasona (10 µg/mL) usada como padrão e Nω-Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 25 µg/mL), como inibidor da enzima óxido nítrico sintase, foram usadas como controles positivos (LEE et al., 2017). Após 24 horas, recolheu-se 100 µL de sobrenadante celular para dosagem da concentração de nitrito/nitrato (indicativa da produção de NO) pelo reagente de Griess, e 100 µL para a quantificação das citocinas, utilizando os kits comerciais de ELISA (Invitrogen, EUA). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Misturado o sobrenadante, ao mesmo volume de reagente de Griess (100 µL) (1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1 % de diidrocloreto de naftiletilediamina em água; 1:1, Sigma) em uma placa de 96 poços, foram incubados durante 10 min ao escuro. A concentração de nitrito foi calculada com referência a uma curva padrão obtida usando NaNO₂, utilizando-se uma diluição seriada 100 – 1 µL da solução padrão de nitrito de sódio preparada em DMEM.

A absorbância foi medida em 540 nm utilizando um leitor de placas de Elisa Spectra Softmax (IGNÁCIO et al., 2001).

3.6.2 Lesão pulmonar aguda induzida por LPS

Trinta e seis camundongos Balb/c fêmeas foram divididos em seis grupos de 6 animais: controle (NaCl 0,9%); LPS; LPS + dexametasona (dexametasona 5 mg/kg); LPS + EELr 50 mg/kg; LPS + EELr 100 mg/kg; LPS + EELr 200 mg/kg. Os animais foram desafiados com 25 µL de lipopolissacarídeo (25 mg/µL de NaCl 0,9%) por instilação intranasal, exceto os animais do grupo controle. Após 24, 48 e 72 horas os animais receberam por gavagem solução de cloreto de sódio, dexametasona ou o EELr, de acordo com os seus respectivos grupos. Após 96 horas de induzida a inflamação, os animais foram eutanasiados por sobredosagem de anestésico (cetamina 300 mg/kg + xilazina 30 mg/kg) e o lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado para análise de migração leucocitária e níveis de NO. A porção do tecido pulmonar foi coletada para a determinação da atividade da enzima MPO e dosagem de citocinas (adaptado de LI et al., 2019).

3.6.2.1 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

O experimento foi realizado em triplicata, utilizando microplacas de 96 poços. O ensaio consistiu na utilização de 20 µL de sobrenadante do homogenato dos pulmões em 80 µL de H₂O₂ (concentração final 0,147 mM) diluída em tampão fosfato 50 mM pH 6,0 contendo dicloridrato de dianisidina (concentração final de 0,526 mM). As amostras foram lidas em leitor de microplacas no comprimento de onda de 460 nm e os resultados foram expressos em densidade ótica/tecido (Do/tecido) (BRADLEY et al., 1982).

3.6.2.2 Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO)

Para avaliar a produção de NO, a concentração de nitrito (metabólito estável do NO) foi medida pelo LBA dos animais. Uma alíquota de 50 µL de amostra foi transferida para uma microplaca e incubada com 50 µL de reagente de Griess modificado (sulfanilamida 1%, N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato 0,1%, H₃PO₄ 5%) por 10 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. A absorbância foi medida em 540 nm em leitor de microplacas e a concentração de nitrito foi calculada usando uma curva padrão de nitrito de sódio (GIUSTARINI et al., 2008).

3.6.2.3 Quantificação das concentrações de citocinas

Foi realizada a quantificação dos níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α e IFN-γ do sobrenadante do homogenato dos pulmões, por meio de *kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine*, utilizando um sistema reagente específico para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.6.2.4 Análise histopatológica e histoquímica do colágeno

Os tecidos pulmonares fixados em formalina tamponada a 10% foram posteriormente desidratados e embebidos em parafina. Para exame histológico, seções de 4 µm dos tecidos fixados foram cortados com o auxílio de um micrômetro e colocados em lâminas de vidro, desparafinizados e corados sequencialmente com hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica em microscópio óptico.

Os tecidos também foram corados para a análise da quantificação das fibras de colágeno com o auxílio da coloração de tricrômio de Masson para determinação da fibrose pulmonar.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado o teste “t” de *Student* e ANOVA, seguido de pós-teste *Tukey*. Para os ensaios biológicos *in vitro* foi utilizado o pós-teste Bonferroni. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$ e os dados foram analisados através do software *GraphPad Prism 7.0*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *L. racemosa*

O rendimento de EHLr, EALr e EELr em relação ao material de partida (massa de folhas de *L. racemosa* trituradas) foi de 5,93%; 4,61% e 5,43%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Rendimento dos extratos de folhas de *L. racemosa*.

<i>Laguncularia racemosa</i>	EHLr	EALr	EELr
Massa das folhas (g)	200	200	200
Massa do extrato seco (g)	11,87	9,23	10,88
Rendimento (%)	5,93	4,61	5,43

EHLr – extrato hexânico. EALr – extrato acetato de etila. EELr -extrato etanólico.

A escolha das folhas de *L. racemosa* nesse estudo como o órgão vegetal para a preparação dos extratos deveu-se aos relatos da literatura científica sobre uso etnobotânico desta parte da planta no preparo de infusões para o tratamento de diarreias, feridas bucais e febre (BANDARANAYAKE, 2002; RODRÍGUEZ, 2007). Além disso, o uso popular de folhas para a produção de extratos vegetais é uma prática muito comum, pois além de se tratar de um órgão de fácil renegeração, a depender da espécie, é nelas que geralmente concentra-se a maior demanda metabólica (BARBA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2014; SCHWEIGER et al., 2014).

Informações acerca do rendimento dos processos de extração a partir de tecidos de *L. racemosa* são escassos na literatura, em especial para o uso das folhas. Entretanto, no estudo Reddy e Audipudi (2016), foi descrito que os extratos das folhas da espécie apresentaram rendimento de 8,50% na extração por metanol e 6,45% em água, sendo esses dados diferentes dos encontrados neste trabalho, o que segundo Lefebvre, Destandau e Lesellier (2021) pode se dever à escolha do método de extração, bem como do solvente utilizado, que influenciam diretamente no rendimento do extrato e dos compostos extraídos.

Já Cruz, Marroquín e Cáceres (2019) relataram percentuais de 1,72%; 0,38% e 11,60% para os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico das folhas coletadas na Guatemala. Para Cardone (2020), as condições ambientais onde a espécie é encontrada também são fatores que exercem influência na produção do metabolismo vegetal. O tipo de clima ligado intimamente à temperatura, disponibilidade hídrica,

composição e pH do solo, além do índice de incidência da radiação solar são elementos que devem ser levados em consideração no momento da coleta. Prevéy et al. (2017) reitera que indivíduos de uma mesma espécie podem gerar quantidades de compostos distintos quando em locais e períodos diferentes do ano.

Por se tratar de plantas localizadas em um habitat que lhes impõe adaptações fisiológicas específicas para sobrevivência, o arsenal metabólico de *L. racemosa* e demais espécies de manguezal constituem interessantes candidatos para ensaios de bioprospecção de atividades biológicas (MESQUITA et al., 2018; SAFWAT; HAMED HELMY, 2018; KHALIL, 2020). Sendo assim, a utilização dos extratos das folhas de *L. racemosa* para investigação dos seus componentes fitoquímicos e seu potencial farmacológico pode, além de fundamentar a espécie como uma alternativa terapêutica no tratamento de doenças, estimular as estratégias de conservação do ecossistema manguezal.

4.2 PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *L. racemosa*

A identificação dos componentes majoritários do metabolismo secundário presentes nos extratos possibilitou o andamento do trabalho, realizando-o com base nas atividades biológicas características destes compostos.

4.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Através da prospecção fitoquímica por CCD, foi possível identificar flavonoides, derivados cinâmicos, triterpenos, esteroides, mono e sesquiterpenos nos extratos (Tabela 3).

Tabela 3 - Classes de metabólitos secundários encontradas nos extratos das folhas de *L. racemosa*.

Classe de metabólitos secundários	EHLr	EALr	EELr
Derivados cinâmicos	-	-	+
Flavonoides	-	-	+
Taninos hidrolisáveis	-	-	-
Taninos condensados	-	-	-
Cumarinas	+	-	-
Terpenos/esteroides	+	+	+
Saponinas	-	+	+
Açúcares	-	-	-
Alcaloides	-	+	+

Legenda: (-) ausente; (+) presente.

Os resultados estão de acordo com as classes de metabólitos encontradas por Cruz; Marroquín e Cáceres (2019) que detectaram flavonoides, cumarinas e alcaloides, além de taninos e saponinas nos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico das folhas de *L. racemosa*. A ausência de compostos identificados anteriormente em outros estudos, mas não neste, pode ser explicada pelo fato constatado por Ragupathi (2016) ao relatar que a coleta de uma mesma espécie em posições geográficas distintas pode influenciar na quantidade e identificação de seus componentes.

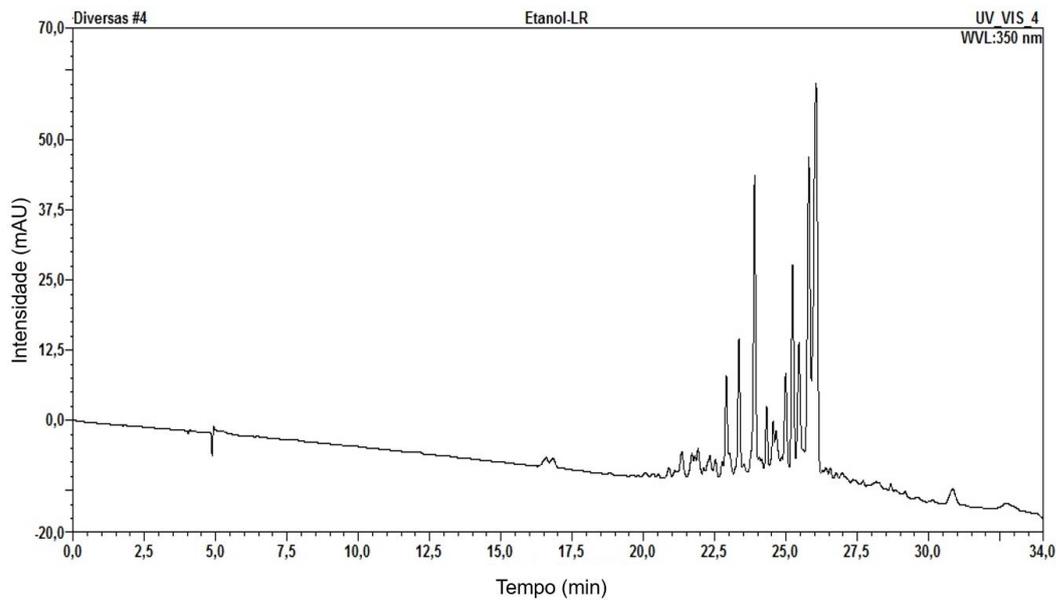
De acordo com Reddy e Audipudi (2016), no extrato metanólico das folhas há fenóis, esteroides, flavonoides e taninos. Os compostos fenólicos e flavonoides também já haviam sido identificados por Shi et al. (2010) nas partições do extrato etanólico dos galhos e cascas da espécie.

Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os trabalhos descritos, apesar de haver pouca informação disponível sobre análises detalhadas dos compostos majoritários presentes nos extratos da espécie, se fazendo necessária uma investigação mais aprofundada da sua constituição química, o que estimulou a continuar a caracterização dos extratos utilizando GC-MS e CLAE-DAD.

4.2.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

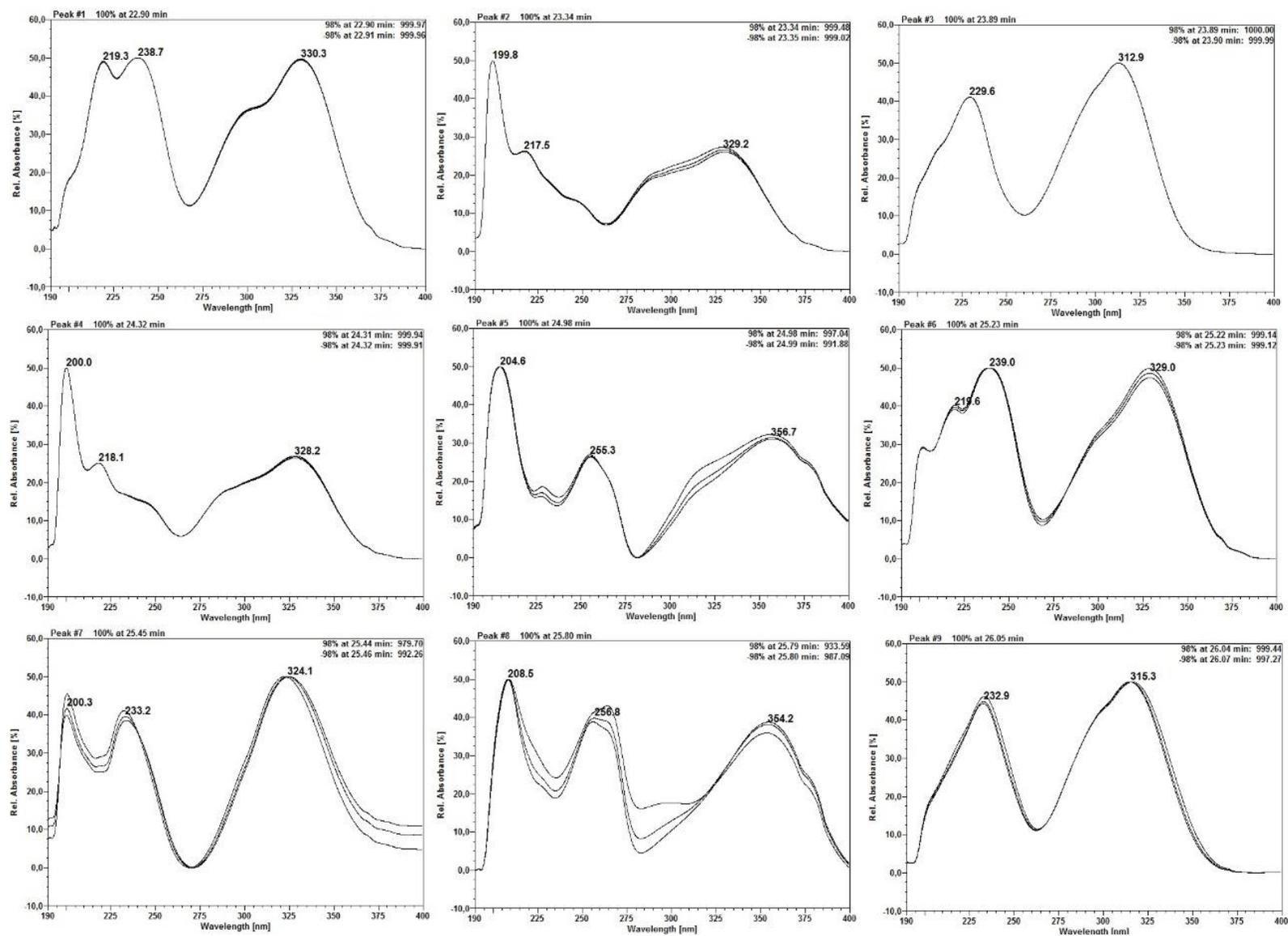
A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo fotodiodo foi necessária para caracterizar estruturalmente os compostos presentes em EELr, tendo em vista que os demais extratos não apresentaram solubilização mínima suficiente no solvente utilizado para análise por essa técnica.

A detecção realizada a 350 nm possibilitou indicar dois dos padrões analíticos por meio da semelhança entre tempos de retenção (Figura 9) e espectro de absorção em ultravioleta (Figura 10).

Figura 9 – Cromatograma por CLAE do EELr em 350 nm.

Os espectros de varredura dos picos observados em EELr foram capturados e estão evidenciados na Figura 10. O uso do detector DAD possibilitou a verificação dos espectros de varredura UV dos picos observados. Constatou-se que os picos número 5 e 8 observados no tempo de retenção 24.98 e 25.80 min, respectivamente, correspondem à presença de flavonoides semelhantes a rutina, um flavonol glicosilado que apresenta máximos de absorção entre 255.3/356.7 e 256.8/354.2 nm. Os picos 3, 6 e 9 apresentaram máximos de absorção característicos de flavonas, além de corroborarem com a coloração azul escura da banda cromatográfica em camada delgada realizada anteriormente para a amostra (MABRY et al., 1970).

Figura 10 – Espectros de varredura correspondente aos picos 1 a 9 evidenciados no EELr em 350 nm.



As espécies da família Combretaceae são reconhecidas produtoras de compostos fenólicos, que incluem flavonas e flavonóis (STACE, 2007). O resultado da prospecção fitoquímica confirmou essa característica para o EELr de *L. racemosa*.

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, são produtos do metabolismo secundário das plantas com papel no crescimento e reprodução. Uma das características principais desse grupo é o seu potencial redutor relacionado à forte capacidade de doar elétrons, sendo conhecidos como importantes antioxidantes naturais (VUOLO; LIMA; JUNIOR, 2019). O seu uso tem beneficiado o tratamento de várias doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e oxidativas (KUMAR et al., 2019; LUTZ et al., 2019). Outra atividade biológica de grande destaque para o grupo é a anti-inflamatória, amplamente estudada no meio científico (ANSARI; AHMAD; HAQQI, 2020).

O principal grupo de polifenóis são os flavonoides, que podem ser divididos nas mais variadas classes, sendo elas: neoflavonoides, flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas e proantocianidinas (MORAES et al., 2022).

A rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3-ramnoglicosídeo) é um flavonoide, pertencente a classe dos flavonóis e derivada da quercetina, que tem demonstrado uma extensa variedade de atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antioxidante e antidiabética. Pesquisas atuais apontam sua utilização no tratamento de algumas doenças crônicas cardiovasculares, infecções bacterianas e fibrose (PRASAD; PRASAD, 2019; SEMWAL et al., 2021). Assim como no trabalho atual, a rutina também foi identificada por Santos et al. (2021) ao estudarem o extrato aquoso das folhas de *L. racemosa* por CLAE, demonstrando que solventes de alta polaridade, como etanol e água, conseguem extrair pontualmente esse flavonoide.

Já as flavonas são uma classe de flavonoides reconhecida por sua capacidade antioxidante ao promover o sequestro de radicais livres e, especialmente, pelo seu potencial anti-inflamatório (SINGH et al., 2020; ARIFIN et al., 2021; WANG et al., 2021; FAN et al., 2022). Estudos demonstraram a atividade antioxidante e anti-inflamatória da rutina através da redução da expressão gênica e proteica do iNOS, do bloqueio do receptor TLR4 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, além da diminuição dos níveis de marcadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6, COX₂ e IL-1 β (LIU et al., 2019; TIAN et al., 2021; MUVHULAWA et al., 2022).

Para as flavonas, é relatada a ação inibidora da produção de óxido nítrico, regulação negativa na expressão de TNF- α e IL-6 e positiva para IL-10 (FAN et al., 2022). Os resultados do presente estudo, juntamente com os dados previamente relatados, colocam *L. racemosa* como uma espécie promissora para investigação de atividade anti-inflamatória através do modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

Glaserapp (2019) ao analisar as frações do extrato metanólico das folhas de *L. racemosa* identificou diversos flavonóis, sendo eles miricetina e seus glicosídeos, assim como taninos, incluindo a casuarina, o digaloil-hexaidroxidifenoil (HHDP)-glicose e três elagitaninos de estrutura desconhecida, assim como neste trabalho.

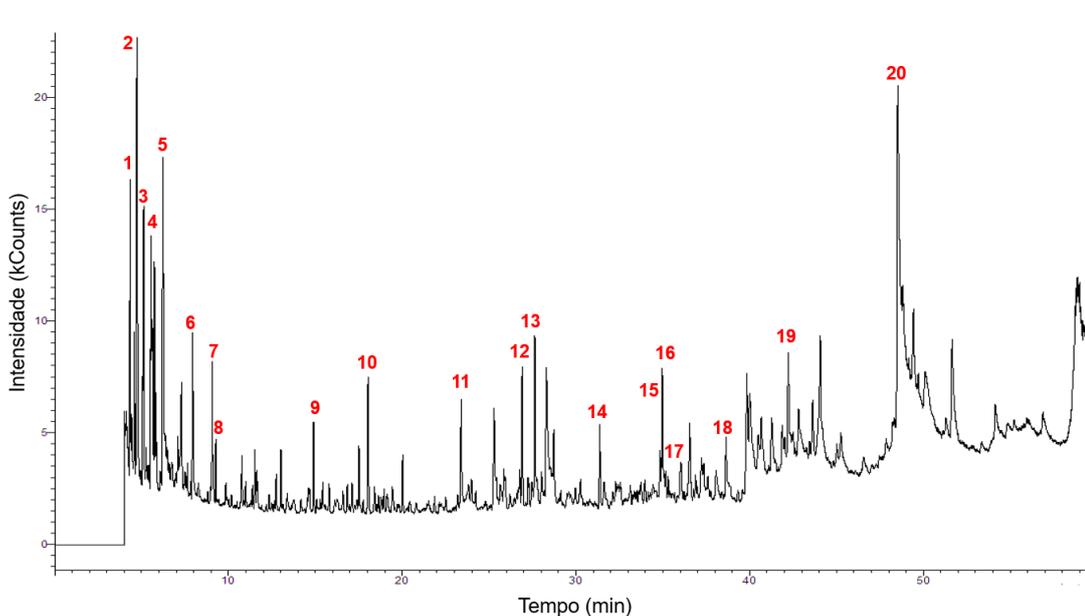
Costa et al. (2021) obtiveram resultados semelhantes ao estudar as frações n-hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa do extrato etanólico das folhas, encontrando miricetina, quercetina, kaempferol, catequinas e seus derivados, incluindo epicatequina e epigallocatequina. Além disso, outros estudos listaram a presença, no extrato metanólico das folhas, de saponinas, fitoesteróis, fenóis, taninos, esteroides, terpenoides, glicosídeos e flavonoides que englobavam flavonóis, flavonas e flavononas (SHI et al., 2010; PINHO et al., 2014; REDDY; AUDIPUDI, 2016).

A identificação de compostos com atividades biológicas comprovadas, como a rutina e as flavonas, estimulou a realização dos testes de avaliação da capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória.

4.2.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas (GC-MS)

GC-MS foi utilizada para caracterizar estruturalmente os compostos em EHLr (Figura 11) e EALr (Figura 12). Os componentes nos extratos foram identificados pelos picos descritos e suas respectivas áreas foram analisadas para facilitar a identificação estrutural. As Tabelas 4 e 5 mostram os valores para o tempo de retenção (tR) e o peso molecular (g/mol) identificados.

Figura 11 - Cromatograma por GC-MS do extrato hexânico das folhas de *L. racemosa* (EHLr).



Foram identificados 5 componentes principais no EHLr, considerando o peso molecular de um total de 21 picos que são representados por álcoois em sua grande maioria. A tabela 4 resume os fragmentos mais característicos observados no MS dos compostos.

Os compostos 2, 3, 4 e 5 (ciclopentanol, 1-etil-; 3,4-hexanodiol, 2,5-dimetil-; furano-, 2,5; dihidro-2,5-dimetil- e 2-nonenal, 9-oxo-, respectivamente) foram indicados como sendo os principais constituintes do EHLr pelo índice de intensidade, juntamente com o fitol, composto diterpênico de maior peso molecular (296 g/mol) correspondente ao pico 21 (tR = 48.557 min), conhecido por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (ISLAM et al., 2020). O pico 2 (tR = 14.931 min) foi identificado como nonadecano (268 g/mol). Os picos 14 (tR = 31.384 min), 16 (tR = 34.979 min) e 18 (tR = 38.639 min) correspondem ao composto 2-hexil-1-decanol, um hidrocarboneto alifático oxigenado, enquanto o 2-hexil-1-octanol (214 g/mol) foi constatado nos picos 17 (tR = 36.558 min), 19 (tR = 42.233min) e 20 (tR = 43.657min). O pico 13 (tR = 27.641 min) foi identificado como fenol,2,4-bis(1,1-dimetiletil)- (206 g/mol) composto fenólico volátil com propriedades antifúngicas.

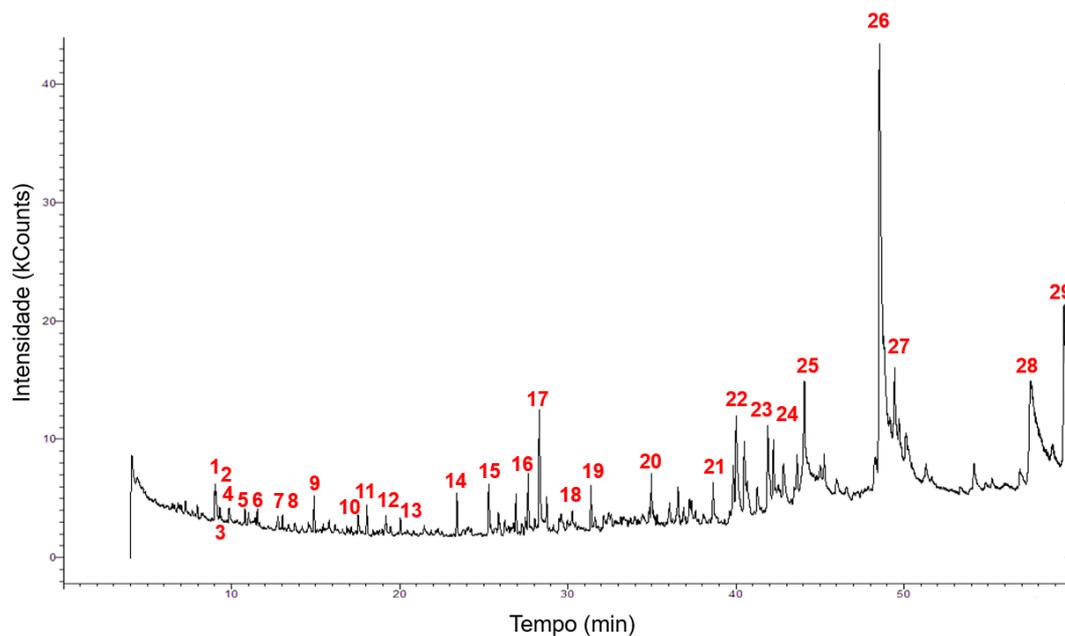
Tabela 4 - Dados de espectrometria de massa dos principais constituintes de EHLr.

Pico	tR	Área	Biblioteca/ID	Peso molecular (g/mol)
1	4.335	0.357	2H-Pirano-2-metanol, tetrahidro-	116
2	4.731	0.497	Ciclopentanol, 1-etil-	114
3	5.126	0.636	3,4-Hexanodiol, 2,5-dimetil-	146
4	5.747	0.854	Furano-, 2,5-dihidro-2,5-dimetil-	98
5	6.225	1.022	2-Nonenal, 9-oxo-	154
6	7.943	1.619	7- Oxabicyclo [4.1.0] heptano, 3-oxiranil-	156
7	9.064	2.007	1-Undecano, 4-metil	168
8	9.086	1.999	Decano	142
9	14.931	4.020	Nonadecano	268
10	18.060	5.102	1-Octanol, 2-butil-	186
11	23.406	6.951	Hidroxilamine, O-decil-	173
12	26.908	8.163	2-Hexil-1-octanol	214
13	27.641	8.421	Fenol,2,4-bis(1,1-dimetiletil) -	206
14	31.384	9.718	2-hexil -1-decanol	242
15	34.855	10.919	1-Undecanol	172
16	34.979	10.965	2-hexil -1-decanol	242
17	36.558	11.514	2-Hexil-1-octanol	214
18	38.639	12.234	2-hexil -1-decanol	242
19	42.233	13.480	2-Hexil-1-octanol	214
20	43.657	13.978	2-Hexil-1-octanol	214
21	48.557	15.684	Fitol	296

Fonte: Dados da pesquisa.

Para o EALr (Figura 10), foram obtidos 29 picos constituídos por álcoois e hidrocarbonetos em sua maioria, que revelaram sete compostos de maior peso molecular, apresentados na Tabela 5, além do fitol (296 g/mol) e o nonadecano (268 g/mol) presentes também no EHLr.

Figura 12 - Cromatograma por GC-MS do extrato acetato de etila das folhas de *L. racemosa* (EALr).



O fitol, correspondente ao pico 26 (tR = 48.536 min), mostrou ser por seu índice de intensidade o principal componente de ambos os extratos. Os picos 20 (tR = 38.646 min) e 29 (tR = 59.530 min) correspondem ao 1,1-bis(dodeciloxi)hexadecano (595 g/mol). A substância 5 foi identificada como 2,2,4-Trimetil-3-(3,8,12,16-tetrametilheptadeca-3,7,11,15-tetraenil)-ciclo-hexanol (428 g/mol), o qual foi descrito por apresentar atividade anti-inflamatória (SRIVASTAVA; MUKERJEE; VERMA, 2015; SHAREEF ET AL., 2016). A substância 24 (tR 42.236 min), cuja estrutura é octadecano,1-cloro (288 g/mol), é um composto adequado como agente de biocontrole contra fungos fitopatogênicos (ABDEL-MOTAAL et al., 2022). O pico 27 (tR = 49.446 min) representa o ácido oleico (282 g/mol) que, por sua vez, pode regular diretamente a síntese e as atividades de enzimas antioxidantes e possui efeito anti-inflamatório possivelmente relacionado à inibição de citocinas pró-inflamatórias (SANTA-MARIA et al., 2023). Quanto ao pico 23 (tR 41.898 min), sua representação 7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro [4,5]deca-6,9-dieno-2,8-diona (276 g/mol) foi relatada por possuir efeitos antioxidantes e antimicrobianos (PUTRI et al., 2020). Os picos 22 (tR 40.017 min) e 25 (tR 44.078 min) correspondem, respectivamente, aos compostos 2-Pentadecanona, 6, 10, 14-trimetil- (268 g/mol) e ácido n-hexadecanóico (256 g/mol), descritos por estudos como tendo capacidades antimicrobianas reconhecida (NURETTIN et al., 2006; GANESAN et al., 2022).

Tabela 5 - Dados de espectrometria de massa dos principais constituintes do EALr.

Pico	tR	Área	Biblioteca/ID	Peso molecular (g/mol)
1	9.027	1.979	2,6,6-Trimetilundeca-1,3-dien-9-y-5-ona	204
2	9.302	2.074	1-Octanol, 2-butil-	186
3	9.858	2.266	Ciclopropanocarboxaldeído, 2-metil-2-(4-metil-3-penten-1-il) -, (1R,2R) -rel-	166
4	10.795	2.590	2,3-Dimetildecano	170
5	11.015	2.666	E-3-Pentadecen-2-ol	226
6	11.544	2.849	Benzeno, 1,2,4,5-tetrametil	134
7	12.762	3.270	1,3-Ciclopentadieno,1,2,3,4-tetrametil-5-metileno	134
8	13.042	3.367	Silano, ciclohexildimetoximetil-	188
9	14.920	4.016	Hidroxilamina, O-decil-	173
10	17.528	4.918	1-Hexadecanol-2-metil-	256
11	18.055	5.100	Nonadecano	268
12	19.189	5.492	1-Octanol,2-butil	186
13	20.044	5.788	Nonadecano	268
14	23.412	6.952	2,3-Dimetildecano	170
15	25.301	7.605	5,9-Undecadien-2-ona,6,10-dimetil-, (E)-	194
16	27.647	8.416	Fenol,2,4-bis(1,1-dimetiletil)-	206
17	28.309	8.646	2(4H) -Benzofuranona, 5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-, (R)-	180
18	31.383	9.710	1-Decanol, 2-hexil-	242
19	34.990	10.957	2-Hexil-1-octanol	214
20	38.646	12.221	1,1-bis(dodeciloxi)hexadecano	595
21	39.842	12.635	Fitol	296
22	40.017	12.696	2-Pentadecanona, 6, 10, 14-trimetil-	268
23	41.898	13.349	7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro[4,5]deca-6,9-dieno-2,8-diona	276
24	42.236	13.467	Octadecano, 1-cloro	288
25	44.078	14.107	Ácido n-hexadecanóico	256
26	48.536	15.654	Fitol	296
27	49.446	16.009	Ácido oleico	282
28	57.521	18.834	2,2,4-Trimetil-3-(3,8,12,16-tetrametil-heptadeca-3,7,11,15-tetraenil)-ciclo-hexanol	428
29	59.530	19.583	1,1-Bis(dodeciloxi)hexadecano	595

De acordo com os dados do estudo, os EHLr e EALr apresentaram em sua constituição compostos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas que estimularam as investigações descritas nessa Tese.

4.2.4 Determinação do teor de fenóis totais, flavonóis e proantocianidinas dos extratos de *L. racemosa*

Uma vez que a caracterização fitoquímica descrita revelou componentes nos extratos que têm sido reconhecidos como antioxidantes naturais, a quantificação do teor desses compostos em EHLr, EALr e EELr foi determinada.

Os resultados expressos na Tabela 6 mostram a presença de flavonóis em EHLr, EALr e EELr ($369,47 \pm 36,17$ mg EQ/g; $347,25 \pm 23,51$ mg EQ/g e $344,75 \pm 9,39$ mg EQ/g, respectivamente). As proantocianidinas foram mensuradas em maior quantidade em EHLr ($39,88 \pm 12,57$ mg EC/g), enquanto EELr apresentou mais que o dobro da concentração de fenóis totais ($241,77 \pm 3,6$ mg EAG/g) em relação aos demais extratos.

Tabela 6 - Teor de fenóis totais, flavonóis e proantocianidinas presentes nos extratos das folhas de *L. racemosa*.

Extrato	Teor de fenóis totais (mg EAG/g)	Teor de flavonóis (mg EQ/g)	Teor de proantocianidinas (mg EC/g)
EHLr	$67,83 \pm 3,91$	$369,47 \pm 36,17$	$39,88 \pm 12,57$
EALr	$90,86 \pm 2,27$	$347,25 \pm 23,51$	$20,44 \pm 0,78$
EELr	$241,77 \pm 3,60$	$344,75 \pm 9,39$	$14,55 \pm 0,00$

Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão.

Dentre os polifenóis com elevada capacidade antioxidante, as proantocianidinas se destacam por serem flavonoides formados por polímeros de flavan-3-ol. Em sua grande maioria, são encontradas na forma de procianidinas, seu grupo mais abundante, ao serem constituídas por unidades de catequina e epicatequina (ENOMOTO et al., 2020). Assim como os compostos fenólicos, elas possuem a capacidade de neutralizar radicais livres ajudando na proteção contra danos oxidativos (CHAI et al., 2018). Há relatos na literatura sobre a sua atuação na diminuição da inflamação das vias aéreas em modelo de asma murina (RAUF et al., 2019). Os flavonóis, por sua vez, são considerados flavonas que apresentam uma hidroxila na posição C3 de sua estrutura (YANG et al., 2021).

Alguns estudos têm demonstrado que essa conformação estrutural confere aos flavonóis um princípio antioxidante (PIETTA, 2000) e anti-inflamatório (JAZVINŠČAK JEMBREK et al., 2021). Os representantes mais comuns dessa classe nos vegetais são a quercetina e a miricetina (MARÍN et al., 2018).

A família Combretaceae possui relevante acervo literário a respeito do conteúdo de metabólitos presentes em suas espécies, como indicou o estudo de Souza (2021) que quantificou o teor de fenóis do extrato etanólico das folhas de *Combretum leprosum* e obteve o valor de $212,59 \pm 10,84$ mg EAC/g de fenóis totais, enquanto o extrato da casca para esse mesmo solvente revelou valores de $232,10 \pm 3,60$ mg EAG/g.

Rajabpour, Mashahdi e Ghorbani (2019) mostraram que o extrato etanólico e aquoso das folhas de *Conocarpus erectus* (Combretaceae), uma espécie pertencente ao manguezal tal qual a *L. racemosa*, apresentou valores de 75,17 mg EAG/g e 67,70 EAG/g para polifenóis.

Cruz, Marroquín e Cáceres (2019) ao estudarem a espécie *L. racemosa* revelaram significativos teores de compostos fenólicos nos extratos hexânico (16,61 EAG/g) diclorometano (58,40 EAG/g), acetato de etila (28,21 EAG/g) e etanólico (182,77 EAG/g) das folhas coletadas na Guatemala. Nesse mesmo estudo, os extratos etanólicos da casca e da raiz apresentaram valores fenólicos de 179,04 EAG/g e 188,40 EAG/g, respectivamente, sendo índices superiores aos demais extratos, contudo inferiores aos encontrados neste trabalho.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *L. racemosa*

Segundo Santos-Sánchez et al. (2019), o uso de diferentes métodos ao investigar o potencial de compostos na diminuição de agentes oxidantes é uma estratégia importante para atestar distintas formas de ação da substância. Nesse sentido, este trabalho utilizou três metodologias diferentes para investigar a capacidade antioxidante dos extratos de *L. racemosa*. Dessa forma, os métodos são considerados complementares, o que está em consonância com Gulcin (2020) que propõe a utilização mínima de duas metodologias para a confirmação da atividade.

A atividade antioxidante dos extratos avaliada pelos métodos DPPH, ABTS e fosfomolibdênio está representada na Tabela 7. O EELr foi o único a apresentar relevante capacidade de sequestro dos radicais livres DPPH ($178,80 \pm 0,80 \mu\text{g/mL}$) e ABTS ($275,50 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$) quando comparado ao padrão Trolox. Para o método de fosfomolibdênio, os extratos não apresentaram considerável atividade redutora em relação ao ácido ascórbico.

Tabela 7 – Concentração inibitória de 50% (IC₅₀) dos extratos de *L. racemosa* pelos métodos de DPPH, ABTS e do fosfomolibdênio.

Extrato/Padrão	DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/mL)	Fosfomolibdênio (µg/mL)
EHLr	1381 ± 0,3	-	2782,5 ± 0,6
EALr	1927,7 ± 0,2	-	2790 ± 0,3
EELr	178,8 ± 0,8	275,5 ± 0,9	2825 ± 0,7
Trolox	56,5 ± 0,5	36,7 ± 0,6	-
Ácido ascórbico	-	-	230,5 ± 0,4

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão.

A atividade antioxidante dos produtos naturais pode ser avaliada por uma variedade de metodologias, dentre as mais comuns estão os testes de captura dos radicais livres DPPH e ABTS, além da capacidade antioxidante total por meio da quantificação do fosfomolibdênio (UNTEA et al., 2018). Outras metodologias analisam a redução de ferro (FRAP) e dos produtos formados pela peroxidação lipídica (TBARS) (BENZIE et al., 2018; PALMIERI et al., 2020; TEMIZ et al., 2021).

O DPPH (2,2 difenil – 1- picrilhidrazil) é um radical livre que possui coloração violeta e, ao entrar em contato com um agente antioxidante, passa por um processo de redução, se tornando amarelo. Esse teste colorimétrico é considerado rápido e eficiente para produtos naturais, além do seu baixo custo, assim como o método ABTS que consiste na oxidação do radical (2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico] por persulfato de potássio, produzindo uma coloração azul-verde. O resultado de ambos os métodos pode ser calculado a partir da concentração capaz de reduzir 50% do número de radicais (CE₅₀) (SIRIVIBULKOVIT; NOUANTHAVONG; SAMEENOI, 2018; WOŁOSIAK et al., 2022). Já o ensaio da capacidade antioxidante total (CAT) é baseado na redução do molibdênio (IV) a molibdênio (V) ao formar o complexo entre fosfato/molibdênio (V) de coloração verde (ZENGIN et al., 2014).

A família Combretaceae possui espécies com atividade antioxidante reconhecida, como confirmaram Famen et al. (2020) ao estudarem indivíduos dos gêneros *Terminalia* e *Combretum*, sendo eles: *Terminalia arjuna*, *T. alata*, *T. bellerica*, *T. cataappa*, *T. chebulla*, *T. buccera* e *T. mauritiana*, *Combretum albidum*, *C. roxburghii* e *C. indicum*. Foram utilizados os métodos de eliminação de radicais superóxido (SOD) e atividade das enzimas catalase e guaiacol peroxidase nesses estudos.

Santos et al. (2020), por sua vez, ao avaliarem a lignina isolada da espécie de manguezal *Conocarpus erectus*, atestaram valores de CE_{50} de 231,16 e 356,03 $\mu\text{g/mL}$ nos ensaios de DPPH e ABTS, respectivamente, além de apresentar inibição da peroxidação lipídica (SANTOS et al., 2020)

Para a espécie *L. racemosa*, a literatura ratifica as capacidades antioxidantes relacionadas à família Combretaceae, como mostra o estudo de Shi et al. (2010) que avaliaram os componentes isolados da casca da espécie. O denominado pelos autores de composto 5 ($C_{24}H_{18}O_8$) teve melhor desempenho no teste de DPPH, com valor de CE_{50} de 27,50 μM , comparado ao padrão quercetina ($CE_{50} = 20,86 \mu\text{M}$). No que diz respeito a pesquisa de Santos et al. (2021) foi demonstrada a atividade do extrato aquoso das folhas nos testes de DPPH e ABTS, com valores de CE_{50} 96,82 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao ácido ascórbico ($CE_{50} = 19,15 \mu\text{g/mL}$) e $59,60 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$ relacionado ao mesmo padrão ($CE_{50} = 99,90 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$), respectivamente, além de percentuais de inibição de 26,84% para o teste de fosfomolibdênio e $26,81 \pm 0,01\%$ na peroxidação lipídica.

No estudo de Cruz; Marroquín e Cáceres (2019) foi verificado que apenas os extratos etanólicos da casca, folhas e raiz de *L. racemosa* apresentaram capacidade de sequestro do radical ABTS ante aos demais extratos (hexânico, acetato de etila e diclorometano), o que também foi observado no presente trabalho. Já Moraes et al. (2021) indicaram uma relação entre a quantidade de composto fenólicos ($CE_{50} = 408,57 \pm 14,46 \text{ mg EAG/g}$) no extrato etanólico das folhas e o desempenho no sequestro de radicais DPPH ($CE_{50} = 6,32 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$), em relação ao padrão quercetina ($1,32 \pm 0,05$). Os dados deste estudo corroboram essa relação para o radical DPPH e pode estar associada à capacidade dos polifenóis na estabilização de moléculas estruturalmente instáveis ao doar elétrons de seu arranjo (XU et al., 2021; LIU; MABURY., 2021). A rutina, identificada em EELr, é reconhecida pela capacidade redutora (GIRSANG et al., 2020; EKAETTE; SALDAÑA, 2021; KREPS et al., 2021).

Sendo assim, os achados relatados nessa Tese colocam o EELr como fonte promissora de capacidade antioxidante e, juntamente com relatos prévios citados aqui, indicam que essa atividade está possivelmente associada à presença de compostos fenólicos, flavonóis e proantocianidinas em sua constituição.

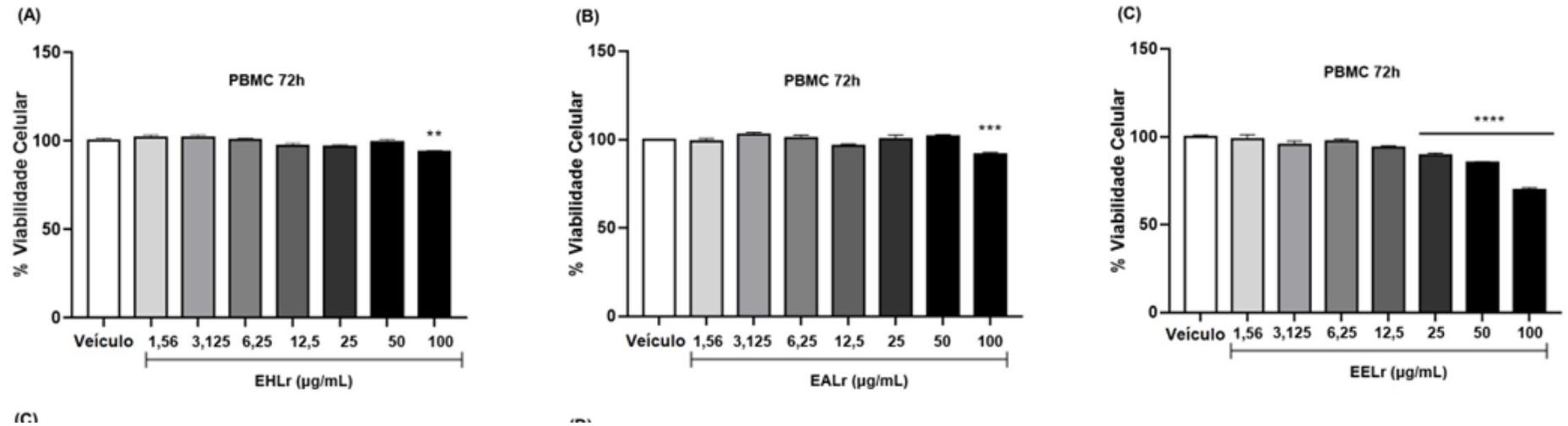
4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *L. racemosa*

Antes de avaliar os extratos de *L. racemosa* para quaisquer atividades farmacológicas *in vivo*, julgou-se necessário investigar possíveis sinais de sua toxicidade, em decorrência dos relatos de efeitos indesejados causados pela administração de produtos naturais sem o conhecimento prévio da sua segurança de uso (BEDROOD, Z.; RAMESHRAD, M.; HOSSEINZADEH, 2018; BISHOP-FREEMAN et al., 2020).

4.4.1 Ensaio de viabilidade celular frente à PBMC

Os resultados do teste de citotoxicidade sobre células mononucleares (Figura 13) mostraram que os extratos de *L. racemosa* reduziram significativamente a proliferação celular na concentração de 100 µg/mL, e a partir de 25 µg/mL para o EELr ($p < 0,001$). Entretanto, nenhum dos extratos foi capaz de reduzir 50% do número de células viáveis até a concentração de 100 µg/mL ($CI_{50} > 100$ µg/mL).

Figura 13 - Avaliação viabilidade celular (%) dos extratos de *L. racemosa* sobre PBMC após 72 h de tratamento pelo ensaio do MTT.



Valores em médias \pm desvio padrão. ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 dos EHLr (A), EALr (B) e EELr (C).

Estudos *in vitro* que investiguem a toxicidade basal de compostos a nível celular antes do seu uso em organismos vivos são de extrema importância para a farmacoterapia (SHRESTHA et al., 2020). Através desses testes, observa-se o comportamento de determinados produtos em contato com células normalmente típicas do quadro clínico a ser estudado, para identificar possíveis alterações enzimáticas que as levem à morte (VINKEN; BLAAUBOER, 2017).

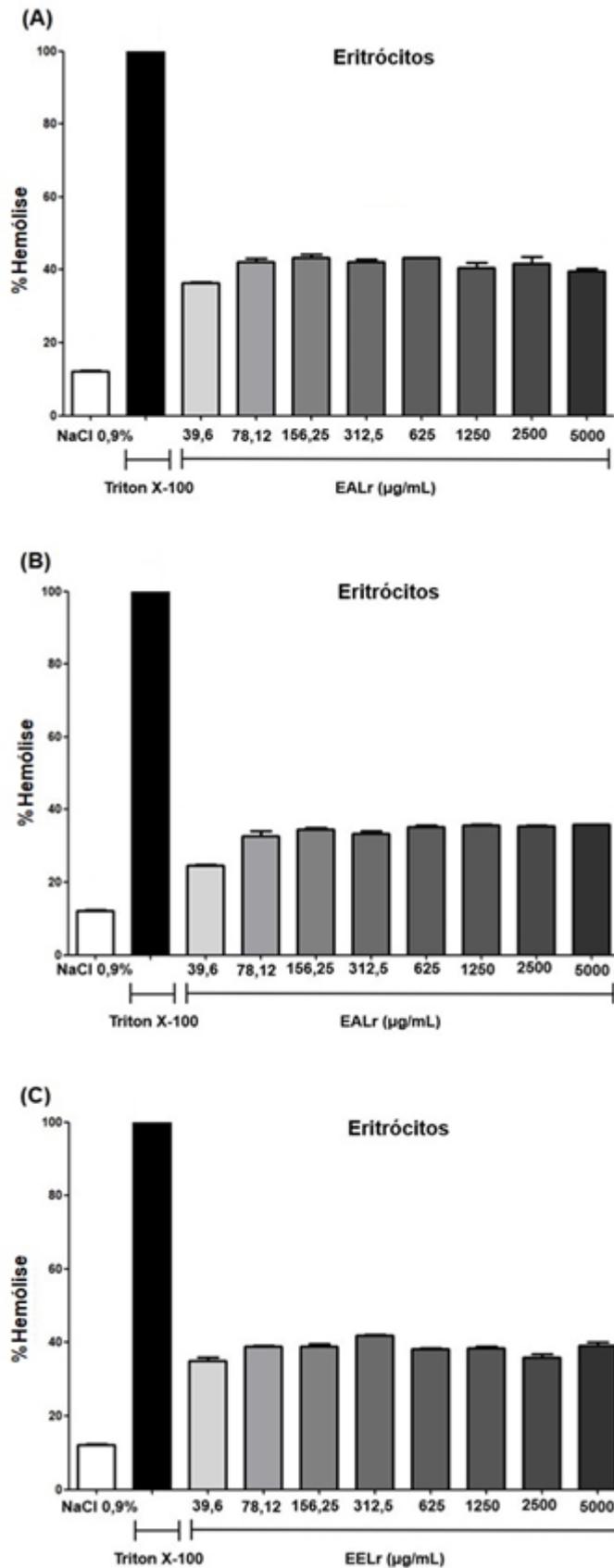
Experimentos que envolvam a atividade citotóxica de compostos utilizam frequentemente o ensaio de MTT. Esse método consiste na avaliação da viabilidade celular por meio da função mitocondrial das células vivas. O MTT é um sal de coloração amarelada que sofre redução dentro da mitocôndria pela enzima succinato desidrogenase que catalisa a reação de formação dos cristais de formazan, que possuem coloração púrpura. A produção desses cristais é diretamente proporcional a quantidade de células viáveis (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). A escolha da linhagem celular deve estar condicionada ao quadro clínico a ser estudado futuramente. Células mononucleares, que incluem linfócitos e monócitos, são exemplos de alvos comuns em ensaios citotóxicos por serem de fácil manuseio e produtividade (LI et al., 2019).

A literatura científica descreve que os extratos aquosos das espécies *C. erectus* e *L. racemosa* podem levar à apoptose de linfócitos e monócitos quando utilizadas em concentrações acima de 6 µg/mL e 12,5 µg/mL, respectivamente (SANTOS et al., 2018; SANTOS et al., 2021). Essas características citotóxicas são acompanhadas de outros relatos de espécies da família Combretaceae, como expuseram Silva et al. (2015) ao mostrar que o lupano, triterpeno isolado de *Combretum leprosum*, é citotóxico para PBMCs em concentrações acima de 1,5 µg/mL, enquanto Chen et al. (2009) fizeram observações semelhantes acerca dos taninos isolados de *Terminalia calamansanai* também para PBMCs. Entretanto, o presente trabalho revelou que concentrações iguais ou menores que 100 µg/mL dos extratos de *L. racemosa* não foram capazes de levar a morte celular de 50% do número de PBMCs. Em relação às linhagens tumorais, experimentos mostraram que componentes isolados da casca de *L. racemosa* são capazes de inibir a proliferação celular de várias linhagens de células tumorais (SHI et al., 2009). Sendo assim, fica evidente a propriedade citotóxica seletiva da espécie, visto a baixa toxicidade para PBMCs indicada no nosso estudo.

4.4.2 Avaliação da atividade hemolítica

No ensaio citotóxico utilizando eritrócitos murinos, verificou-se que EHLr, EALr e EELr apresentaram CH_{50} (concentração necessária para hemolisar 50% do número de eritrócitos) maior do que 5000 $\mu\text{g/mL}$ e, dessa forma, não foram capazes de induzir hemólise significativa (Figura 14).

Figura 14 - Avaliação hemolítica dos (CH₅₀) dos extratos de *L. racemosa*.



Valores em médias \pm desvio padrão. ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. EHLr (B), EALr (C) e EELr (D).

Há comprovações que alterações estruturais na membrana das hemácias podem acontecer quando em contato com inúmeros fármacos, podendo acarretar a ruptura dessa barreira celular e extravasamento de hemoglobina para o espaço extracelular, caracterizando a hemólise (RENARD; ROSSELET, 2017; FAGHIH; SHARP, 2019). A quebra dessa proteção pode levar a desordens fisiológicas associadas ou não ao estresse oxidativo, tais como problemas cardíacos e respiratórios (FIDAN et al., 2018). Estando o potencial hemolítico associado à citotoxicidade de um composto, é necessária a realização desse teste na triagem *in vitro* de substâncias (RINBEIRO et al., 2020).

Não foram encontrados dados na literatura acerca do potencial toxicológico da espécie *L. racemosa* sobre eritrócitos. A ausência da atividade hemolítica de EHLr, EALr e EELr, nas concentrações testadas, aliada à baixa toxicidade para PBMCs, abre margem para investigação da segurança de uso dos extratos por meio de testes não clínicos *in vivo*.

4.4.3 Ensaio toxicológico não clínico agudo

EELr foi selecionado para prosseguir com os testes *in vivo*, com base no seu desempenho na atividade antioxidante *in vitro* associada ao teor de compostos bioativos dosados. A observação dos animais (n=3), após o tratamento por via oral com EELr a 2.000 mg/kg, mostrou que o extrato apresentou baixa toxicidade nas condições testadas, uma vez que não foram constatados alterações relevantes quanto ao consumo de água e ração, e ganho de massa corporal (Tabela 8), bem como nenhuma morte foi registrada. Disfunções metabólicas e fisiológicas são frequentemente refletidas no consumo de água e ração, além do ganho de massa corporal, em função do balanço nutricional do organismo quando ocorre toxicidade oral (COLLIER; RENQUIST; XIAO, 2017).

Posteriormente, três animais adicionais receberam o tratamento (EELr a 2.000 mg/kg) e, novamente, não ocorreram óbitos durante o período de 14 dias após o tratamento. A ausência de mortes impossibilita o cálculo da DL₅₀, indicando que esse índice é superior a 2.000 mg/kg de peso corporal e classificando o EELr na categoria 5 de toxicidade segundo a *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS) (OECD, 2001).

Também não foram verificadas mudanças relevantes nas massas e nas características macroscópicas dos órgãos vitais entre os dois grupos (Tabela 8). O estado e a atividade dos órgãos são indicadores importantes no diagnóstico de fisiopatologias, no que diz respeito ao uso de substâncias tóxicas (WANG, 2019).

Em relação aos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Tabela 9), não foram constatadas diferenças estatísticas entre o grupo tratado e o grupo controle.

Tabela 8 - Efeitos da administração aguda do EELr na dose de 2.000 mg/kg sobre a massa corporal, o consumo de ração, a ingestão hídrica e a massa relativa dos órgãos de camundongos.

Parâmetros	Tratamentos	
	Controle	EELr 2.000 mg/kg
Consumo de ração (g)	36,8 ± 2,9	36 ± 2,1
Consumo de água (mL)	36,6 ± 4,8	38,5 ± 5,4
Ganho de massa corporal (g)	3,5 ± 1,0	3,16 ± 0,9
Índice de órgãos (mg/g)		
Fígado	7,67 ± 0,78	7,64 ± 1,00
Rim esquerdo	0,72 ± 0,07	0,71 ± 0,08
Rim direito	0,70 ± 0,08	0,72 ± 0,05
Baço	0,87 ± 0,29	0,93 ± 0,20

Valores em média ± desvio padrão (n=6). Análise por teste "t" de *Student*. Diferenças significativas não foram observadas.

Tabela 9 - Efeitos da administração aguda do EELr na dose de 2.000 mg/kg sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos.

Parâmetros	Tratamentos	
	Controle	EELr 2.000 mg/kg
Análise Hematológica		
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	98,87 ± 2,81	95,81 ± 3,47
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,56 ± 3,18	8,35 ± 1,46
Hemoglobina (g/dL)	27,04 ± 3,73	24,35 ± 3,88
Hematócrito (%)	36,96 ± 5,78	44,06 ± 9,20
VCM (fm ³)	54,5 ± 1,04	53,83 ± 1,60
HCM (pg)	40,18 ± 1,34	38,93 ± 0,97
CHCM (g/dL)	73,86 ± 2,33	72,63 ± 2,16
Análise Bioquímica		
Ureia (mg/dL)	50,26 ± 0,02	50,16 ± 2,85
Creatinina (mg/dL)	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,03
TGO/AST (U/L)	108,66 ± 7,78	112,33 ± 5,46
TGP/ALT (U/L)	64,5 ± 4,76	64 ± 5,54
Proteínas totais (mg/dL)	4,7 ± 0,42	4,95 ± 0,40
Fosfatase alcalina (mg/dL)	166,5 ± 25,74	135,5 ± 18,14

Valores expressos em média ± desvio padrão (n=6). Análise por teste "t" de *Student*. Diferenças significativas não foram observadas

Elementos plasmáticos como a ureia e a creatinina são biomarcadores da função renal, sobretudo, para a filtração glomerular. Alterações nesses padrões podem ser indícios de danos aos rins, que podem evoluir para comprometimentos pontuais ao sistema nervoso central (RENDA, 2017; SALUJA et al., 2019). Em contrapartida, o fígado é um órgão multifuncional relacionado ao metabolismo e inativação de substâncias tóxicas. Quando afetado, causa o aumento ou diminuição dos seus marcadores, como a fosfatase alcalina e as enzimas transaminases, sendo elas: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (CHEN et al., 2017). A ausência de alterações relacionadas a esses órgãos indica que a ingestão aguda de EELr não acarretou prejuízos à sua integridade nas condições avaliadas.

Estudos toxicológicos *in vivo* são de extrema importância para fornecer informações sobre os riscos da administração de fármacos e possibilitar a seleção de doses seguras para testes posteriores (BUS, 2017). Esses ensaios são realizados em animais de pequeno porte, como roedores, com o objetivo de avaliar taxa de mortalidade, além de possíveis alterações comportamentais e fisiológicas (BELOVICOVA et al., 2017; REINER et al., 2019).

A baixa toxicidade das espécies da família Combretaceae tem sido bem reportada, no entanto, estudos *in vivo* sobre o potencial toxicológico de *L. racemosa* são escassos (MOHAMMED; ALHASSAN, 2020; AMALI et al., 2020; AHMAD et al., 2021). Youssouf et al. (2019) e Kpemissi et al. (2020) relataram valores de $DL_{50} > 5.000$ mg/kg para extratos de *Terminalia macroptera* e *Combretum micranthum*, respectivamente, em experimentos de toxicidade aguda utilizando roedores.

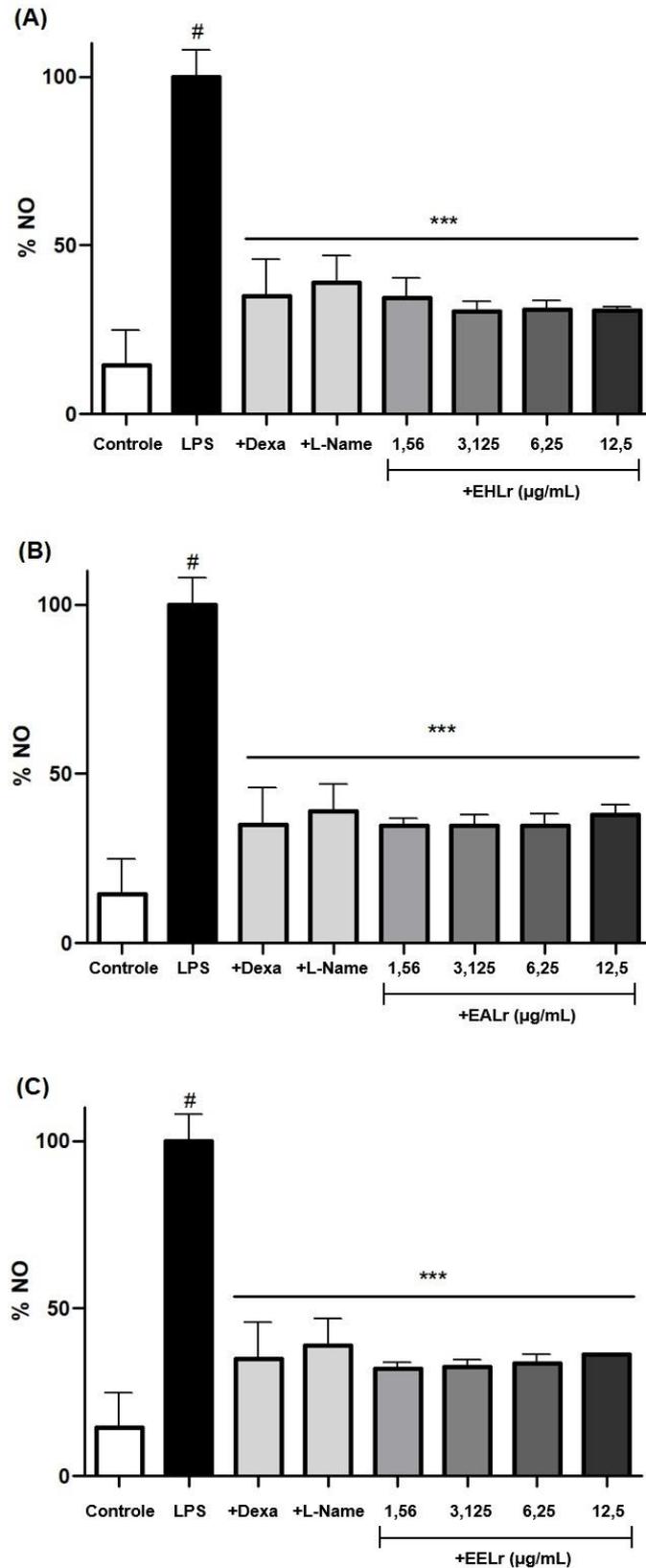
No presente trabalho, o extrato etanólico de folhas de *L. racemosa* não promoveu evidências de toxicidade relevante em camundongos fêmeas, o que suporta, nas condições descritas aqui, a continuidade desta pesquisa com estudos toxicológicos.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *L. racemosa*

4.4.4 Atividade anti-inflamatória *in vitro*

Para avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*, foi quantificado o efeito dos extratos de *L. racemosa* na produção de NO por macrófagos intraperitoneais murinos estimulados por LPS. A Figura 15 revela que os extratos reduziram ($p < 0,001$) a produção de NO em todas as concentrações testadas, em comparação ao grupo LPS não tratado, sugerindo sua capacidade anti-inflamatória.

Figura 15 - Avaliação do efeito anti-inflamatório *in vitro* dos extratos de *L. racemosa* sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos intraperitoneais murinos.



Valores em médias \pm desvio padrão. ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ dos +EHLr (B), +EALr (C) e +EELr (D) em relação ao controle LPS (#).

Os macrófagos são células fagocitárias mononucleares consideradas multifuncionais por adotarem características pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, a depender da situação. Eles podem ser encontrados em diferentes tecidos e participam diretamente das respostas imunológicas inatas e adaptativas (ARABPOUR; SAGHAZADEH; REZAEI, 2021). Na linha de defesa leucocitária promovida pelo organismo em resposta à inflamação, os macrófagos ocupam um lugar de evidência no que diz respeito à sinalização de citocinas e quimiocinas, que servem como importantes mensageiros moduladores do processo. Na resposta pró-inflamatória, são responsáveis por sinalizar interleucinas, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e, principalmente, o TNF e o NO (MEIDANINIKJEH et al., 2021).

O NO é um dos principais mediadores que agem na inflamação, envolvido especialmente no processo de vasodilatação, possibilita o aumento da permeabilidade vascular e o consequente recrutamento de leucócitos para o local da lesão (RAJENDRAN et al., 2019). Ele é produzido a partir da L-arginina, por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que catalisa a reação de oxidação, podendo ser encontrada em três isoformas no organismo. A mais importante delas é a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) por produzir grandes quantidades de NO durante o processo inflamatório através das células de defesa recrutadas, como macrófagos e neutrófilos, após a exposição à citocinas pró-inflamatórias e agentes microbianos (CINELLI et al., 2020).

Modelos *in vitro* envolvendo o uso de macrófagos peritoneais ou da linhagem RAW 264.7 estimulados por LPS são amplamente estudados para função anti-inflamatória de produtos, tendo em vista que essa molécula ativa os receptores TLR4 macrofágicos dando início a uma cascata de sinalização pró-inflamatória, a qual o NO está envolvido pelo aumento na expressão de iNOS (JEONG et al., 2019; BAGAEV et al., 2019). A dexametasona e o L-NAME (N- nitro-L-arginina metil éster) podem ser usados como padrão, sendo este um inibidor competitivo da arginina que promove a diminuição da atividade enzimática do iNOS (GOUVEIA et al., 2018).

Santos et al. (2021) relataram que o extrato aquoso de *L. racemosa* se mostrou capaz de reduzir os níveis de NO produzidos por esplenócitos.

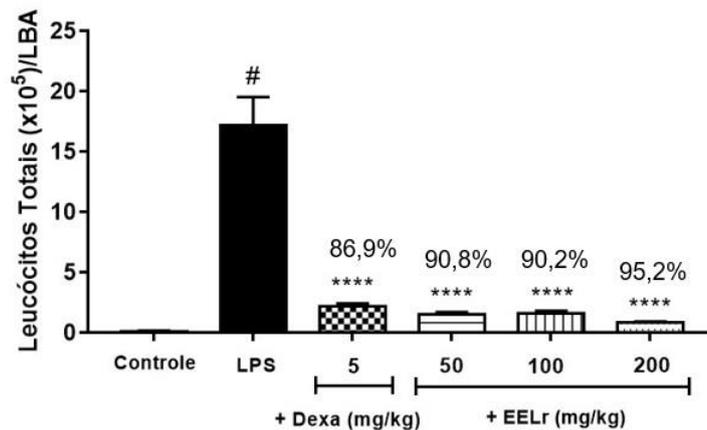
Neste trabalho, os resultados mostraram que os extratos de *L. racemosa* reduziram significativamente a produção de NO por macrófagos intraperitoneais, colocando assim a espécie como uma alternativa importante no estudo anti-inflamatório *in vivo*.

4.4.5 Lesão pulmonar aguda induzida por LPS

Como explanado anteriormente, para esse experimento, EELr foi selecionado por seu perfil fitoquímico e desempenho no teste antioxidante *in vitro*, assim como nos demais testes de *screening*. O resultado da DL₅₀ de EELr maior que 2.000 mg/kg para camundongos permitiu selecionar as doses de 50, 100 e 200 mg/kg para a avaliação da atividade anti-inflamatória no modelo de LPA.

Os resultados da análise da migração leucocitária, por meio do lavado broncoalveolar dos camundongos submetidos à lesão pulmonar aguda induzida por LPS encontram-se na Figura 16. A partir desse modelo foi realizada a determinação dos níveis de MPO, NO e a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, INF- γ e TNF- α , além da análise histológica dos pulmões. EELr apresentou atividade anti-inflamatória, independente de dose, indicada por uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) no número total de leucócitos que migraram para o interior dos pulmões quando comparados ao grupo LPS. O tratamento com EELr a 50, 100 e 200 mg/kg resultou em percentuais de inibição da migração leucocitária de 90,8%, 90,2% e 95,2%, respectivamente.

Figura 16 - Efeito do tratamento com EELr sobre o recrutamento de leucócitos para o pulmão dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS.



Valores em média \pm desvio padrão (n=6). ANOVA seguido de pós-teste Tukey. **** $p < 0,0001$, comparando ao grupo LPS (#). LBA: lavado broncoalveolar; +Dexa: dexametasona; +EELr: extrato etanólico de *L. racemosa*.

A inflamação induzida por LPS no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) em camundongos reproduz uma resposta inflamatória semelhante a alteração patogênica da síndrome respiratória aguda grave (SRAG), o mesmo quadro clínico característico da segunda fase da Covid-19 em indivíduos acometidos pelo vírus SARS-CoV-2. É considerado um modelo convencional, não clínico, para avaliar o potencial anti-inflamatório de produtos e sua atuação por diferentes vias (MUÑOZ-FONTELA et al, 2020).

A LPA está associada a uma acentuada reação inflamatória nas vias respiratórias e é reproduzida experimentalmente através da administração de agentes pró-inflamatórios nos pulmões (SHAABAN et al., 2018; AN et al., 2019). Isso acarreta o comprometimento da integridade alvéolo-capilar, seguido do influxo de leucócitos para os pulmões e ocasionando uma insuficiência respiratória grave. Assim, há aumento de leucócitos polimorfonucleares (PMN), principalmente de neutrófilos, acompanhado da elevação na atividade da enzima MPO e dos níveis NO e ainda há a participação de citocinas do tipo pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α (WANG et al., 2008).

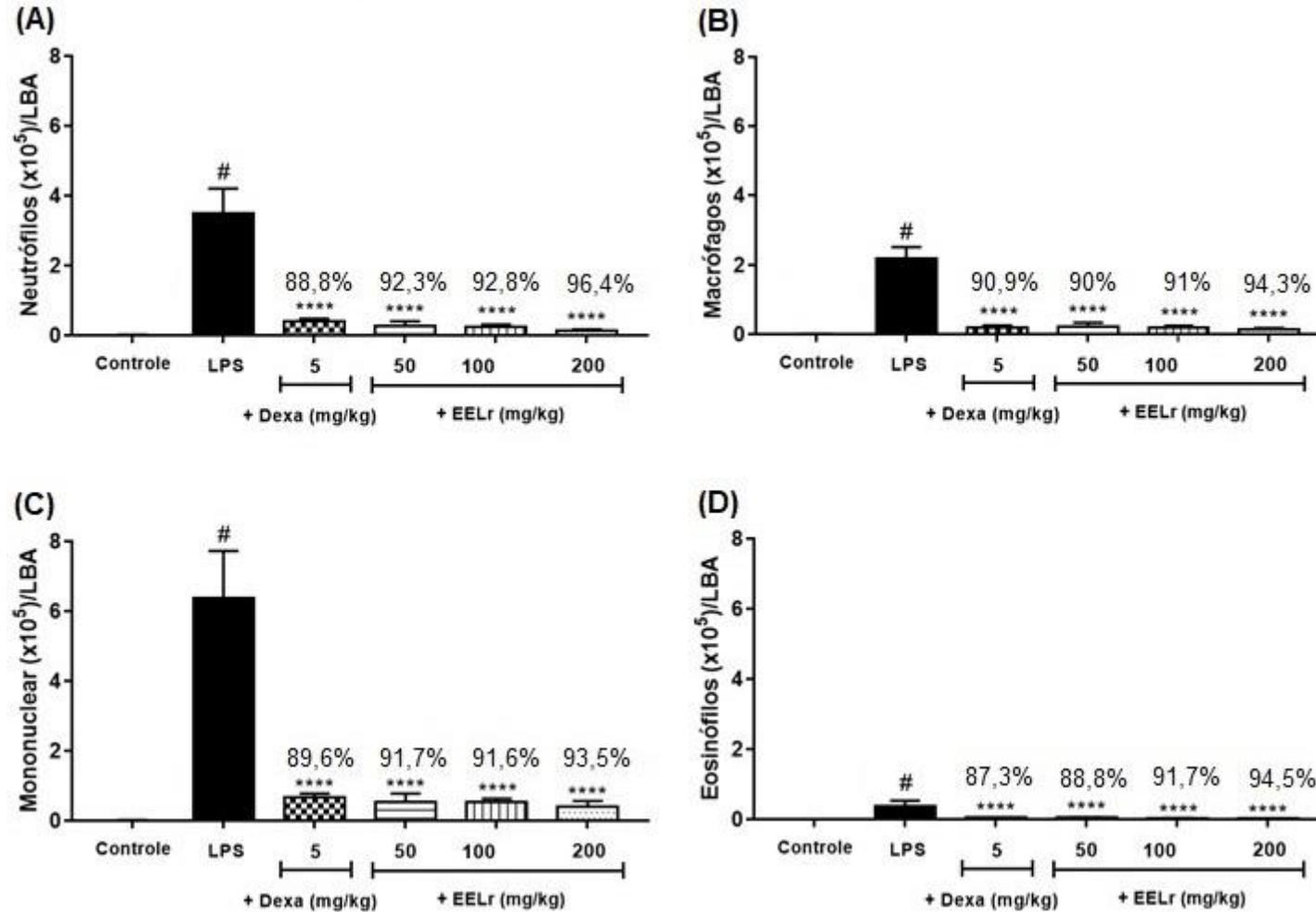
A exposição das vias aéreas ao LPS, como agente pró-inflamatório, provoca uma série de respostas respiratórias, que incluem a hiper-reatividade brônquica e o aumento do número de neutrófilos no espaço alveolar, característico da LPA, acompanhado da liberação mediadores celulares que participam do processo de rolagem e adesão dessas células ao endotélio pulmonar, como quimiocinas, citocinas, eicosanoides e PAF (MORTAZ et al., 2018; HE; YAO; XU, 2019).

Ao avaliar o LBA após a instilação intranasal de LPS em camundongos, foi possível notar o aumento significativo do número de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, proporcional ao tempo de exposição a essa endotoxina (KOJIMA et al., 2018). Nossos dados mostram que o EELr reduziu o quantitativo de leucócitos no LBA dos animais inflamados, indicando uma atenuação da migração e da ativação leucocitária, similar aos reportados por Yan et al. (2020), os quais mostraram que a redução na contagem total de leucócitos do exsudato pulmonar é acompanhada da diminuição da permeabilidade vascular.

Em relação à contagem diferencial de células presentes no LBA, houve uma significativa diminuição ($p < 0,0001$) no recrutamento de todos os tipos celulares analisados, que incluem neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e células mononucleares sanguíneas, para o pulmão dos animais tratados com EELr em todas as doses

testadas, quando comparados ao grupo LPS (Figura 17). Na dose de 200 mg/kg, os percentuais de inibição alcançaram efetividade de 96,4% (neutrófilos); 94,3% (macrófagos); 93,5% (células mononucleares/monócitos e linfócitos) e 94,5% (eosinófilos).

Figura 17 - Efeito do tratamento com EELr sobre o recrutamento de neutrófilos (A), macrófagos (B), células mononucleares sanguíneas (C) e eosinófilos (D) para o pulmão dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS.



Valores em média \pm desvio padrão (n=6). ANOVA seguido de pós-teste Tukey. ****p<0,0001, comparando ao grupo LPS (#). LBA: lavado broncoalveolar; +Dexa: dexametasona; +EELr: extrato etanólico de *L. racemosa*.

Embora a LPA seja caracterizada pelo aumento do número de neutrófilos no LBA, outras células de defesa exercem papéis relevantes na progressão da doença. Os eosinófilos, por exemplos, são conhecidos por atuarem mais efetivamente em infecções parasitárias e inflamações desencadeadas por reações alérgicas, mas também podem se apresentar em respostas imunes (CHUSID et al., 2018). Zhu et al. (2020) sugerem que ao apresentar quantidades elevadas em sobreviventes da SRAG, essas células podem desempenhar um efeito protetivo na LPA, ainda que os mecanismos pelos quais elas atuam nesse quadro clínico sejam incertos. Apesar disso, pacientes com LPA podem desenvolver pneumonia eosinofílica aguda com o aumento dessas células nos espaços alveolares após o início da infecção (HUGHES; BEASLEY, 2017). Os resultados do presente trabalho mostram um recrutamento discreto de eosinófilos nos grupos inflamados, em relação as demais células analisadas, acompanhado da atividade do EELr na diminuição do seu influxo, o que pode estar atrelado a um evento protetor.

Os linfócitos, por sua vez, são células mononucleares sanguíneas inicialmente produzidas no timo ou na medula óssea, que após seu amadurecimento nos órgãos linfoides periféricos (baço, linfonodos e amígdalas), são acionadas durante a resposta imunológica (ORAKPOGHENOR et al., 2019). Ao chegar no local da lesão, os linfócitos T liberam diversas quimiocinas e citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α), sendo estas responsáveis pela ativação linfocitária, com a consequente quimiotaxia de leucócitos e ativação dos macrófagos (TAGHILOO et al., 2021). Porém, o aumento dessas células associado à ativação de uma maior quantidade de macrófagos acontece apenas na fase tardia da doença (4-6 dias) em comparação à fase inicial (1-3 dias) onde há participação contundente de PMN. Nakajima et al. (2010) observaram, também, que camundongos com deficiência de linfócitos foram incapazes de aumentar o número neutrófilos. Essa característica foi avaliada por Dhaliwal et al. (2012) em relação aos monócitos, que são outro tipo de células mononucleares sanguíneas com migração mais efetiva na fase inicial da doença, assim como os PMN. O autor e seus colaboradores mostraram que a depleção de monócitos está associada à redução significativa no número de neutrófilos recrutados na LPA. Tendo em vista que a diminuição de células mononucleares seja benéfica a indivíduos com LPA, nossos dados são considerados promissores em função do tratamento com EELr ter diminuído o número dessas células nos animais inflamados.

Este estudo também demonstrou a diminuição da quantidade de macrófagos no LBA pelo tratamento com EELr, o que, segundo Kapur et al. (2019), não apenas impede o acúmulo pulmonar de PMN, mas também a LPA induzida por transfusão e o acúmulo de osteoporina no plasma, uma proteína intimamente envolvida em distúrbios inflamatórios pulmonares. Os macrófagos presentes nos pulmões podem ser resultados da diferenciação de monócitos ao migrarem para o lúmen alveolar (JOSHI; WALTER; MISHARIN, 2018). Esses tipos de macrófagos possuem o fenótipo M1, enquanto os macrófagos que residem naturalmente nos alvéolos pulmonares possuem fenótipo M2.

Em resposta à fase inicial da LPA, os macrófagos alveolares residentes mudam seu fenótipo para M1 e liberaram diversos mediadores pró-inflamatórios. Posteriormente, na fase tardia, esse fenótipo volta a ser M2 para eliminação de células apoptóticas e participação no processo fibrótico (MISHARIN et al., 2017; HUANG et al. 2018). Sendo assim, a depleção de macrófagos por EELr também pode indicar a consequente diminuição da fibrose pulmonar.

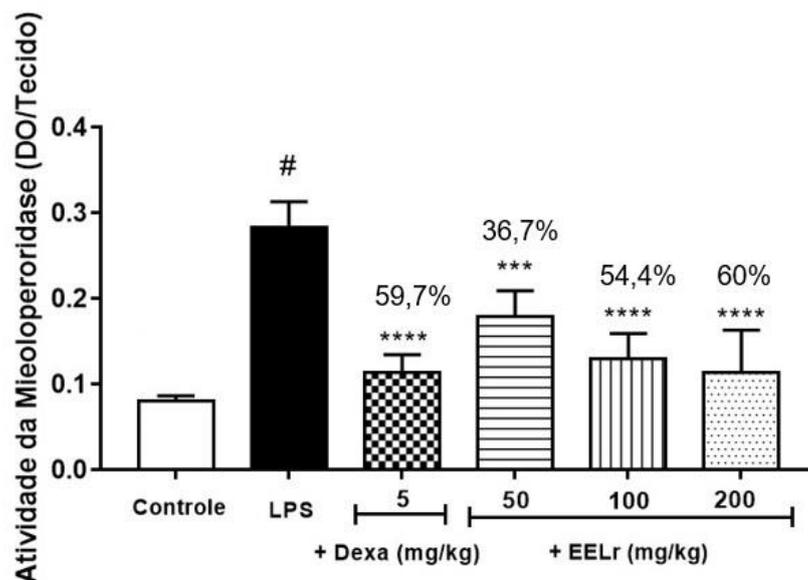
O aumento no número de células mononucleares constatado no presente estudo em relação aos outros trabalhos na literatura científica, provavelmente se deve à eutanásia dos animais ocorrer dias após a indução da inflamação, visto que grande parcela dos estudos a respeito da LPA em camundongos utilizam o pré-tratamento com determinada substância para posterior desafio com LPS e eutanásia horas depois. Isto pode acarretar índices baixos do número de algumas células, como linfócitos, monócitos e macrófago (COSTA et al., 2017).

Machado-Aranda et al. (2014) observaram que os neutrófilos têm o seu recrutamento intensificado a partir da 5ª hora após a lesão pulmonar e, por se tratarem se células-chave dessa doença, acabam por serem extremamente danosas quando presentes em grandes quantidades nos pulmões. A progressão da atuação desses tipos celulares inicia-se com sua migração na microcirculação pulmonar, passando pela sua adesão e ativação, para então haver uma resposta microbicida associada a liberação de EROs e enzimas proteolíticas (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020). Segundo Zhang et al. (2019), a depleção de neutrófilos pode diminuir acentuadamente a gravidade da LPA, o que fornece base para a atividade anti-inflamatória do EELr nesse quadro clínico atrelado à diminuição no recrutamento dessas células, após este alcançar percentuais de inibição entre 92,30% e 96,40% nas doses testadas, sendo necessária a análise de outros parâmetros para confirmar sua atividade.

4.9.2.1 Avaliação da atividade da mieloperoxidase

A atividade da MPO foi medida para refletir os efeitos do extrato etanólico de *L. racemosa* sobre a migração de neutrófilos para o pulmão dos animais com LPA. Como mostrado na Figura 18, em relação ao grupo LPS, o tratamento com EELr reduziu significativamente a atividade da enzima no tecido pulmonar nas doses de 50 mg/kg ($p < 0,001$), 100 e 200 mg/kg ($p < 0,0001$) e alcançou percentuais de inibição de 36,70%, 54,40% e 60,00%, respectivamente. A dexametasona também foi capaz de inibir a atividade da MPO ($p < 0,0001$) em 59,70%.

Figura 18 - Efeito do tratamento com EELr sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no tecido pulmonar dos animais com LPA.



Valores em média \pm desvio padrão (n=5). ANOVA seguido de pós-teste Tukey. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, comparando ao grupo LPS (#). DO: densidade óptica; +Dexa: dexametasona; +EELr: extrato etanólico de *L. racemosa*.

A MPO é uma enzima presente nos grânulos de secreção dos neutrófilos e é ativada por eles no desencadeamento de processos inflamatórios em tecidos. Ela possui papel ativo no estresse oxidativo ao catalisar a produção de EROs adicionais, como o ácido hipocloroso (HClO) e o radical hidroxila (OH). Dessa forma, os níveis de MPO nos tecidos têm elevação considerável quando em condições inflamatórias, estando geralmente associados a lesões oxidativas teciduais e morte bacteriana (DAVIES; HAWKINS, 2020; HAWKINS; DAVIES, 2021).

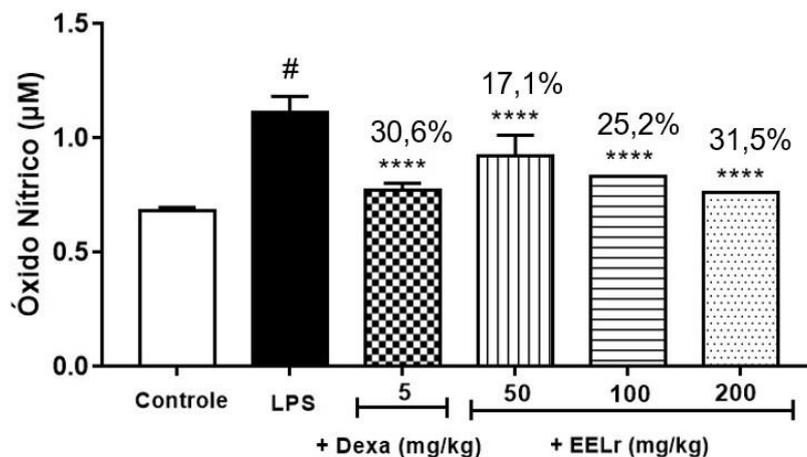
Estudos demonstram que o relevante aumento da MPO no tecido pulmonar em modelos de LPA induzida por LPS é diretamente proporcional a infiltração neutrofílica no tecido danificado (LI et al., 2019; CHAGNON et al., 2015). Para Haegens et al. (2009) isso indica que a MPO promove o desenvolvimento de neutrofilia pulmonar, além de influenciar a produção subsequente de quimiocinas e citocinas, o que pode ser utilizado como parâmetro para avaliar o nível da inflamação, assim como a quantidade de neutrófilos recrutada.

Neste estudo, foi verificado que o EELr reduziu significativamente a atividade da MPO no local da inflamação por meio da diminuição na migração de neutrófilos para o tecido pulmonar.

4.9.2.2 Determinação dos níveis de óxido nítrico

A liberação de NO no lavado broncoalveolar foi quantificada para analisar a atuação de neutrófilos e macrófagos, além do nível de estresse oxidativo ao qual os pulmões foram submetidos (Figura 19). O tratamento com o EELr reduziu ($p < 0,0001$) os níveis de NO em todas as doses testadas quando comparado ao grupo LPS, apresentando percentuais de inibição de 17,1% (50 mg/kg), 25,2% (100 mg/kg) e 31,5% (200 mg/kg).

Figura 19 - Efeito do tratamento com EELr sobre a liberação de óxido nítrico nos pulmões dos animais com LPA.



Valores em média \pm desvio padrão (n=6). ANOVA seguido de pós-teste Tukey. **** $p < 0,0001$, comparando ao grupo LPS (#). +Dexa: dexametasona; +EELr: extrato etanólico de *L. racemosa*.

Assim como a MPO, os níveis de NO em inflamações pulmonares podem servir de parâmetro para avaliar a atividade de células como neutrófilos e macrófagos por sua participação na produção de iNOS, um importante mediador pró-inflamatório (KOSUTOVA et al., 2018). Trabalhos sobre pleurisia em camundongos relataram que nesse tipo de inflamação há o aumento nos níveis de NO relacionado ao subsequente crescimento da migração leucocitária (IWATA et al., 2020; MAN et al., 2022).

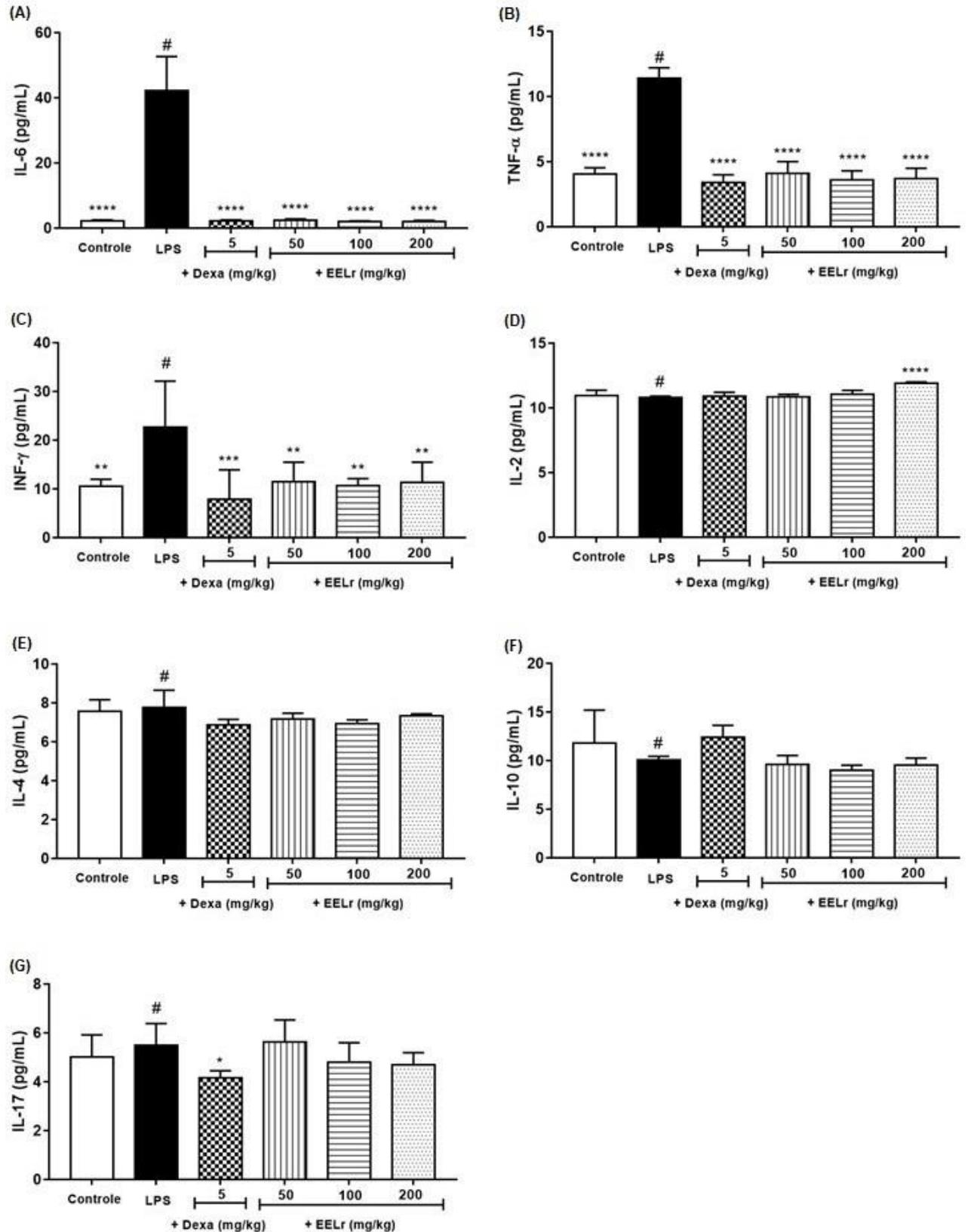
Na LPA, também é descrito o aumento da produção endógena de NO devido à maior expressão e atividade da iNOS, contribuindo para a fisiopatologia da doença (MEHTA, 2005). Para Zheng et al. (2019), durante a resposta inflamatória os macrófagos produzem grande quantidade de NO, via catálise de iNOS, levando a um estresse oxidativo avassalador e agravante da lesão tecidual. Tang et al. (2020) mostraram que pode haver a relação entre a produção de NO no modelo *in vivo* de LPA e *in vitro* por macrófagos.

Sendo assim, a diminuição dos níveis de NO promovido por EELr na LPA apresentados nesse trabalho pode se relacionar aos resultados do teste anti-inflamatório *in vitro* que demonstrou a redução na produção do NO por macrófagos alcançada pelo mesmo extrato, podendo ser um indicativo da sua ação na atenuação da atividade macrofágica. Isso pode ser reforçado pelo refreio da migração dessas células, juntamente com neutrófilos, observada na contagem diferencial e que pode levar à diminuição na produção de espécies reativas, com a consequente melhora na inflamação pulmonar. Essa depleção da atividade celular pode significar também a redução de mediadores pró-inflamatórios, em especial para participação macrofágica.

4.9.2.3 Determinação dos níveis de citocinas

Na análise da produção de mediadores envolvidos no processo inflamatório, foi observado que o grupo LPS apresentou aumento dos níveis de IL-6, TNF- α e INF- γ (Figura 20). Em comparação, houve significativa diminuição na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 ($p < 0,0001$), o TNF- α ($p < 0,0001$) e INF- γ ($p < 0,01$) nos pulmões dos animais tratados com EELr, enquanto houve um aumento na liberação de IL-2 ($p < 0,0001$) apenas para o grupo tratado com o extrato na dose de 200 mg/kg. As IL-4, IL-10 e IL-17 não diferiram no grupo LPS em relação ao controle.

Figura 20 - Efeito do tratamento com EELr sobre os níveis de IL-6 (A), TNF- α (B), INF- γ (C), IL-2 (D), IL-4 (E), IL-10 (F) e IL-17 dos animais com LPA.



Valores em média \pm desvio padrão (n=6). ANOVA seguido de pós-teste Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$, comparando ao grupo LPS (#). +Dexa: dexametasona; +EELr: extrato etanólico de *L. racemosa*.

Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que a indução da inflamação pulmonar em camundongos por LPS aumentou o número de células inflamatórias no LBA, com a presença de grande número de macrófagos, células mononucleares sanguíneas e neutrófilos, estando esse fenômeno possivelmente associado ao aumento nos níveis teciduais de citocinas pró-inflamatórias características da LPA.

Pesquisas relacionadas à Covid-19 e à SRAG mostram que essas citocinas são fundamentais para a progressão do quadro inflamatório (HAN et al., 2020; HU; HUANG; YIN, 2021). A IL-6, por exemplo, é descrita como intimamente relacionada a insuficiência respiratória, correlaciona com a gravidade da doença por apresentar altos níveis em pacientes que evoluíram para estágios mais graves da Covid-19, fazendo com que seja apontada como um potencial marcador prognóstico da doença, mais até do que outros marcadores conhecidos de inflamações (SANTA CRUZ et al., 2021). Além disso, essa citocina possui uma potente ação quimioatraente para neutrófilos e macrófagos, o que potencializa a lesão tecidual por desregulação da matriz extracelular (GUBERNATOROVA et al., 2020). Todas as doses do EELr foram capazes de reduzir a sinalização de IL-6, o que pode justificar a diminuição do influxo de neutrófilos e macrófagos para o espaço broncoalveolar.

Apesar disso, os macrófagos estão mais intimamente ligados à produção do TNF- α , principalmente os que apresentam fenótipo M1, liberando também IL-1, NO e EROs ao induzir uma resposta inflamatória grave (LASKIN; MALAVIYA; LASKIN, 2019; CHEN et al., 2020). O aumento do IFN- γ também pode levar à polarização de macrófagos M1, ativando o fator nuclear- κ B responsável por regular a expressão de um grande número de genes inflamatórios, incluindo os relacionados a TNF- α e IL-6 (KIM et al., 2017).

Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a inibição leucocitária foi relacionada à inibição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , que são reconhecidas por estimular a migração celular e a expressão de moléculas de adesão (MARUTHAMUTHU et al., 2020; HONG et al., 2021). Por sua vez, Santos et al. (2021) demonstraram que o extrato aquoso de *L. racemosa* foi capaz de reduzir as concentrações de IL-6, TNF α e IFN- γ produzidas por esplenócitos.

Nossos resultados corroboram com esses estudos e comprovam que a inibição dessas citocinas age reduzindo o número de leucócitos no tecido pulmonar e a modulação desta resposta foi associada à diminuição da atividade da enzima MPO e de mediadores pró-inflamatórios como NO.

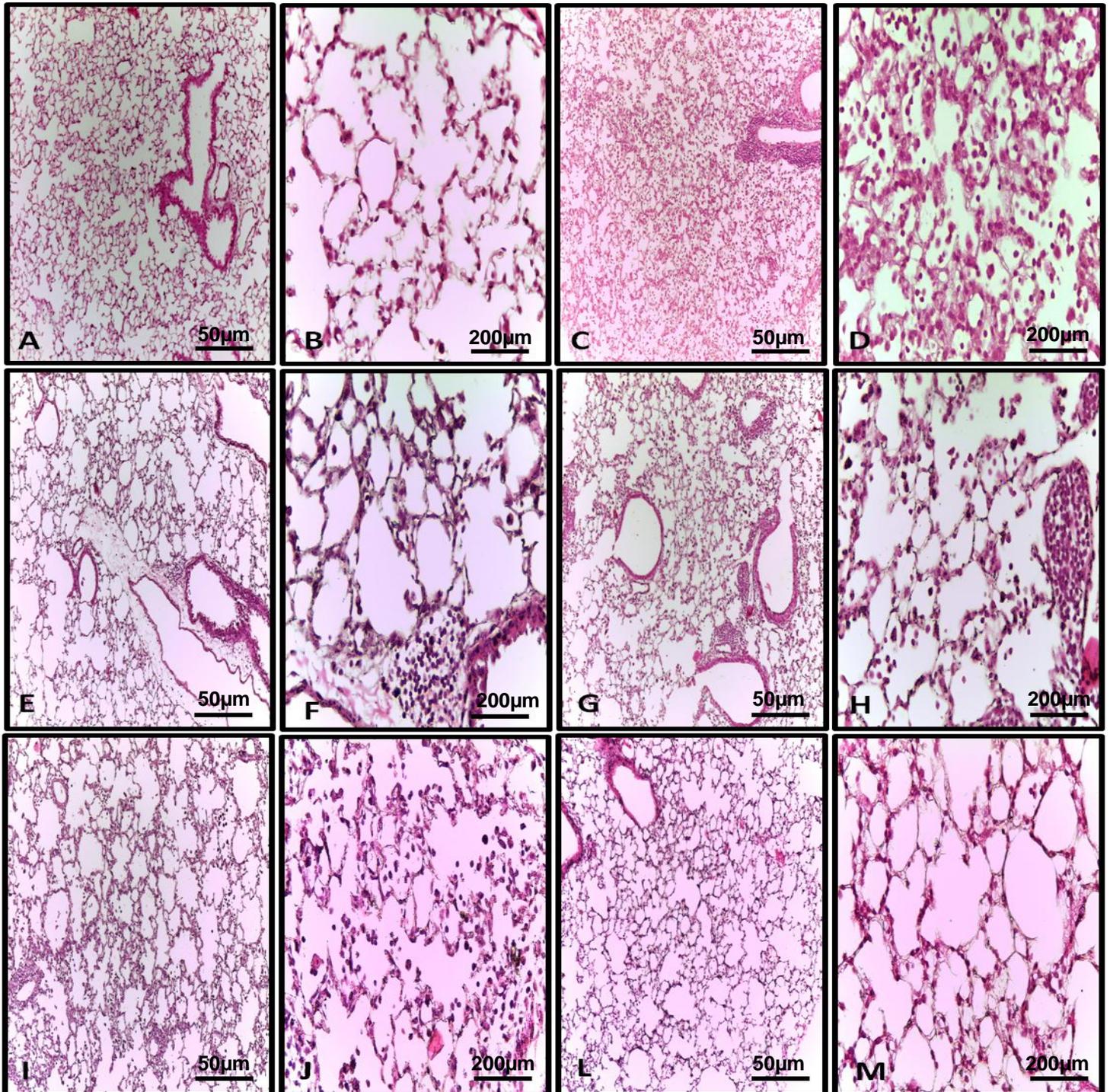
Já o aumento dos níveis da IL-2, como visto no grupo +EELr 200, pode estar relacionada à manutenção da integridade pulmonar, como avaliaram He et al. (2019) ao relatar que a administração profilática dessa citocina em camundongos preveniu o aparecimento de edema, níveis aumentados de proteínas pulmonares e fatores pró-inflamatórios que inibiram a agregação de neutrófilos polimorfonucleares nos pulmões no modelo de LPA relacionada à transfusão.

4.9.2.4 Análise histopatológica dos pulmões

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos nas demais análises do experimento de LPA com a integridade estrutural do órgão, foi realizada a avaliação histopatológica dos pulmões através das colorações HE (Figura 21), para observação morfológica, e tricrômico de Masson (Figura 22), para a avaliação da fibrose por meio da produção de colágeno.

As lâminas coradas em HE mostraram que os animais do grupo controle apresentaram arquitetura pulmonar sem alterações histopatológicas, com alvéolos íntegros, brônquios e bronquíolos terminais com epitélio de revestimento conservados, tecido conjuntivo mucoso conservado, vasos sanguíneos com endotélio preservado e preservação do tecido epitelial de revestimento (Figuras 21 A e B). No grupo LPS, verificaram-se alterações caracterizadas pela diminuição da luz dos alvéolos, espessamento da parede alveolar e um grande número de infiltrados de células inflamatórias observados na parede e cavidade alveolar (Figuras 21 C e D). O grupo tratado com dexametasona apresentou melhora do espessamento, edema alveolar e do infiltrado inflamatório (Figuras 21 E e F). Nos animais que receberam o tratamento com EELr, observou-se uma aproximação na aparência da arquitetura pulmonar ao grupo controle, sendo esta ainda mais evidente em medida proporcional ao aumento da dose (Figuras 21 G – M).

Figura 21 – Efeitos do tratamento com o EELr sobre as mudanças histopatológicas do tecido pulmonar dos animais com LPA.



Fotomicrografia das lâminas histológicas dos pulmões dos animais experimentais coradas com hematoxilina e eosina. Grupo controle (A-B): basal tratado com solução salina estéril (NaCl 0,9%), grupo LPS (C-D): inflamação induzida por LPS e tratado com salina, Grupo +Dexa (E-F): inflamação induzida por LPS e tratado com 5 mg/kg de dexametasona, grupo +EELr50 (G-H): inflamação induzida por LPS e tratado com 50 mg/kg de EELr, grupo +EELr100 (I-J): inflamação induzida por LPS e tratado com 100 mg/kg de EELr e grupo +EELr200 (L-M): inflamação induzida por LPS e tratado com 200 mg/kg de EELr. Coloração H.E. Barras 200µm (A, C, E, G, I, L) e 50µm (B, D, F, H, J, M).

Análises histopatológicas detalhadas de pulmões com LPA e SRAG revelam dano alveolar difuso em ambos os casos, causado pela lesão das células endoteliais de revestimento e alveolares, levando à exsudação de líquido rico em células, o que acaba por culminar na ruptura física da barreira alvéolo-capilar (MONTERO-FERNANDEZ; PARDO-GARCIA, 2021).

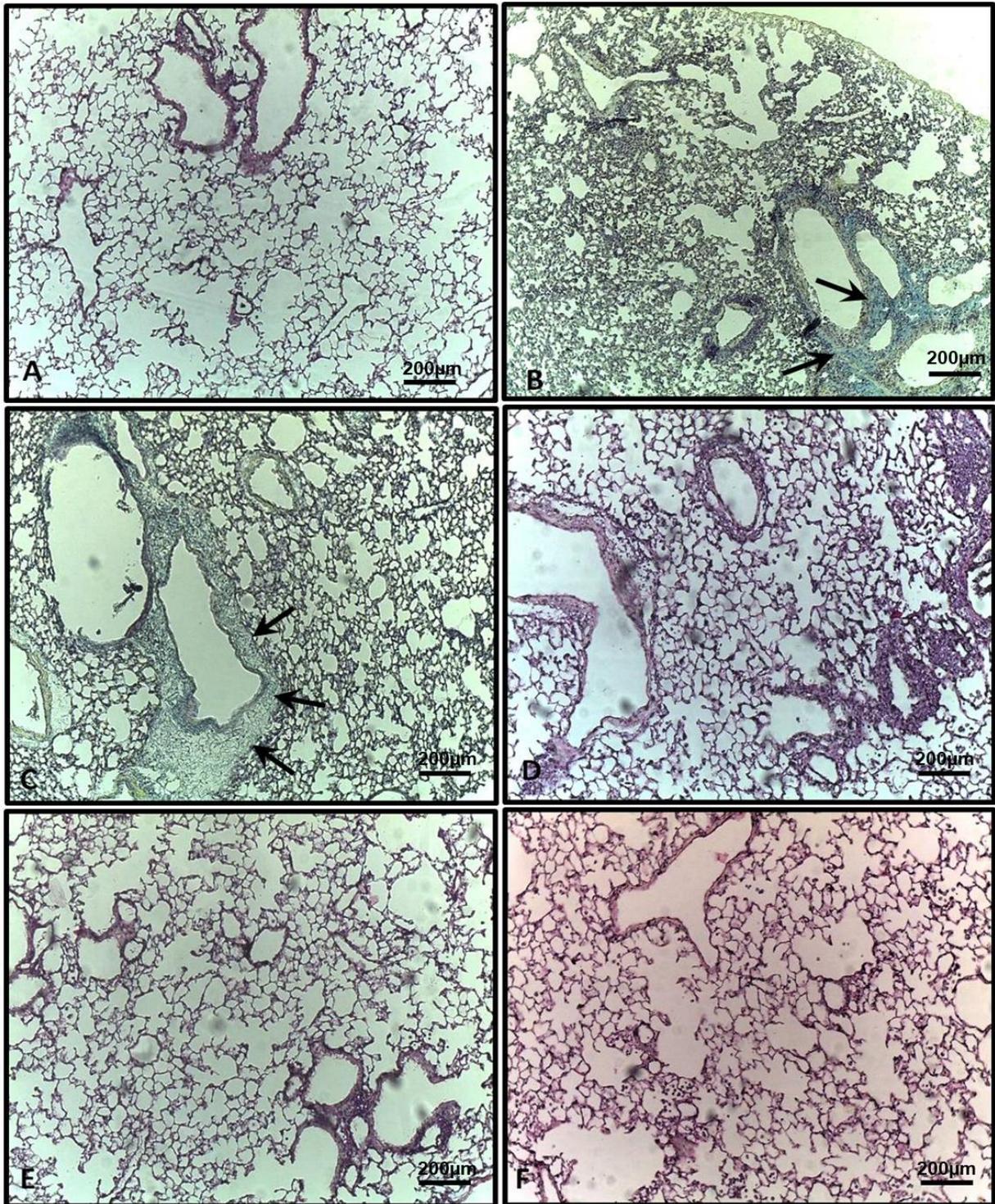
Durante essas doenças associadas, a fase exsudativa releva a presença de edema interalveolar e alargamento intersticial. As membranas hialinas podem ser vistas neste ponto, assim como trombos em resultado à alteração local da via de coagulação. Já na segunda fase, há proliferação celular fibroblástica visível que apresenta aspecto frouxo no corte HE. As membranas hialinas desaparecem se integrando aos septos alveolares e restos residuais de fibrina podem ser identificados. Na última fase, a fibrótica, há o aparecimento da fibrose intersticial juntamente com o remodelamento intersticial (MONTERO-FERNANDEZ; PARDO-GARCIA, 2021; HARIRI et al., 2021).

A inflamação pulmonar compreende uma predominância de macrófagos intersticiais juntamente com plasmócitos dispersos e inflamação linfocítica de células T de leve a moderada (LUO et al., 2020; MARTIN et al., 2020). Ademais, pacientes com Covid-19 apresentam lesão endotelial grave e microtrombos capilares alveolares (BÖSMÜLLER et al., 2020; KOMMOS et al., 2020).

Os dados histológicos obtidos no nosso estudo confirmam os achados relacionados à contagem celular no LBA, demonstrando que os grupos tratados (dexametasona 5 mg/kg, EELr 50, 100 e 200 mg/kg) apresentaram significativa diminuição do infiltrado celular quando comparados com o controle LPS, além da manutenção da preservação estrutural do órgão. Assim, os achados macro e microscópicos corroboram com as análises dos demais parâmetros da LPA, e a partir disto, é possível inferir que EELr apresenta atividade anti-inflamatória promissora.

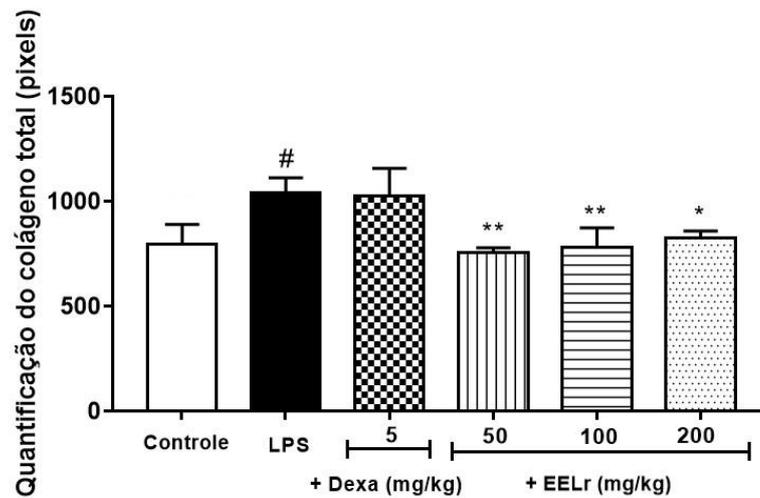
Em relação aos pulmões corados pelo tricrômico de Masson, foi revelada uma acentuada marcação na parede dos bronquíolos dos animais dos grupos LPS e Dexa, caracterizada pela presença de colágeno (Figura 23) e indicativa de processo fibrótico avançado do tecido pulmonar. Os grupos tratados com o extrato de *L. racemosa*, bem como o grupo controle, apresentaram uma marcação tênue em relação aos demais grupos, confirmada pela quantificação de colágeno por meio da análise de luminescência (Figura 22).

Figura 22 – Efeitos do tratamento com o EELr sobre a histoquímica do colágeno no tecido pulmonar dos animais com LPA.



Fotomicrografia das lâminas histológicas dos pulmões dos animais experimentais coradas com tricrômico de Masson. Grupo controle (A): basal tratado com solução salina estéril (NaCl 0,9%), grupo LPS (B): inflamação induzida por LPS e tratado com salina, Grupo +Dexa (C): inflamação induzida por LPS e tratado com 5 mg/kg de dexametasona, grupo +EELr50 (D): inflamação induzida por LPS e tratado com 50 mg/kg de EELr, grupo +EELr100 (E): inflamação induzida por LPS e tratado com 100 mg/kg de EELr e grupo +EELr200 (F): inflamação induzida por LPS e tratado com 200 mg/kg de EELr. Notar acentuada marcação de colágeno na parede dos bronquíolos (seta). Coloração H.E. Barras 200µm (A, C, E, G, I, L) e 50µm (B, D, F, H, J, M).

Figura 23 – Efeitos do tratamento com o EELr sobre a quantidade de colágeno total no tecido pulmonar dos animais com LPA.



Valores em média \pm desvio padrão. ANOVA seguido de pós-teste Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, comparando ao grupo LPS (#). +Dexa: dexametasona; +EELr: extrato etanólico de *L. racemosa*.

A fibrose pulmonar, uma complicação tardia da LPA/SRAG, é caracterizada pela proliferação de fibroblastos e deposição excessiva de matriz extracelular (MEC), sendo a deposição de colágeno um potente marcador histológico do processo de remodelamento pulmonar (OJO et al., 2020). Após a destruição da integridade da membrana basal, os macrófagos M1 e M2 são recrutados para o local da lesão do tecido pulmonar para regular a formação de fibrose. Os macrófagos M2 quando em polarização excessiva contribuem para uma resposta fibroproliferativa patológica e fibrose pulmonar na fase fibrótica da SRAG, ativando assim a quimiotaxia de fibroblastos, que são as células efetivamente secretoras de MEC rica em fibras colágenas no tecido conjuntivo (CHEN et al., 2020).

Os macrófagos M2 também expressam citocinas anti-inflamatórias, como IL-13 e IL-14, que prejudicam a remodelação da MEC excessiva promovendo a presença de macrófagos M2 e, finalmente, fibrogênese excessiva (DE PAULA et al., 2020). A magnitude da deposição de MEC e a gravidade da fibrose do tecido pulmonar podem ser parcialmente dependentes do equilíbrio no microambiente local da lesão do tecido pulmonar de macrófagos M2 versus M1, responsáveis por atenuar a resposta fibrótica da doença (CHEN et al., 2020). Estes dados histológicos para fibrose pulmonar corroboram a contagem diminuída de macrófagos no LBA dos grupos tratados, ao observarmos que a quantidade de fibras colágenas desses grupos não afetou a preservação das vias aéreas e função pulmonar, indicando atenuação na interferência da atividade macrofágica em relação à produção de MEC.

Os resultados obtidos para tratamento com EELr demonstram que ele foi responsável por apresentar uma atividade anti-inflamatória promissora demonstrada pela inibição do influxo de leucócitos, e a modulação desta resposta foi associada à diminuição da atividade da enzima MPO e de mediadores pró-inflamatórios como IL-6, TNF- α e IFN- γ , além do NO produzido por macrófagos intraperitoneais que pode estar associado ao potencial antioxidante do extrato e ao seu conteúdo de compostos fenólicos.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- ✓ Os extratos das folhas de *L. racemosa* contêm flavonoides, derivados cinâmicos, triterpenos, esteroides, mono e sesquiterpenos em sua constituição;
- ✓ Flavonas e flavonoides semelhantes a rutina foram identificados em EELr, enquanto EHLr e EALr apresentaram compostos com atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana comprovadas;
- ✓ EELr e EHLr revelaram elevados teores de fenóis totais e proantocianidinas;
- ✓ EELr apresentou relevante atividade antioxidante *in vitro* nos testes de DPPH e ABTS;
- ✓ Foi constatada baixa citotoxicidade dos extratos frente a PBMC e eritrócitos;
- ✓ Os extratos apresentaram potencial anti-inflamatório *in vitro* ao reduzir níveis de NO produzidos por macrófagos intraperitoneais;
- ✓ A DL₅₀ do EELr foi estimada superior a 2.000 mg/kg, tendo apresentado baixa toxicidade *in vivo* nas condições e parâmetros avaliados;
- ✓ EELr apresentou importante atividade anti-inflamatória sobre a LPA e SRAG induzidas por LPS em camundongos, diminuindo o número de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células mononucleares sanguíneas presentes no LBA dos animais.
- ✓ EELr reduziu a atividade da MPO e os níveis de NO, IL-6, TNF- α e INF- γ nos pulmões, bem como atuou na manutenção da integridade pulmonar e diminuição da fibrose.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOTAAL, F. F. et al. Plant Seedling Growth Stimulation and Antifungal Activities of Volatile Organic Compounds Emitted by *Aspergillus flavus* Endophyte. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 9, n. 4, p. 831-840, 2022.
- ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary world**, v. 11, n. 5, p. 627, 2018.
- AHMAD, M. H. et al. Mechanisms of antidiarrhoeal activity of methanol leaf extract of *combretum hypopilinum* diels (Combretaceae): involvement of opioidergic and (α 1 and β) adrenergic pathways. **Journal of ethnopharmacology**, v. 269, p. 113750, 2021.
- AHOOKHOSH, K. et al. Development of human respiratory airway models: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 145, p. 105233, 2020.
- ALKADI, H. A review on free radicals and antioxidants. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 20, n. 1, p. 16-26, 2020.
- AL-MUSSAWII, M. A. Y. et al. Antibacterial activity of alkaloid compound Methoxy phenyl-Oxime (C₈H₉N₀₂) isolated and purified from leaf of *Conocarpus lancifolius* Engl. **Teikyo Medical Journal**, v. 4, n. 1, p. 4971-4981, 2022.
- ALONGI, D. M. Impact of global change on nutrient dynamics in mangrove forests. **Forests**, v. 9, n. 10, p. 596, 2018.
- ALTEMIMI, A. et al. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 42, 2017.
- AMALI, M. O. et al. Assessment of anxiolytic potential and acute toxicity study of *Combretum micranthum* G. Don. leaves (Combretaceae). **Journal of Medicinal Plants for Economic Development**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2020.
- ANSARI, M. Y.; AHMAD, N.; HAQQI, T. M. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 129, p. 110452, 2020.
- ARAÚJO, P. R. M. et al. Assessing the spatial distribution and ecologic and human health risks in mangrove soils polluted by Hg in northeastern Brazil. **Chemosphere**, v. 266, p. 129019, 2021.
- ARIFIN, H. A. et al. Varietal differences in flavonoid and antioxidant activity in Japanese soybean accessions. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 85, n. 4, p. 916-922, 2021.
- ARRAL, M. L.; HALPERN, Jeffrey Mark. Electrochemical Detection of NG-Hydroxy-l-arginine. **ECS transactions**, v. 85, n. 13, p. 1163, 2018.

ASGARI, M. et al. Development of a realistic human respiratory tract cast representing physiological thermal conditions. **Aerosol Science and Technology**, v. 53, n. 8, p. 860-870, 2019.

ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. *The Lancet*, v. 290, n. 7511, p. 319-323, 1967.

ATTA, E.M.; MOHAMED, N. H.; SILAEV, Ahmed AM Abdelgawad. Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. **European Chemical Bulletin**, v. 6, n. 8, p. 365-375, 2017.

ATWOOD, T. B. et al. Global patterns in mangrove soil carbon stocks and losses. **Nature Climate Change**, v. 7, n. 7, p. 523-528, 2017.

BANDARANAYAKE, W. M. Bioactivities compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*, v.10: p. 421-52, 2002.

BANDARANAYAKE, W. M. Bioactivities compounds and chemical constituents of mangrove plants. **Wetlands Ecology and Management**, v.10: p. 421-52, 2002.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Bioactive components from leaf vegetable products. In: **Studies in natural products chemistry**. Elsevier, 2014. p. 321-346.

BARBOZA, F. S. et al. Healing and topical anti-inflammatory activities of the total aqueous bark extract of *Combretum glutinosum* Perr (Combretaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 14, n. 5, p. 215-224, 2020.

BEASLEY, M. B. Acute lung injury—from cannabis to COVID. **Modern pathology**, p. 1-7, 2021.

BEDROOD, Z.; RAMESHRAD, M.; HOSSEINZADEH, H. Toxicological effects of *Camellia sinensis* (green tea): A review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 7, p. 1163-1180, 2018.

BELOVICOVA, K. et al. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. **Interdisciplinary toxicology**, v. 10, n. 1, p. 40, 2017.

BENZIE, I. FF et al. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations and applications. **Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications Wiley, New York**, v. 11, p. 77-106, 2018.

BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural product research**, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018.

BISHOP-FREEMAN, S. C. et al. Death from poppy tea consumption. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 734-740, 2020.

BÖSMÜLLER, H. et al. The evolution of pulmonary pathology in fatal COVID-19 disease: an autopsy study with clinical correlation. **Virchows Archiv**, v. 477, p. 349-357, 2020.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.
BUARQUE, C. D. et al. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6885-6891, 2011.

BUS, J. S. "The dose makes the poison": key implications for mode of action (mechanistic) research in a 21st century toxicology paradigm. **Current Opinion in Toxicology**, v. 3, p. 87-91, 2017.

CARDONE, L. et al. The influence of soil physical and chemical properties on saffron (*Crocus sativus L.*) growth, yield and quality. **Agronomy**, v. 10, n. 8, p. 1154, 2020.
CARSETTI, A. et al. Prolonged prone position ventilation for SARS-CoV-2 patients is feasible and effective. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 1-3, 2020.

CHAGNON, F. et al. Smart imaging of acute lung injury: exploration of myeloperoxidase activity using in vivo endoscopic confocal fluorescence microscopy. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 309, n. 6, p. L543-L551, 2015.

CHAI, W. et al. Antityrosinase and antioxidant properties of mung bean seed proanthocyanidins: Novel insights into the inhibitory mechanism. **Food chemistry**, v. 260, p. 27-36, 2018.

CHANDEL, N. S. Signaling and metabolism. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 13, n. 2, p. a040600, 2021.

CHEDI, B. AZ; MANDAWARI, F. K. In vitro evaluation of antiasthmatic activity of ethanol leaf extract of *Guiera senegalensis* j. F. GMEL (Combretaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 12, n. 9, p. 112-120, 2018.

CHELOMBITKO, M. A. Role of reactive oxygen species in inflammation: a minireview. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 73, n. 4, p. 199-202, 2018.

CHEN, C. et al. Antiplatelet therapy for acute respiratory distress syndrome. **Biomedicines**, v. 8, n. 7, p. 230, 2020.

CHEN, Lih-Geeng et al. Ellagitannins from *Terminalia calamansanai* induced apoptosis in HL-60 cells. **Toxicology in vitro**, v. 23, n. 4, p. 603-609, 2009.

CHEN, S. C. et al. Liver fat, hepatic enzymes, alkaline phosphatase and the risk of incident type 2 diabetes: a prospective study of 132,377 adults. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

CHEN, X. et al. Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Inflammation Research**, v. 69, p. 883-895, 2020.

CHOWDHURY, R. R. et al. Anthropogenic drivers of mangrove loss: Geographic patterns and implications for livelihoods. In: **Mangrove ecosystems: A global biogeographic perspective**. Springer, Cham, 2017. p. 275-300.

CHRISTIANI, D. C. Vaping-induced acute lung injury. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 10, p. 960-962, 2020.

CHUO, S. C. et al. A Glimpse into the extraction methods of active compounds from plants. **Critical reviews in analytical chemistry**, p. 1-30, 2020.

COLLIER, R. J.; RENQUIST, B. J.; XIAO, Y. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10367-10380, 2017.

COSTA, F. N. et al. *Laguncularia racemosa* Phenolics Profiling by Three-Phase Solvent System Step-Gradient Using High-Performance Countercurrent Chromatography with Off-Line Electrospray Mass-Spectrometry Detection. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2284, 2021.

COSTA, F. N. et al. *Laguncularia racemosa* phenolics profiling by three-phase solvent system step-gradient using high-performance countercurrent chromatography with off-line electrospray mass-spectrometry detection. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2284, 2021.

COSTA, I. P. M.; MAIA, L. C.; CAVALCANTI, M. A. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1165-1173, 2012.

COSTA, N. S. X. et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0185474, 2017.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p.1231–1234. 2002.

CRUZ, S. M.; MARROQUÍN, M. N.; CÁCERES, A. Biological activity and chemical composition of organic extracts from three Guatemalan mangrove trees. **diabetes**, v. 13, p. 14, 2019.

DA SOUZA, I. et al. Adaptive plasticity of *Laguncularia racemosa* in response to different environmental conditions: integrating chemical and biological data by chemometrics. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 335-348, 2014.

DALCIN, E.; JACKSON, P. W. A Network-wide visualization of the implementation of the Global Strategy for Plant Conservation in Brazil. **Rodriguésia**, v. 69, p. 1613-1639, 2018.

DANTAS-MEDEIROS, R. et al. Mass spectrometry characterization of *Commiphora leptophloeos* leaf extract and preclinical evaluation of toxicity and anti-inflammatory potential effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113229, 2021.

DE ANDRADE, M. AU; FONSECA, W. C. Brazil's areas of not-so-permanent preservation. **Science**, v. 370, n. 6522, p. 1283-1284, 2020.

DE PAULA, C. B. V. et al. IL-4/IL-13 remodeling pathway of COVID-19 lung injury. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 18689, 2020.

DHALIWAL, K. et al. Monocytes control second-phase neutrophil emigration in established lipopolysaccharide-induced murine lung injury. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 186, n. 6, p. 514-524, 2012.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020.

DING, Q. et al. Role of IL-17 in LPS-induced acute lung injury: an in vivo study. **Oncotarget**, v. 8, n. 55, p. 93704, 2017.

DOS SANTOS, N. M.; LANA, P. Present and past uses of mangrove wood in the subtropical Bay of Paranaguá (Paraná, Brazil). **Ocean & coastal management**, v. 148, p. 97-103, 2017.

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

ELLISON, J. C. Factors Influencing Mangrove Ecosystems. In: **Mangroves: Ecology, Biodiversity and Management**. Springer, Singapore, 2021. p. 97-115.

ELVIRE, K. F. E. et al. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Terminalia superba* Engl. and Diels (Combretaceae) bark extracts. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 7, p. 2836-2846, 2018.

ENGKU ARIFF, E. A. R.; SEMAN KAMARULZAMAN, A. F.; SURATMAN, M. N. Energy Flux in Mangrove Ecosystems. **Mangroves: Ecology, Biodiversity and Management**, p. 117-126, 2021.

ENOMOTO, H. et al. Distribution of flavan-3-ol species in ripe strawberry fruit revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 103, 2020.

FAGHIH, M. M.; SHARP, M. Keith. Modeling and prediction of flow-induced hemolysis: a review. **Biomechanics and modeling in mechanobiology**, v. 18, n. 4, p. 845-881, 2019.

FAN, Z. et al. Discovery of Se-containing flavone in Se-enriched green tea and the potential application value in the immune regulation. **Food Chemistry**, v. 394, p. 133468, 2022.

FAN, Z. et al. Discovery of Se-containing flavone in Se-enriched green tea and the potential application value in the immune regulation. **Food Chemistry**, v. 394, p. 133468, 2022.

FERREIRA, A. C.; LACERDA, L. D. Degradation and conservation of Brazilian mangroves, status and perspectives. **Ocean & Coastal Management**, v. 125, p. 38-46, 2016.

FERREIRA, C. A. et al. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species with nanomaterials. **Nano research**, p. 1-30, 2018.

FIDAN, K. et al. Extra-renal manifestations of atypical hemolytic uremic syndrome in children. **Pediatric Nephrology**, v. 33, n. 8, p. 1395-1403, 2018.

FIELDING-SINGH, V.; MATTHAY, M. A.; CALFEE, Carolyn S. Beyond low tidal volume ventilation: treatment adjuncts for severe respiratory failure in acute respiratory distress syndrome. **Critical care medicine**, v. 46, n. 11, p. 1820, 2018.

FISHER, J. B.; HONDA, H.. Computer simulation of branching pattern and geometry in *Terminalia* (Combretaceae), a tropical tree. **Botanical Gazette**, v. 138, n. 4, p. 377-384, 1977.

FORSYTHE, P. Mast cells in neuroimmune interactions. **Trends in neurosciences**, v. 42, n. 1, p. 43-55, 2019.

GANESAN, T. et al. Structural characterization of n-hexadecanoic acid from the leaves of *Ipomoea eriocarpa* and its antioxidant and antibacterial activities. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-12, 2022.

GARCÍA, C. B. E. et al. Epidemiological characterization of severe acute respiratory infections. Granma, March-May 2020. **Multimed**, v. 24, n. 6, p. 1242-1257, 2020.

GARCIA, J. S. et al. Different salt concentrations induce alterations both in photosynthetic parameters and salt gland activity in leaves of the mangrove *Avicennia schaueriana*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 141, p. 70-74, 2017.

GAUDET, A. et al. Endocan regulates acute lung inflammation through control of leukocyte diapedesis. **Journal of Applied Physiology**, v. 127, n. 3, p. 668-678, 2019.

GERE, J. et al. African continent a likely origin of family Combretaceae (Myrtales). A biogeographical view. **Annual Research & Review in Biology**, p. 1-20, 2015.

GHAZAVI, Ali et al. Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. **Cytokine**, v. 137, p. 155323, 2021.

GIUSTARINI, D. et al. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. **Methods in enzymology**, v. 440, p. 361-380, 2008.

GLASENAPP, Y. et al. Anti-Adhesion Activity of Tannins Isolated from the Mangrove *Laguncularia racemosa*. **Chemistry & biodiversity**, v. 16, n. 5, p. e1800632, 2019.

GRZYWALSKI, T. et al. Practical implementation of artificial intelligence algorithms in pulmonary auscultation examination. **European journal of pediatrics**, v. 178, n. 6, p. 883-890, 2019.

GUBERNATOROVA, E. O. et al. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 53, p. 13-24, 2020.

GULCIN, I. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **Archives of toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

HAEGENS, A. et al. Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 12, p. 7990-7996, 2009.

HAN, H. et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 1123-1130, 2020.

HARIRI, L. P. et al. Lung histopathology in coronavirus disease 2019 as compared with severe acute respiratory syndrome and H1N1 influenza: a systematic review. **Chest**, v. 159, n. 1, p. 73-84, 2021.

HAYES, M. A. et al. Foliar water uptake by coastal wetland plants: A novel water acquisition mechanism in arid and humid subtropical mangroves. **Journal of Ecology**, v. 108, n. 6, p. 2625-2637, 2020.

HE, Y. et al. Comparison of methane emissions among invasive and native mangrove species in Dongzhaigang, Hainan Island. **Science of the Total Environment**, v. 697, p. 133945, 2019.

HERRERO, R.; SANCHEZ, G.; LORENTE, J. A. New insights into the mechanisms of pulmonary edema in acute lung injury. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 2, 2018.

HESPANHOL, L. A. B. et al. Infection related to health care in an adult intensive care unit. **Enfermería Global**, v. 18, n. 1, p. 242-254, 2019.

HONG, X. et al. Anti-inflammatory evaluation of *Scurrula ferruginea* (jack) danser parasitizing on *Tecoma stans* (L.) HBK in LPS/IFN- γ -induced RAW 264.7 macrophages. **Journal of ethnopharmacology**, v. 268, p. 113647, 2021

HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 1, p. 250-256, 2021.

HUANG, X. et al. The role of macrophages in the pathogenesis of ALI/ARDS. **Mediators of inflammation**, v. 2018, 2018.

HUAUX, F. et al. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 4, p. 2083-2092, 2003.

HUBER-LANG, M.; LAMBRIS, J. D.; WARD, P. A. Innate immune responses to trauma. **Nature immunology**, v. 19, n. 4, p. 327-341, 2018.

HUDSON, A. et al. A review of the toxicity of compounds found in herbal dietary supplements. **Planta medica**, v. 84, n. 09/10, p. 613-626, 2018.

HUGHES, K T.; BEASLEY, M. B. Pulmonary manifestations of acute lung injury: more than just diffuse alveolar damage. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 141, n. 7, p. 916-922, 2017.

HUGHES, K. T.; BEASLEY, M. B. Pulmonary manifestations of acute lung injury: more than just diffuse alveolar damage. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 141, n. 7, p. 916-922, 2017.

ICMBio. Atlas dos Manguezais do Brasil. 1st ed. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade; 2018. 176 p.

IDRUS, A. A.; SYUKUR, A.; ZULKIFLI, L. The diversity of fauna in mangrove community: Success replanting of mangroves species in South Coastal East Lombok, Indonesia. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2019. p. 033042.

IFEANYI, O. E. A review on free radicals and antioxidants. **Int. J. Curr. Res. Med. Sci**, v. 4, n. 2, p. 123-133, 2018.

IGNÁCIO, S. R. N. et al. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais murinos in vitro e in vivo tratados com extratos de *Phyllanthus tenellus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, pág. 181-187, 2001.

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, v. 52, 2019.

ISLAM, M. T. et al. Phytol anti-inflammatory activity: Pre-clinical assessment and possible mechanism of action elucidation. **Cellular and Molecular Biology**, v. 66, n. 4, p. 264-269, 2020.

ISLAM, Mohammad S. et al. A review of respiratory anatomical development, air flow characterization and particle deposition. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 2, p. 380, 2020.

JAIN, C.; KHATANA, S.; VIJAYVERGIA, R. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 2, p. 494-498, 2019.

JAZVINŠČAK JEMBREK, M. et al. Anti-Oxidative, Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects of Flavonols: Targeting Nrf2, NF- κ B and p53 Pathways in Neurodegeneration. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1628, 2021.

JENIK, J. et al. Root system of tropical trees 5. The peg-roots and the pneumathodes of *Laguncularia racemosa* Gaertn. **Preslia**, v. 42, n. 2, p. 105-13, 1970.

JOSHI, N.; WALTER, J. M.; MISHARIN, A. V. Alveolar macrophages. **Cellular immunology**, v. 330, p. 86-90, 2018.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, Borna. Cytokines in inflammatory disease. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 23, p. 6008, 2019.

KAPUR, R. et al. Osteopontin mediates murine transfusion-related acute lung injury via stimulation of pulmonary neutrophil accumulation. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 134, n. 1, p. 74-84, 2019.

KELLNER, M. et al. ROS signaling in the pathogenesis of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). In: **Pulmonary Vasculature Redox Signaling in Health and Disease**. Springer, Cham, 2017. p. 105-137.

KESAVAN, S. et al. Anthropogenic pressure on mangrove ecosystems: Quantification and source identification of surficial and trapped debris. **Science of The Total Environment**, v. 794, p. 148677, 2021.

KHALIL, R. et al. Phytochemical activities of *Conocarpus erectus*: An overview. **Biological and Clinical Sciences Research Journal**, v. 2020, n. 1, 2020.

KHAN, Z. et al. Activity of cefepime/zidebactam (WCK 5222) against *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City medical centres. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 10, p. 2938-2942, 2019.

KHARE, S. et al. Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. **Journal of Plant Biology**, v. 63, n. 3, p. 203-216, 2020.

KIDA, M. et al. High salinity leads to accumulation of soil organic carbon in mangrove soil. **Chemosphere**, v. 177, p. 51-55, 2017.

KIM, M. et al. Elucidation of mechanism for ligand efficacy at leukotriene B4 receptor 2 (BLT2). **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 8, p. 1529-1534, 2020.

KIM, S. et al. A superioridade do IFN- λ como candidato terapêutico para controlar a infecção pulmonar viral aguda por influenza. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 56, n. 2, pág. 202-212, 2017.

KODIKARA, K. A. S. et al. The effects of salinity on growth and survival of mangrove seedlings changes with age. **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, p. 37-46, 2017.

KOHNE, J. G.; FLORI, Heidi R. Risk factors and etiologies of pediatric acute respiratory distress syndrome. In: **Pediatric Acute Respiratory Distress Syndrome**. Springer, Cham, 2020. p. 33-46.

KOMMOSS, F. K. F. et al. The pathology of severe COVID-19-related lung damage: Mechanistic and therapeutic implications. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 117, n. 29-30, p. 500, 2020.

KOSUTOVA, P. et al. Reduction of lung inflammation, oxidative stress and apoptosis by the PDE4 inhibitor roflumilast in experimental model of acute lung injury. **Physiological research**, v. 67, p. S645-S654, 2018.

KPEMISSI, Mabozou et al. Acute and subchronic oral toxicity assessments of *Combretum micranthum* (Combretaceae) in Wistar rats. **Toxicology reports**, v. 7, p. 162-168, 2020.

KUMAR, K. P.; NICHOLLS, A. J.; WONG, C. H. Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. **Cell and tissue research**, v. 371, n. 3, p. 551-565, 2018.

KUMAR, NK H. et al. Impact of climate change on biodiversity and shift in major biomes. In: **Global Climate Change**. Elsevier, 2021. p. 33-44.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold spring harbor protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095505, 2018.

LACERDA-JÚNIOR, G. V. et al. Land use and seasonal effects on the soil microbiome of a Brazilian dry forest. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 648, 2019.

LACOUTH-SILVA, F. et al. The effect of 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20 (29)-ene lupane compound isolated from *Combretum leprosum* Mart. on peripheral blood mononuclear cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.

LAGUNA-GOYA, R. et al. IL-6–based mortality risk model for hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 4, p. 799-807. e9, 2020.

LAI, J. et al. Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- κ B and MAPK signaling pathways. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 1-12, 2017.

LASKIN, D. L.; MALAVIYA, R.; LASKIN, J. D. Role of macrophages in acute lung injury and chronic fibrosis induced by pulmonary toxicants. **Toxicological Sciences**, v. 168, n. 2, p. 287-301, 2019.

LEE, A. S. et al. Reflux-aspiration in chronic lung disease. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 17, n. 2, p. 155-164, 2020.

LEE, C.; CHOI, W. J. Overview of COVID-19 inflammatory pathogenesis from the therapeutic perspective. **Archives of pharmacal research**, p. 1-18, 2021.

LEE, C; LEE, J; PARK, M. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 03, 2017.

LEI, J. et al. Cordycepin inhibits LPS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 110-114, 2018.

LEZOUL, N. E. H. et al. Extraction Processes with Several Solvents on Total Bioactive Compounds in Different Organs of Three Medicinal Plants. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4672, 2020.

LI, H. B.; WONG, C. C.; CHENG, K. W.; CHEN, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008.

LI, H. et al. A comprehensive proteome analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to identify candidate biomarkers of pancreatic cancer. **Cancer genomics & proteomics**, v. 16, n. 1, p. 81-89, 2019.

LI, L. et al. Acute lung injury in patients with COVID-19 infection. **Clinical and Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 20-27, 2020.

LI, L. et al. Classical dendritic cells regulate acute lung inflammation and injury in mice with lipopolysaccharide induced acute respiratory distress syndrome. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, n. 2, p. 617-629, 2019.

LI, P. et al. MiR-150 attenuates LPS-induced acute lung injury via targeting AKT3. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 105794, 2019.

LI, R. et al. Impact of air pollutants on outpatient visits for acute respiratory outcomes. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 1, p. 47, 2017.

LIAN, J. et al. Analysis of epidemiological and clinical features in older patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) outside Wuhan. **Clinical infectious diseases**, v. 71, n. 15, p. 740-747, 2020.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, v. 13, p. 757, 2018.

LILLEY, E. et al. ARRIVE 2.0 and the British Journal of Pharmacology: Updated guidance for 2020. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 16, p. 3611-3616, 2020.

LITTLE, P. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and covid-19. **Bmj**, v. 368, 2020.

LIU, L. et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. **JCI insight**, v. 4, n. 4, 2019.

LIU, R.; MABURY, S. A. Single-use face masks as a potential source of synthetic antioxidants to the environment. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 8, n. 8, p. 651-655, 2021.

LIU, S. et al. Rutin attenuates inflammatory responses induced by lipopolysaccharide in an in vitro mouse muscle cell (C2C12) model. **Poultry science**, v. 98, n. 7, p. 2756-2764, 2019.

LIU, X. et al. Revealing structure and assembly for rhizophyte-endophyte diazotrophic community in mangrove ecosystem after introduced *Sonneratia apetala* and *Laguncularia racemosa*. **Science of The Total Environment**, v. 721, p. 137807, 2020.

LONARD, R. I. et al. Biology and Ecology of the Halophyte *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. f.: A Review. **Handbook of Halophytes: From Molecules to Ecosystems towards Biosaline Agriculture**, p. 1-16, 2020.

LONARD, R. I. et al. Biology and Ecology of the Halophyte *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. f.: A Review. **Handbook of Halophytes: From Molecules to Ecosystems towards Biosaline Agriculture**, p. 1-16, 2020.

LU, L. et al. A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 1, p. 3-5, 2021.

LUDEWIG, P.; WINNEBERGER, J.; MAGNUS, T. The cerebral endothelial cell as a key regulator of inflammatory processes in sterile inflammation. **Journal of neuroimmunology**, v. 326, p. 38-44, 2019.

LUO, W. et al. Histopathologic findings in the explant lungs of a patient with COVID-19 treated with bilateral orthotopic lung transplant. **Transplantation**, v. 104, n. 11, p. e329-e331, 2020.

LÜTTGE, U. et al. Elimination of salt by recretion: Salt glands and gland-supported bladders in recretahalophytes. **Halophytes and climate change: Adaptive mechanisms and potential uses**, p. 160, 2019.

LUTZ, M. et al. Roles of phenolic compounds in the reduction of risk factors of cardiovascular diseases. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 366, 2019.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In: **The systematic identification of flavonoids**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1970. p. 41-164.

MACHADO-ARANDA, D. et al. Alveolar macrophage depletion increases the severity of acute inflammation following nonlethal unilateral lung contusion in mice. **The journal of trauma and acute care surgery**, v. 76, n. 4, p. 982, 2014.

MALEKI, T.; AKHANI, H. Ethnobotanical and ethnomedicinal studies in Baluchi tribes: A case study in Mt. Taftan, southeastern Iran. **Journal of ethnopharmacology**, v. 217, p. 163-177, 2018.

MALLIKARJUNASWAMY, G. E. et al. Probiotic rhizospheric *Bacillus* sp. from *Zingiber officinale* Rosc. displays antifungal activity against soft rot pathogen *Pythium* sp. **Current Plant Biology**, v. 27, p. 100217, 2021.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screening for pure or drug materials. **Lloydia**, v.25, p.23-53, 1962.

MANGALMURTI, N.; HUNTER, C. A. Cytokine storms: understanding COVID-19. **Immunity**, 2020.

MANOHAR, S. M. A Review of the Botany, Phytochemistry and Pharmacology of Mangrove *Lumnitzera racemosa* Willd. **Pharmacognosy Reviews**, v. 15, n. 30, 2021.

MARÍN, L. et al. De novo biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor*. **PLoS One**, v. 13, n. 11, p. e0207278, 2018.

MARTIN, C. A. et al. **Pathology of complicated Babesia rossi-associated acute lung injury and respiratory distress syndrome in dogs**. 2020. Tese de Doutorado. University of Pretoria.

MARUTHAMUTHU, V. et al. Myxopyrum serratum ameliorates airway inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and OVA-induced murine model of allergic asthma. **Journal of ethnopharmacology**, v. 255, p. 112369, 2020.

MATTHAY, M. A. et al. Acute respiratory distress syndrome. **Nature reviews Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 1-22, 2019.

MATTHAY, M. A.; ZIMMERMAN, G. A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 33, n. 4, p. 319-327, 2005.

MAURIN, O. et al. The inclusion of Anogeissus, Buchenavia and Pteleopsis in Terminalia (Combretaceae: Terminaliinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 184, n. 3, p. 312-325, 2017.

MCELVANEY, O. J. et al. Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 202, n. 6, p. 812-821, 2020.

MEHTA, S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. **Vascular pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 390-403, 2005.

MENDES, R. J. de 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**, v. 60, 2018.

MENDONÇA, L. A. B. M. et al. Toxicity and phytochemistry of eight species used in the traditional medicine of sul-mato-grossense, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 574-581, 2019.

MESQUITA, L. M. S. et al. Modulatory effect of polyphenolic compounds from the mangrove tree *Rhizophora mangle* L. on non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance in high-fat diet obese mice. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2114, 2018.

METOK, Y. et al. Biofilm and MBL production among imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **MicroMedicine**, v. 8, n. 2, p. 63-73, 2020.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018.

MISHARIN, A. V. et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 8, p. 2387-2404, 2017.

MOHAMMED, R. N. D.; ALHASSAN, Z. Evaluation of antidiarrhoeal activity of methanol extract of *Combretum hypopilinum* Diels (Combretaceae) leaves in mice. 2020.

MONTERO-FERNANDEZ, M. A.; PARDO-GARCIA, R. Histopathology features of the lung in COVID-19 patients. **Diagnostic Histopathology**, v. 27, n. 3, p. 123-127, 2021.

MORAES, G. V. et al. Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e238111436225-e238111436225, 2022.

MOWERY, N. T.; TERZIAN, W. T. H.; NELSON, A.C. Acute lung injury. **Current problems in surgery**, v. 57, n. 5, p. 100777, 2020.

MUKHOPADHYAY, S.; DUTTA, R.; DAS, P. A critical review on plant biomonitors for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in air through solvent extraction techniques. **Chemosphere**, v. 251, p. 126441, 2020.

MUVHULAWA, N. et al. Rutin ameliorates inflammation and improves metabolic function: A comprehensive analysis of scientific literature. **Pharmacological Research**, p. 106163, 2022.

- NOVA, Z.; SKOVIEROVA, H.; CALKOVSKA, A. Alveolar-capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 831, 2019.
- NURETTIN, Y. et al. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Minuartia meyeri*. **Turkish Journal Chemistry**. V. 30, n. 1, p 70-76, 2006.
- ODEYEMI, S.I; BRADLEY, G. Medicinal plants used for the traditional management of diabetes in the Eastern Cape, South Africa: pharmacology and toxicology. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2759, 2018.
- OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline: 423.
- OJO, A. S. et al. Pulmonary fibrosis in COVID-19 survivors: predictive factors and risk reduction strategies. **Pulmonary medicine**, v. 2020, 2020.
- ONEFELI, A. O.; STANYS, V. Phylogenetic Study of African Combretaceae R. Br. Based on rbcL Sequence. **Baltic Forestry**, v. 25, n. 2, p. 170-177, 2019.
- PALMIERI, Erika M. et al. Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2020.
- PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. **Current Opinion in Food Science**, v. 23, p. 173-182, 2018.
- PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content Assay. *Food Analytical Methods*, v. 7, n. 9, p. 1776-1782, 2014.
- PELOZO, A. et al. Leaf morphological strategies of seedlings and saplings of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae), *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) and *Avicennia schaueriana* (Acanthaceae) from Southern Brazil. **Revista de biologia tropical**, v. 64, n. 1, p. 305-317, 2016.
- PIERCE, S. et al. Plant secondary metabolite diversity reflects both phylogeny and ecological adaptation. **bioRxiv**, 2021.
- POPRAWA, P. et al. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.
- PRASAD, R.; PRASAD, S. B. A review on the chemistry and biological properties of Rutin, a promising nutraceutical agent. **Asian J. Pharm. Pharmacol**, v. 5, p. 1-20, 2019.
- PREVÉY, J. et al. Greater temperature sensitivity of plant phenology at colder sites: implications for convergence across northern latitudes. **Global change biology**, v. 23, n. 7, p. 2660-2671, 2017.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, v. 269, p. 337-341, 1999.

PUTRI, Y. et al. Identifikasi senyawa bioaktif madu di beberapa daerah *Sumbawa dengan* menggunakan gas chromatography. **Food and Agro-industry Journal**, v. 1, n. 1, p. 27-32, 2020.

QAZI, M. A.; MOLVI, Khurshid I. Free radicals and their management. **American Journal of Pharmacy and Health Research**, v. 6, n. 4, p. 1-10, 2018.

RAGUPATHI, G. Phytochemical and antioxidant screening of *Gloriosa superba L.* from different geographical positions of South India. **Int J Bot Stud.**, v. 1, p. 13-19, 2016.

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.

RAMAKER, M. J.; DULAWA, S. C. Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. **Molecular psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 656-665, 2017.

RAN, L. et al. Synergistic antioxidant effect of glutathione and edible phenolic acids and improvement of the activity protection by coencapsulation into chitosan-coated liposomes. **LWT**, v. 127, p. 109409, 2020.

RAUF, A. et al. Proantocianidinas: Uma revisão abrangente. **Biomedicina e Farmacoterapia**, v. 116, p. 108999, 2019.

RE, R. et al. Antioxidant Activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

REDDY, P. H; AUDIPUDI, A. V. Physico-Phyto and Chromato Graphic Analysis of *Aviccinia alba* and *Laguncularia racemosa* Leaves. **Int J Pharmacogn Phytochem Res**, v. 8, n. 11, p. 1819-1821, 2016.

REINER, D. J. et al. Relapse to opioid seeking in rat models: behavior, pharmacology and circuits. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 465-477, 2019.

RENARD, D.; ROSSELET, A. Drug-induced hemolytic anemia: pharmacological aspects. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 24, n. 3, p. 110-114, 2017.

RENDA, R. Can salivary creatinine and urea levels be used to diagnose chronic kidney disease in children as accurately as serum creatinine and urea levels? A case–control study. **Renal failure**, v. 39, n. 1, p. 452-457, 2017.

- REZOAGLI, E.; FUMAGALLI, R.; BELLANI, G. Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome. **Annals of translational medicine**, v. 5, n. 14, 2017.
- RIBEIRO, N. M. et al. Red blood cell hemolytic assay: an alternative to assess cytotoxicity of essential oils. **Int J Developm Res**, v. 10, p. 34565-34569, 2020.
- RODRIGUES, C. F. B. et al. Evaluation of potential thrombin inhibitors from the white mangrove (*Laguncularia racemosa* (L.) CF Gaertn.). **Marine drugs**, v. 13, n. 7, p. 4505-4519, 2015.
- RODRIGUES, C. F. B. et al. Evaluation of the inhibitory potential of Casuarictin, an Ellagitannin isolated from White Mangrove (*Laguncularia racemosa*) leaves, on snake venom secretory phospholipase A2. **Marine drugs**, v. 17, n. 7, p. 403, 2019.
- RODRÍGUEZ, A. V. Producción forestal – Fundamentos –. 1ª ed.p. 224. ed. San José, C.R: EUNED, 2007.
- RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1445-1452, 2017.
- SAADULLAH, M. et al. Cytotoxic and antioxidant potentials of ellagic acid derivatives from *Conocarpus lancifolius* (Combretaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 5, p. 1037-1080, 2020.
- SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT1 receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. **Clinical science**, v. 123, n. 10, p. 567-590, 2012.
- SAFWAT, G.; Hamed, MM; HELMY, A. The biological activity of *Conocarpus erectus* extracts and their applications as cytotoxic agents. **Homologyonline**, v. 2, p. 171-184, 2018.
- SAGANUWAN, S. A. Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: an overview. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 20, n. 4, 2017.
- SALUJA, M. et al. Central nervous system involvement in dengue: A tertiary care centre study. **Current Medicine Research and Practice**, v. 9, n. 2, p. 45-48, 2019.
- SANTA CRUZ, A. et al. Interleukin-6 is a biomarker for the development of fatal severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 pneumonia. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 613422, 2021.
- SANTA-MARÍA, C. et al. Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. **Nutrients**, v. 15, n. 1, p. 224, 2023.
- SANTOS, D. K. D. N. et al. Atividades imunoestimuladoras e antioxidantes de uma lignina isolada de folhas de *Conocarpus erectus*. **Revista internacional de macromoléculas biológicas**, v. 150, p. 169-177, 2020.

SANTOS, D. K. D. N. 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.

SANTOS, D. N. D. et al. Investigation of Nutritional Contents, Antioxidant and Immunostimulatory Activities of Aqueous Extract from *Laguncularia racemosa* Leaves. **The Natural Products Journal**, v. 11, n. 2, p. 231-243, 2021.

SANTOS, F.R. et al. Influence of anthropogenic activities and risk assessment on protected mangrove forest using traditional and emerging molecular markers (Ceará coast, northeastern Brazil). **Science of the Total Environment**, v. 656, p. 877-888, 2019.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F. et al. **Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism**. London, UK: IntechOpen, 2019.

SARGIN, S. A. Potential anti-influenza effective plants used in Turkish folk medicine: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113319, 2021.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. Phytochemicals and phyto-extracts in cosmetics. **Trends in phytochemical research**, v. 2, n. 4, p. 185-186, 2018.

SEMWAL, R. et al. Health benefits and limitations of rutin-A natural flavonoid with high nutraceutical value. **Phytochemistry Letters**, v. 46, p. 119-128, 2021.

SERENESKI-LIMA, C. et al. Historical and contemporary factors affect the genetic diversity and structure of *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn, along the western Atlantic coast. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 249, p. 107055, 2021.

SHAREEF H. K. et al., Antibacterial effect of ginger (**Zingiber officinale**) roscoe and bioactive chemical analysis using Gas chromatography mass spectrum. **Orient J Chem**, 32(2), 2016, 817-837.

SHI, C. et al. Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 435-442, 2010.

SHI, C.; XU, M. J.; BAYER, M.; et al. Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 435-442, 2010.

SHRESTHA, J. et al. Lung-on-a-chip: the future of respiratory disease models and pharmacological studies. **Critical reviews in biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 213-230, 2020.

SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 122-126, 2018.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.

SILE, I. et al. Medicinal plants and their uses recorded in the Archives of Latvian Folklore from the 19th century. **Journal of ethnopharmacology**, v. 249, p. 112378, 2020.

SINGH, S. et al. Acacetin, a flavone with diverse therapeutic potential in cancer, inflammation, infections and other metabolic disorders. **Food and Chemical Toxicology**, v. 145, p. 111708, 2020.

SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. based DPPH assay for antioxidant activity analysis. **Analytical sciences**, v. 34, n. 7, p. 795-800, 2018.

SMITH, N. F.; WILCOX, C.; LESSMANN, J. M. Fiddler crab burrowing affects growth and production of the white mangrove (*Laguncularia racemosa*) in a restored Florida coastal marsh. **Marine Biology**, v. 156, n. 11, p. 2255-2266, 2009.

SOBEH, M. et al. Chemical composition, antioxidant and hepatoprotective activities of methanol extracts from leaves of *Terminalia bellirica* and *Terminalia sericea* (Combretaceae). **PeerJ**, v. 7, p. e6322, 2019.

SOBRADO, M. A. Leaf characteristics and gas exchange of the mangrove *Laguncularia racemosa* as affected by salinity. **Photosynthetica**, v. 43, n. 2, p. 217-221, 2005.

SOBRADO, M. A. Relationship of water transport to anatomical features in the mangrove *Laguncularia racemosa* grown under contrasting salinities. **New Phytologist**, v. 173, n. 3, p. 584-591, 2007.

SOQUETTA, M. B.; TERRA, L. M.; BASTOS, C. P. Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. **CyTA-Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 400-412, 2018.

SOUZA, A. et al. Climate indicators and the impact on morbidity and mortality of acute respiratory infections. **Advanced Studies in Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 5-20, 2018.

SOY, M. et al. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. **Clinical rheumatology**, v. 39, p. 2085-2094, 2020.

SPERANDEO, P.; MARTORANA, A. M.; POLISSI, A. Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 11, p. 1451-1460, 2017.

SRIVASTAVA R.; MUKERJEE A.; VERMA A., GC-MS analysis of phytocomponents in, pet ether fraction of *Wrightia tinctoria* seed. *Pharmacogn J*, 7(4), 2015, 249-253.
STACE, C. A. Combretaceae. In: **Flowering Plants- Eudicots**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. p. 67-82.

STEINMULLER, H. E. et al. Tipping points in the mangrove March: characterization of biogeochemical cycling along the mangrove–salt marsh ecotone. **Ecosystems**, v. 23, n. 2, p. 417-434, 2020.

STICH, M. et al. Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Households with Children, Southwest Germany, May–August 2020. **Emerging infectious diseases**, v. 27, n. 12, p. 3009, 2021.

SUGIMOTO, M. A. et al. Mediators of the resolution of the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 3, p. 212-227, 2019.

SUN, S. S. M.; HANG, C. Broadening the genetic diversity of vegetable crops through molecular approach. In: **III International Symposium Diversification of Vegetable Crops 467**. 1996. p. 23-32.

SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 5, p. 1199-1209, 2020.

SWALLAH, M. S. et al. Antioxidant potential overviews of secondary metabolites (polyphenols) in fruits. **International journal of food science**, v. 2020, 2020.

TABOADA, M. et al. Corticosteroids and the hyper-inflammatory phase of the COVID-19 disease. **Journal of clinical anesthesia**, v. 66, p. 109926, 2020.

TAIPA, R. et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer's disease and their correlation with cognitive decline. **Neurobiology of aging**, v. 76, p. 125-132, 2019.

TANG, L. et al. Design and synthesis of new disubstituted benzoxazolone derivatives that act as iNOS inhibitors with potent anti-inflammatory activity against LPS-induced acute lung injury (ALI). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 28, n. 21, p. 115733, 2020.

TEMİZ, Özge. In vivo neurotoxic effects of emamectin benzoate in male mice: evaluation with enzymatic and biomolecular multi-biomarkers. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2021.

THIRUMURUGAN, D. et al. An introductory chapter: secondary metabolites. **Second metab—sources Appl**, p. 1-21, 2018.

THOMPSON, B. T.; CHAMBERS, R. C.; LIU, Kathleen D. Acute respiratory distress syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 562-572, 2017.

TIAN, C. et al. Rutin prevents inflammation induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells via conquering the TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B signalling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 110-117, 2021.

TÓTH, B.; HOHMANN, J.; VASAS, A.. Phenanthrenes: A promising group of plant secondary metabolites. **Journal of natural products**, v. 81, n. 3, p. 661-678, 2017.

TROTTER, R. T.; LOGAN, M. H. Informant consensus: a new approach for identifying potentially effective medicinal plants. In: **Plants in Indigenous Medicine & Diet**. Routledge, 2019. p. 91-112.

UNTEA, A. et al. Comparison of ABTS, DPPH, phosphomolybdenum assays for estimating antioxidant activity and phenolic compounds in five different plant extracts. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, v. 75, n. 2, p. 111-114, 2018.

VADÁSZ, István; SZNAJDER, Jacob I. Gas exchange disturbances regulate alveolar fluid clearance during acute lung injury. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 757, 2017.

VETTER, J. Secondary metabolites of ferns. In: **Current Advances in Fern Research**. Springer, Cham, 2018. p. 305-327.

VICTÓRIO, C. P. et al. *Laguncularia Racemosa* Leaves from a Mangrove of the Southeast Atlantic Coast, Brazil: Epicuticular Wax, Morphoanatomical Traits and Minerals. 2021.

VINKEN, M.; BLAAUBOER, B. J. In vitro testing of basal cytotoxicity: establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. **Toxicology in vitro**, v. 39, p. 104-110, 2017.

VINOTH, R.; KUMARAVEL, S.; RANGANATHAN, R. Therapeutic and traditional uses of mangrove plants. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 4-s, p. 849-854, 2019.

VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; JUNIOR, M. R. Maróstica. Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. In: **Bioactive compounds**. Woodhead Publishing, 2019. p. 33-50.

WADSWORTH, Frank H. et al. Growth and regeneration of White Mangrove [*Laguncularia racemosa*] in Puerto Rico. **Caribbean Forester**, v. 20, n. 3/4, p. 59-71, 1960.

WAKASKAR, R. R. Challenges pertaining to adverse effects of drugs. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 9, n. 3, p. 1-2, 2017.

WANG, D. **Target organ toxicology in *Caenorhabditis elegans***. Springer Berlin Heidelberg. 2019.

WANG, L. et al. A review of remote sensing for mangrove forests: 1956–2018. **Remote Sensing of Environment**, v. 231, p. 111223, 2019.

WANG, X. et al. Anti-Inflammation Activity of Flavones and Their Structure–Activity Relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 26, p. 7285-7302, 2021.

WANGKHEIRAKPAM, Sujata. Traditional and folk medicine as a target for drug discovery. In: **Natural Products and Drug Discovery**. Elsevier, 2018. p. 29-56.

WHITE, P. J. Selenium metabolism in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1862, n. 11, p. 2333-2342, 2018.

WOŁOSIAK, R. et al. Verification of the conditions for determination of antioxidant activity by ABTS and DPPH assays—A practical approach. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 50, 2022.

XU, X. et al. Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. **Food Chemistry**, v. 353, p. 129488, 2021.

YAN, C. et al. C/EBP γ is a critical negative regulator of LPS-/IgG immune complex-induced acute lung injury through the downregulation of C/EBP β -/C/EBP δ -dependent C/EBP transcription activation. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 10, p. 13696-13710, 2020.

YANG, G. et al. Discovery of an ene-reductase for initiating flavone and flavonol catabolism in gut bacteria. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.

YANG, Li et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.

YE, R; LIU, Z. ACE2 exhibits protective effects against LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the LPS-TLR4 pathway. **Experimental and molecular pathology**, v. 113, p. 104350, 2020.

YE, Z. et al. Inhibition of leukotriene B4 synthesis protects against early brain injury possibly via reducing the neutrophil-generated inflammatory response and oxidative stress after subarachnoid hemorrhage in rats. **Behavioural brain research**, v. 339, p. 19-27, 2018.

YOUSSOUF, Traore et al. Evaluation of the toxicity of the ethanol extract 70% of the bark of *Terminalia macroptera* (Combretaceae) on Whistar Rats. 2019.

YUKI, K.; FUJIOGI, Miho; KOUTSOGIANNAKI, Sophia. COVID-19 pathophysiology: A review. **Clinical immunology**, v. 215, p. 108427, 2020.

ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; RIETSCHER, E. T. Chemical structure of lipid A: recent advances in structural analysis of biologically active molecules. **Endotoxin in health and disease**, p. 93-114, 2020.

ZHANG, H. et al. RvD1 ameliorates LPS-induced acute lung injury via the suppression of neutrophil infiltration by reducing CXCL2 expression and release from resident alveolar macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 76, p. 105877, 2019.

ZHAO, Y.; WANG, M.; XU, B. A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen. **Journal of Functional Foods**, v. 80, p. 104283, 2021.

ZHENG, H. et al. Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting the NF- κ B, iNOS, and Akt signaling in alveolar macrophages. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 317, n. 3, p. L381-L391, 2019.

ZHOU, S. et al. CT features of coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia in 62 patients in Wuhan, China. **American Journal of Roentgenology**, v. 214, n. 6, p. 1287-1294, 2020.

ZHU, C. et al. Homeostatic and early-recruited CD101– eosinophils suppress endotoxin-induced acute lung injury. **European Respiratory Journal**, v. 56, n. 5, 2020.

ANEXO A – FICHA SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

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

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A32BAC6

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A32BAC6**
 Usuário: **UFRPE**
 CPF/CNPJ: **24.416.174/0001-06**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Laguncularia racemosa

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS DE Laguncularia racemosa (L.) C. F. Gaertn SOBRE A SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS**

Equipe

Emmanuel Viana Pontual	UFRPE
Pedro Paulo Marcelino Neto	Universidade Federal de Pernambuco
Thiago Henrique Napoleão	Universidade Federal de Pernambuco
Patrícia Maria Guedes Paiva	Universidade Federal de Pernambuco

Data do Cadastro: **24/02/2023 09:59:53**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:00** de **24/02/2023**.



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

ANEXO B – FICHA DE APROVAÇÃO CEUA



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

Recife, 30 de outubro de 2022

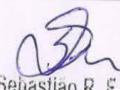
Ofício nº 89/22

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Prof. Emmanuel Viana Pontual
Departamento de Bioquímica
Processo nº0076/2022

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação das atividades farmacológicas dos extratos de *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn sobre a síndrome respiratória aguda grave induzida por lipopolissacarídeo em camundongos**” Registrado com o nº0076/2022 sob a responsabilidade da Prof. **Emmanuel Viana Pontual** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 25/10/2022

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/10/2022 a 28/02/2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongos <i>Mus musculus</i> , heterogênico, Swiss Camundongos <i>Mus musculus</i> , isogênico, Balb/c
Nº de animais	Total = 152 camundongos (104 Swiss heterogênicos (24 machos + 80 fêmeas) (48 Balb/c isogênicos fêmeas)
Peso/Idade	25 a 30g (60 dias)
Sexo	(24 Machos) e (80 fêmeas)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Laboratório de Imunopatologia Leizo Asami LIKA da UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Laboratório do Departamento de Bioquímica da UFPE

Atenciosamente


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

