



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

Dayane Kelly Dias do Nascimento

Atividade Antibacteriana, Citotóxica e Imunomodulatória de
Conocarpus erectus Linneus (Combretaceae)

Recife – PE

2017



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

Dayane Kelly Dias do Nascimento

Atividade Antibacteriana, Citotóxica e Imunomodulatória de
Conocarpus erectus Linneus (Combretaceae)

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

Orientador: Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Recife – PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- N244a Nascimento, Dayane Kelly Dias do.
Atividade antibacteriana, citotóxica e imunomodulatória de *Conocarpus erectus* linneus (Combretaceae) / Dayane Kelly Dias do Nascimento. - 2017.
122 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientador: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Combretaceae. 2. Fitoterapia. 3. Antibacteriano. 4. Citotoxicidade. 5. Fatores Imunológicos. I. Vieira, Jeymesson Raphael Cardoso (Orientador). II. Título.
- 610 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-186)

DAYANE KELLY DIAS DO NASCIMENTO

**“ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE
CONOCARPUS ERECTUS LINNEUS (COMBRETACEAE)”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Aprovado em 23/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Patrícia Erika de Melo Marinho (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Henrique Napoleão – (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Marília Cavalcanti Coriolado – (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

COORDENADOR

Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

VICE-COORDENADOR

Prof. Dr. Brivaldo Markman Filho

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a; Ângela Luiza Branco Pinto Duarte

Prof. Ary Gomes Filho

Prof. Brivaldo Markman Filho

Prof. Bruno Severo Gomes

Prof^a. Ana Cláudia Diniz Lopes Marques

Prof. Décio Medeiros Peixoto

Prof^a. Edgar Guimarães Victor

Prof. Edmundo Pessoa de A. Lopes Neto

Prof. Emanuel Sávio de C. Sarinho

Prof^a. Emília Chagas Costa

Prof^a; Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof. Hilton Justino de Oliveira

Prof. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Prof^a. Lucila Maria Valente

Prof. José Ângelo Rizzo

Prof. Lucio Villar Rabelo Filho

Prof. Marcelo Renato Gruerino

Prof. Paulo Sérgio Ramos Araújo

Prof^a. Patrícia Érika de Melo Marinho

Prof^a. Romualda Castro do Rêgo Barros

Prof. Sandro Gonçalves de Lima

Prof^a. Simone Cristina Soares Brandão

Dedico esta dissertação ao meu esposo Diego Santos, fonte de aprendizado diário, aos meus pais Dielson Vieira e Marivânia Dias por todo estímulo na busca de novos conhecimentos. E a toda minha família, amigos e professores que tornaram este trabalho possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me concedeu a oportunidade e que com suas mãos me sustenta e me dá forças para continuar a caminhada. Por sua graça, proteção e fidelidade.

Aos meus pais Dielson Vieira e Marivânia Dias que com todo amor e dedicação me ajudam a enfrentar as dificuldades desta vida.

Ao meu marido Diego Santos, e sua (minha) família, pelo incentivo, pelos muitos momentos de ajuda e por trazerem sempre carinho e conforto.

À minha família que esteve sempre torcendo por mim e me incentivando a alcançar os meus objetivos.

Ao meu avô Diomedes Vieira, minha avó Marlene Dias e minha tia Zelândia do Nascimento *in memoriam*, que cuidou de mim sempre me incentivando a alcançar os meus objetivos.

Ao meu irmão, sempre presente me dando força.

Aos meus irmãos em Cristo que intercederam a Deus por mim.

Ao Professor Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira, por ter me acolhido desde os meus primeiros, passos acadêmicos até os dias de hoje, com sabedoria, rigidez e, ao mesmo tempo, com imenso carinho.

À Professora. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo pela orientação, colaboração e oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho. Por todo o empenho e dedicação, sempre me incentivando a buscar o melhor.

Ao Dr. Emanuel Sarinho, coordenador da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por sua prestatividade e zelo.

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

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela diligência e apoio durante todo o processo de formação.

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

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

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

Ao Dr. Rafael Ximenes e sua equipe pela disposição em ajudar e saber compartilhado.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior à concessão de bolsa de mestrado durante todo o período de pesquisa.

Aos meus amigos da turma de 2015 da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, fonte de aprendizado diário, por todo carinho e parceria durante o curso e que levarei por toda vida.

Aos meus amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

*Reconhece-o em todos os teus caminhos, e Ele
endireitará as tuas veredas.*

Provérbios 3: 6

RESUMO

Introdução: Os manguezais são áreas ricas em recursos economicamente importantes explorados pela população costeira humana. *Conocarpus erectus* (Combretaceae) é uma das espécies encontradas nos manguezais e é usada na medicina popular no tratamento de anemia, expectoração, conjuntivite, diabetes, diarreia, febre, gonorréia, dor de cabeça, hemorragia, orquites, erupção cutânea e sífilis. Este estudo teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana do extrato aquoso de folhas de *C. erectus* (EAFCe) em bactérias Gram-positivas e negativas multiresistentes e isoladas de feridas e atividades citotóxica e imunomodulatória em células humanas estimuladas com EAFCe. **Métodos:** Trata-se de um estudo pré-clínico desenvolvido no período de março de 2015 a janeiro de 2017. O material botânico foi coletado no Mangue da cidade de Itamaracá, distrito de Vila Velha no estado de Pernambuco – Brasil autorizado pela Empresa Pernambucana de Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos (CA DFRB N. 120/2014º). O extrato foi feito por infusão com água destilada, à 40°C por 30 minutos e caracterizado através da análise qualitativa em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os ensaios contra as bactérias Gram-positivas e negativas foram realizados analisando a difusão em disco e os parâmetros de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB). As células mononucleares de sangue periférico humano foram obtidas a partir de 4 mL de sangue de 6 voluntários que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com a autorização do Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Brasil nº 1.870.360/2016). A análise de viabilidade celular foi realizada pelo teste de anexina V-FITC e coloração com iodeto de propídio em concentração de EAFCe de 50, 25, 12,5 e 6 µg / mL. A medição dos níveis de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes dos linfócitos foi realizada pelo Cytometric Beads Matrix System (CBA), análise *in vitro* de óxido nítrico, contagem total de linfócitos e avaliação da ativação e inibição de linfócitos também para o perfil imunológico. **Resultados:** O EAFCe apresentou 3',4'-OH flavonóide, fenilpropanoglicosídeos, saponinas, proantocianidinas poliméricas e taninos hidrolisáveis em sua composição, além de dezoito compostos desconhecidos quando comparados aos padrões disponíveis. O EAFCe apresentou atividade antimicrobiana principalmente para a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. A EAFCe não promoveu morte celular em 95% dos linfócitos humanos. IL-2, IL-10, TNF- α , citocinas de IFN- γ e óxido nítrico foram produzidos pelos linfócitos e o subconjunto de linfócitos T CD8 + foram ativados através da estimulação com EAFCe. **Conclusão:** EAFCe apresentou atividade antibacteriana moderada de acordo com os níveis do valor da CMI, não apresentou atividade citotóxica e mostrou atividade imunomoduladora em glóbulos brancos humanos, confirmando seu potencial uso como imunomodulador e antibacteriano, sugerindo potencial terapêutico alternativo desta planta para tratamento seguro e eficaz de feridas.

Palavras-chave: Combretaceae. Fitoterapia. Antibacteriano. Citotoxicidade. Fatores Imunológicos. Etnofarmacologia.

ABSTRACT

Introduction: Mangroves are areas rich in economically important resources exploited by the human coastal population. *Conocarpus erectus* (Combretaceae) is one of the species found in mangroves and is used in folk medicine in the treatment of anemia, sputum, conjunctivitis, diabetes, diarrhea, fever, gonorrhea, headache, hemorrhage, orchitis, rash and syphilis. This study aimed to investigate antibacterial activity of aqueous extract of leaves of *C. erectus* (AELCe) in Gram-positive and negative multiresistant bacteria isolated from wounds and cytotoxic and immunomodulatory activities on human cells stimulated by AELCe. **Methods:** This is a pre-clinical study developed from March 2015 to January 2017. The botanical material was collected in the Mangrove of the city of Itamaracá, Vila Velha district of the state of Pernambuco - Brazil authorized by the Empresa Pernambucana de Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos (CA DFRB N. 120 / 2014). The extract was made by infusion with distilled water, at 40°C for 30 minutes and characterized by qualitative analysis in thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Gram-positive and negative bacteria assays were promoted by analyzing the disk diffusion and Minimum inhibitory Concentration (MIC) and minimum bactericidal Concentration (MBC) parameters. Human peripheral blood mononuclear cells were obtained from 4mL of blood from 6 volunteers who signed the Free and Informed Consent Form with the authorization of the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Brazil # 1,870,360 / 2016). Cell viability analysis was performed by the annexin V-FITC test and staining with propidium iodide at EAFC concentration of 50, 25, 12.5 and 6 µg / mL. Measurement of cytokine and chemokine levels in lymphocyte supernatants was performed by the Cytometric Beads Matrix System (CBA), *in vitro* nitric oxide analysis, total lymphocyte counts and evaluation of lymphocyte activation and inhibition also for the immunological profile. **Results:** AELCe presented 3 ', 4'-OH flavonoid, phenylpropanoglycosides, saponins, polymeric proanthocyanidins and hydrolyzable tannins in its composition, as well as eighteen unknown compounds when compared to the available standards. AELCe showed antimicrobial activity mainly for gram-positive *S. aureus*. AELCe did not promote cell death in 95% of human lymphocytes. IL-2, IL-10, TNF- α , IFN- γ cytokines and nitric oxide were produced by lymphocytes and the subset of CD8 + T lymphocytes were activated through stimulation with AELCe. **Conclusion:** AELCe showed moderate antibacterial activity according to MIC levels, did not show cytotoxic activity and presented immunomodulatory activity in human white blood cells, confirming its potential use as an immunomodulator and antibacterial, suggesting an alternative therapeutic potential of this plant for the safe and effective treatment of wounds.

Keywords: Combretaceae. Phytotherapy. Antibacterial. Cytotoxicity. Immunologic Factors. Ethnopharmacology.

LISTA DE ILUTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa ilustrativo das áreas de mangue no mundo.	28
Figura 2 - Partes da planta <i>Conocarpus erectus</i> L. A. Flores e frutos. B. Folhas. C. Caule.	29
Figura 3 - Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	45
Figura 4 - Cromatograma dos principais compostos identificados no EAFCe pelo tempo de retenção em minutos à 256nm: (1) 2,753; (2) 3, 487; (3) 4,240; (4) 4,727; (5) 6,367; (6) 7,660; (7) 8,347; (8) 13,820; (9) 15,093; (10) 15,353; (11) 17,727; (12) 15,900; (13) 16,107; (14) 17,693; (15) 19,433; (16) 19,987; (17) 20,300; (18) 21,093.....	52
Figura 5 - Viabilidade celular de linfócitos humanos tratados com EAFCe em diferentes concentrações. As células tratadas com EAFCe permaneceram vivas (95%) em 24 horas de incubação. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicata.....	54
Figura 6 - Perfil da produção de TNF- α promovido por EAFCe em culturas de linfócitos humanos em 24 horas de ensaio. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicata. # P = 0,03	55
Figura 7 - Perfil da produção de citocinas IL-2 promovida por EAFCe em linfócitos humanos em 24 horas de ensaio. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicata. #P<0,03.	55
Figura 8 - Perfil da produção de citocinas IL-10 promovida por EAFCe em linfócitos humanos em 24 horas de ensaio. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicata. #P <0,02.s.....	56
Figura 9 - Produção de IFN- γ e liberação de NO promovida por EAFCe em culturas de linfócitos humanos em 24 horas de ensaio. As barras horizontais representam a média de seis experiências independentes realizadas em duplicata. # P = 0,01.....	56

Figura 10 - Ensaios de proliferação, ativação e inibição in vitro induzidos por EAFCe em subconjuntos de linfócitos T CD4 + e T CD8 +. A - A contagem total de linfócitos mostrou que os subgrupos de linfócitos T CD8 + apresentam maiores valores em relação às células controle (# P = 0,01); B - Estudo de ativação mostrou que os subgrupos de linfócitos T CD8 + estavam mais ativados do que as células de controle (# P = 0,01); C - O estudo de inibição mostrou que EAFCe não inibiu ambos os subconjuntos de linfócitos T. As barras horizontais representam a média de seis experiências independentes realizadas em duplicata.57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas de eluição de metabolitos utilizados para triagem fitoquímica do extrato aquoso de folhas de <i>Conocarpus erectus</i> (EAFCe).....	42
Tabela 2 - Micro-organismos escolhidos para o ensaio antimicrobiano.	43
Tabela 3 - Análise fitoquímica do extrato aquoso de folhas de <i>Conocarpus erectus</i>	51
Tabela 4 - Valores dos halos de inibição para extrato aquoso de folhas de <i>Conocarpus erectus</i> (EAFCe)	52
Tabela 5 - Valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) para EAFCe.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BPC	- Base de Pico de Cromatograma
CBA	- Cytometric Bead Array
CBM	- Concentração Bactericida Mínima
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMI	- Concentração Mínima Inibitória
CPqAM	- Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
EAFCe	- Extrato aquoso de folhas de <i>Conocarpus erectus</i> L.
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
GHS	- Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
H₂O₂	- Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	- Interferon gama
IL2	- Interleucina dois
IL4	- Interleucina quatro
IL6	- Interleucina seis
IL10	- Interleucina dez
IP	- Iodeto de propídio
MAC	- Medicina Alternativa e Complementar
MH	- Müller Hinton
NK	- Natural Killer
NO	- Óxido nítrico
O²	- Ânion superóxido
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PAMPs	- Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMCs	- Células Mononucleares de Sangue Periférico
PS	- Fosfatidilserina
PSNs	- Produtos de Saúde Natural
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute
TNF-α	- Fator de Necrose Tumoral alfa
TPP	- Techno Plastic Products

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	20
2	INTRODUÇÃO.....	21
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1	MEDICINA ALTERNATIVA E COMPLEMENTAR (MAC).....	24
3.1.1	Fitoterápicos	25
3.1.2	Manguezal	27
3.1.3	Conocarpus erectus	29
3.1.4	Citotoxicidade.....	31
3.1.5	Resposta imune.....	32
3.1.6	Atividade antibacteriana.....	35
3.2	JUSTIFICATIVA	37
3.3	OBJETIVOS.....	38
3.3.1	Objetivo geral	38
3.3.2	Objetivos específicos	38
4	MÉTODO.....	39
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	40
4.2	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	40
4.3	CASUÍSTICA.....	40
4.3.1	Crerérios de inclusão.....	40
4.3.2	Crerérios de exclusão	40
4.3.3	Amostra.....	41
4.4	OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	41
4.4.1	Material Botânico.....	41
4.4.2	Extração de folhas de Conocarpus erectus L.	41
4.4.3	Análise cromatográfica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	42
4.4.4	Análise cromatográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	42
4.4.5	Antibacteriano	43
4.4.5.1	<i>Meios de cultura</i>	43
4.4.5.2	<i>Microrganismos teste</i>	43

4.4.5.3 Padronização do Inóculo.....	43
4.4.5.4 Teste de difusão em Disco de Papel.....	44
4.4.5.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do EAFCe	44
4.4.6 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	46
4.4.7 Cultura de linfócitos e estimulação in vitro com EAFCe	46
4.4.8 Análise da viabilidade celular.....	46
4.4.9 Medição da produção de citocinas e quimiocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)	47
4.4.10 Análise in vitro de nitratos	48
4.4.11 Ensaio de imunofenotipagem de linfócitos.....	48
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4.6 ASPECTOS ÉTICOS.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 RESULTADOS	51
5.1.1 Prospecção fitoquímica do extrato aquoso de folhas de <i>C. erectus</i> por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE.....	51
5.1.2 Avaliação antibacteriana	52
5.1.2.1 Teste de difusão em disco de papel do EAFCe	52
5.1.2.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB) do EAFCe.....	53
5.1.3 Citotoxicidade.....	53
5.1.4 Produção de quimiocinas e citocinas.....	54
5.1.5 Proliferação, ativação e inibição de linfócitos T CD4 ⁺ e TCD8 ⁺	56
5.2 DISCUSSÃO.....	58
5.2.1 Prospecção Fitoquímica	58
5.2.2 Atividade Antimicrobiana	58
5.2.3 Atividade Citotóxica	60
5.2.4 Atividade Imunomodulatória.....	61
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	63
6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
6.2 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	78

APÊNDICE B - ARTIGO ORIGINAL: Antibacterial, Cytotoxic and Immunomodulatory Activity of Conocarpus erectus Linneus (Combretaceae)	80
ANEXO A JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY – GUIDE FOR AUTHORS	106
ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	117
ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	118

1 APRESENTAÇÃO

A literatura, acerca da Medicina Alternativa e Complementar (MAC), está crescendo de forma constante nos últimos 10 anos, com o objetivo de esclarecer a validade dessa técnica. Desta forma, a medicina complementar e os produtos naturais bioativos estão sendo usados como substitutos terapêuticos ou como tratamentos complementares para aumentar terapias já existentes. Esta dissertação complementa o conhecimento vigente a respeito da espécie *Conocarpus erectus* como tratamento terapêutico alternativo.

A presente pesquisa foi desenvolvida com a finalidade de investigar atividades biológicas de extrato aquoso de folhas *Conocarpus erectus* (EAFCe) avaliando sua ação antibacteriana sobre bactérias Gram-positivas e negativas, citotoxicidade e possível atividade imunomodulatória sobre células imunológicas isoladas de sangue periférico humano, além de, analisar a presença de compostos secundários produzidos por esta planta através de cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A presente dissertação tem como tema: “Atividade imunomodulatória produzida pelo *Conocarpus erectus* L.” e está composta por artigo original com o título: “Immunomodulatory and cytotoxic activities of *Conocarpus erectus* Linneus (Combretaceae) on human white blood cells” (apêndice B). Este artigo foi submetido à publicação para a revista Journal of Ethnopharmacology (ISSN: 0378-8741), periódico de relevância internacional, catalogado no PubMed, segundo as normas de publicação (anexo A).

2 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica está intimamente relacionado à própria evolução do homem. Mitos, lendas e tradições apontam para o emprego de plantas medicinais em todos os tempos, em todas as camadas sociais e em quase toda a humanidade (TEIXEIRA et al., 2014). Dessa forma, o uso de fitoterápicos, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso (ALONSO, 1998). Segundo a OMS, 85% das pessoas do mundo utilizam plantas medicinais para tratar da saúde, 80% das pessoas dos países em desenvolvimento no mundo dependem da medicina tradicional e/ou complementar para suas necessidades básicas de saúde e que cerca de 85% da medicina tradicional envolve o uso de extratos de plantas (FENALTI et al., 2016). No entanto, o uso tradicional destes produtos naturais não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos seguros, sendo assim, é necessário que seja validado a segurança e eficácia desta planta medicinal para que esta possa ser utilizada como medicamento (FREIRE et al., 2015).

Neste sentido, a biodiversidade das florestas tropicais nas últimas décadas tem ganhado ênfase na pesquisa para a descoberta de medicamentos, espera-se que potentes substâncias bioativas estejam nestas florestas. Mundialmente, as florestas de manguezais são consideradas como um dos ecossistemas de maior produtividade biológica. Suas espécies possuem adaptações morfológicas, fisiológicas e ecológicas altamente desenvolvidas que as permitem sobreviver em condições extremas como alta salinidade, variação de marés, ventos fortes, temperaturas elevadas e terras barrentas (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

Conocarpus erectus L. é uma das espécies encontrada no ecossistema mangue, pertencente à família Combretaceae, conhecida popularmente como mangue de botão e crescente sobre linhas costeiras nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (BAILEY, 1976). Na medicina popular, é utilizada como adstringente, hemostático, na prevenção da anemia e no tratamento de conjuntivite, diabetes, diarreia, febre, gonorreia, dor de cabeça, hemorragia, orquite, brotoeja, inchaços e sífilis (ABDEL-HAMEED et al., 2012; ABDEL-HAMEED et al., 2013). Em suas folhas, caules, frutos e flores foram identificados flavonóides, taninos, triterpenos e saponinas, os quais têm sido relacionados com suas propriedades terapêuticas comprovadas (BANDEIRA, 2003; ABDEL-HAMEED et al., 2012;

NASCIMENTO et. al., 2016). Estudos científicos comprovam suas propriedades antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, antifúngica e hepatoprotetora (AYOUB, 2010; RAZA et al., 2016; SILVA, 2004; ABDEL-HAMEED et. al., 2012, 2013; SHOHAYEB et al., 2013; ABDEL-HAMEED et al., 2014). O extrato aquoso de suas folhas apresenta baixa toxicidade em camundongos (NASCIMENTO et al., 2016). Entretanto, estudos a respeito das atividades citotóxica, imunomodulatória e microbiológica do extrato aquoso desta planta, ainda não foram realizados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MEDICINA ALTERNATIVA E COMPLEMENTAR (MAC)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a medicina alternativa e complementar (MAC) é a soma de conhecimentos, habilidades e práticas baseada em teorias, crenças e experiências indígenas e de diferentes culturas, explicáveis ou não, utilizadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento das estruturas física e mental (AEJAZUDDIN, 2016; WHO, 2013). Produtos naturais, como plantas, animais, organismos marinhos e microrganismos têm sido utilizados por muito tempo pelos seres humanos como medicamentos para aliviar e tratar doenças. (SHI et al., 2016). O uso de produtos naturais como medicamentos, representou um grande desafio para os humanos. É altamente provável que, quando procuravam alimento, os humanos primitivos costumavam consumir plantas venenosas, que os levava a sentir vômitos, diarreia, coma ou outras reações tóxicas - talvez até a morte. Com isso, os primeiros humanos foram capazes de desenvolver conhecimento sobre materiais comestíveis e medicamentos naturais (YUAN et al., 2016).

A MAC surgiu muito antes do desenvolvimento e disseminação da medicina ocidental que se originou na Europa, após o desenvolvimento da ciência moderna e da tecnologia. O conhecimento da MAC é frequentemente transmitido verbalmente de geração a geração e, em alguns casos, estão envolvidos teorias e sistemas sofisticados (CRUZ, 2008). Esta traduz uma área do conhecimento dirigido à prestação de cuidados de saúde mediante uma visão holística do ser humano, isto é, tendo em consideração os aspectos físicos, espirituais, emocionais e sociais determinantes no seu diagnóstico, em interação com o meio ambiente e o meio social, o que representa uma relevante mais-valia face à medicina dita convencional ou alopática. (RAPOSO, 2016). Desta forma, a MAC funciona como um termo abrangente que engloba várias categorias: práticas biológicas ou produtos de saúde natural (PSNs) (por exemplo, ervas medicinais, vitaminas), medicina mente-corpo (ioga e relaxamento), práticas manipuladoras e corporais (quiropraxia e osteopatia), medicina energética (Qigong e ímãs) e sistemas médicos completos (homeopatia e naturopatia) (NATIONAL CENTER FOR COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, 2011; WIESENER, 2012).

Globalmente, 30% da população mundial não têm acesso à medicina convencional e para esses pacientes, as plantas medicinais e a medicina alternativa e complementar são as principais opções (OXELMARK et al., 2016). O uso de medicina alternativas e complementar

é altamente prevalente entre os adultos, a nível mundial, com uma prevalência de 75% (ALWHAIBI; SAMBAMOORTHY, 2016). Em alguns países asiáticos e africanos, cerca de 80% da população depende dos remédios tradicionais indígenas para as suas necessidades primárias de cuidados de saúde, que envolvem principalmente as preparações de ervas brutas (RAWAT et al., 2016). Assim, as terapias complementares envolvem abordagens estimulantes dos mecanismos naturais de prevenção de agravos, promoção e recuperação da saúde por meio de tecnologias resolutivas, com ênfase na escuta acolhedora, no vínculo terapêutico e na integração do ser humano com o seu entorno ambiental e social (BRITO et al., 2015).

3.1.1 Fitoterápicos

A Fitoterapia pode ser descrita como a ciência que estuda a utilização de produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica para prevenção, atenuação ou cura de um estado patológico. Neste contexto a fitoterapia engloba plantas medicinais, extratos e medicamentos fitoterápicos (ROSSATO et al., 2012). A Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC) nº 26 define fitoterápico como o produto obtido de matéria prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal. O termo planta medicinal significa uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2014).

A fitoterapia tem se tornado cada vez mais popular, sendo reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (COSTA, 2015). Alguns estados brasileiros, por exemplo, vêm fazendo uso da fitoterapia nas Unidades Básicas de Saúde, isso ocorre devido à sua grande aceitabilidade, fácil acessibilidade e baixo custo, tornando o consumo das plantas uma prática importante de saúde pública presente na vida da população, pois parte da mesma tem preferência pelo uso de produtos *in natura* em relação aos sintéticos, focando o âmbito preventivo e curativo (BRASIL, 2014). Entretanto, ainda falta divulgar à população informações adequadas sobre as propriedades das plantas medicinais, alerta sobre o seu

consumo concomitante com os medicamentos alopáticos sem aviso ao médico e a existência de plantas que apresentam toxicidade. Esse conjunto de fatores demonstra a necessidade de projetos que busquem informar a população sobre o uso correto das plantas medicinais (MARTINS; GARLET, 2016).

As propriedades farmacológicas das plantas dependem dos seus compostos secundários. Estes aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim, como por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas (ARAÚJO, 2015). Sendo assim, despertam grande interesse, não só por suas atividades biológicas exercidas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também por sua importância comercial, tanto na área farmacêutica, quanto nas áreas alimentar, agrônômica e perfumaria (PEREIRA; CARDOSO, 2012). No mercado farmacêutico, a grande parcela dos fármacos em uso clínico tem sido gerada dos metabólicos secundários oriundos de produtos naturais ou por meio de sínteses químicas planejadas a partir destes, comprovando que a parceria entre a química medicinal e a química de produtos naturais se torna um efetivo instrumento para a descoberta de fármacos inovadores (ANDRADE et al., 2006) As principais classes de metabólitos secundários identificados em espécies vegetais são os compostos nitrogenados, compostos fenólicos ou fenóis e terpenos ou terpenóides (CUNHA et al., 2016).

Para Simões et al. (2010), a origem de todos os metabólitos secundários envolve o metabolismo da glicose via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O primeiro é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos, compostos fenólicos, terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos. Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (SILVA; LIMA, 2016).

3.1.2 Manguezal

Os manguezais são comunidades ecológicas diversas e altamente produtivas, que fornecem importantes funções ecossistêmicas (GHOSH et al., 2015). Localizados na interface terra-mar, protegem as áreas costeiras contra perigos naturais, tais como ciclones e tsunamis (DAHDOUH-GUEBAS et al., 2005). Retém os sedimentos terrestres e recicla os nutrientes, apoiando assim águas claras no mar, o que, por sua vez, favorece a atividade fotossintética do fitoplâncton, bem como o crescimento e a robustez dos recifes de corais, dos leitos marinhos e das comunidades de peixes do recife (MUMBY; HASTINGS, 2008) eles servem como um importante habitat, viveiro e refúgio, fornecendo alimento para inúmeros organismos, incluindo os seres humanos (NAGELKERKEN et al., 2008). Além disso, a produção em biomassa dos manguezais é, em média, maior que qualquer outro ecossistema aquático, sendo possível equiparar os valores de biomassa dos manguezais de regiões equatoriais aos de qualquer floresta tropical (CLOUGH, 1992).

Os manguezais ocupam uma área estimada de 181.000 km² e as regiões biogeográficas mais diversas incluem o Indo-Oeste Pacífico, Indonésia, Austrália, Brasil e Nigéria, que compreendem cerca de 43% das florestas de manguezais do mundo (figura 1). (BURANELLI, 2016). No Brasil, os manguezais ocorrem desde o extremo norte (Oiapoque 04°30'N) no Amapá até Santa Catarina (Laguna 28°30'S), correspondendo a 6.800 km, aproximadamente (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000). Apesar de o sudeste asiático ter a maior área de cobertura de manguezal, cerca de 33,5% da cobertura mundial, a maior área contínua desse ecossistema encontra-se na região Nordeste da costa brasileira, representando 4,3% dos mangues no mundo (CARVALHO, 2016). Devido à sua importância ecológica, no Brasil, existem esforços para a manutenção e conservação dos manguezais através de leis que protegem esses ecossistemas como Áreas de Proteção Permanente (Lei Federal nº 12.651/2012 - Código Florestal). Entretanto, ainda há intensa atividade humana interferindo na conservação de áreas de manguezais. Atividades antrópicas são constantes nos manguezais, devido à conversão das áreas costeiras em outros usos, como por exemplo, aquicultura, desenvolvimento urbano e turístico, entre outros (SPALDING et al., 2010).



Fonte: NASCIMENTO, 2014.

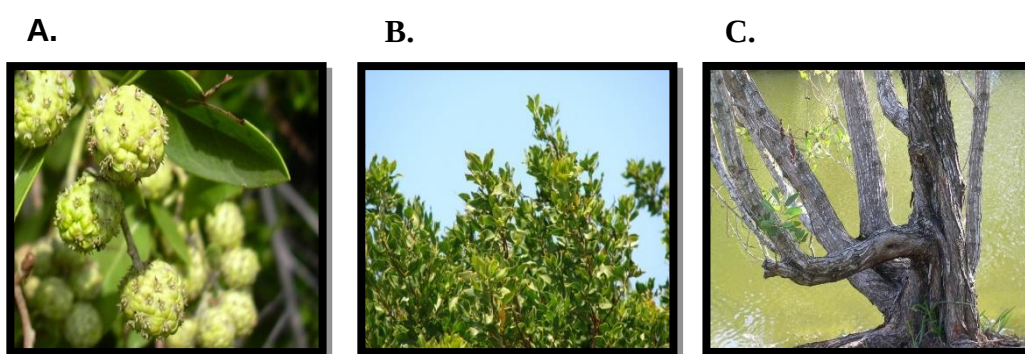
Figura 1 - Mapa ilustrativo das áreas de mangue no mundo.

Segundo Bartz et al. (2015) a instabilidade do solo dos manguezais, provocada pela alta acidez, alta salinidade do solo e a baixa concentração de oxigênio, faz com que as espécies vegetais possuam adaptações morfológicas, fisiológicas e ecológicas específicas. Por isso, os manguezais apresentam estruturação relativamente simples e baixa diversidade de espécies, quando comparada com outras florestas tropicais (KATHIRESAN, 2008). Nos manguezais brasileiros há ocorrência de quatro espécies (*Rhizophora mangle* L. – Rhizophoraceae, *Avicennia schaeuriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke e *Avicennia germinans* (L.) Stearn – Acanthaceae, e *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn. – Combretaceae) e outros gêneros associados como *Conocarpus* (Combretaceae), *Hibiscus* (Malvaceae) e *Spartina* (Poaceae) (MATNI et al., 2006; BERNINI; REZENDE, 2010).

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

3.1.3 *Conocarpus erectus*

Conocarpus erectus L. é uma árvore perene da família Combretaceae, crescente em linhas costeiras das regiões tropicais e subtropicais em torno do mundo, abundante na paisagem dos manguezais. Conhecido popularmente como mangue de botão é uma árvore de 6 m de altura com coroa de espalhamento, casca cinzenta ou castanha, folhas verdes e flores esverdeadas em densas cabeças, semelhantes a cone em panículas terminais (Figura 2) (ABDEL-HAMEED et al., 2012).



Fonte: Próprio Autor

Figura 2: Partes da planta *Conocarpus erectus* L. **A.** Flores e frutos. **B.** Folhas. **C.** Caule.

Esta espécie é considerada como um mangue associado, pois, ao contrário das outras espécies de mangue, pode crescer fora dos manguezais e não possui adaptações específicas ao ambiente de mangue como raízes aéreas e viviparidade (NETTEL et al., 2008). *C. erectus* é capaz de tolerar o calor extremo do deserto onde as temperaturas do verão podem alcançar 47°C e crescer em solo de fertilidade muito baixa. Possui crescimento razoavelmente rápido, e pode sobreviver aos níveis elevados da salinidade. É plantada extensamente como uma planta ornamental e cultivadas como bonsai (AL-HUMAIID; MOFTAH, 2007).

Pode ser encontrada no litoral meridional da Flórida, Bahamas, Índias Ocidentais, México, América Central e Ilhas Galápagos. Na América do Sul se desenvolve do Equador até o Brasil. Também é nativa das áreas litorâneas da África Ocidental. No Brasil foi registrada nas áreas litorâneas do Pará até o litoral norte do Paraná (LINSINGEN et al., 2009).

Esta espécie é utilizada como remédio popular na anemia, catarro, conjuntivite, gonorréia, diabetes, diarreia, febre, dor de cabeça, sangramento, tumores, orquite,

conjuntivite, inchaços e sífilis (ABDEL-HAMEED et al., 2012; AYOUB, 2010, SHOHAYEB et al., 2013). As folhas são comidas, ou sua decocção bebida para a febre (IRVINE, 1961). A casca e os frutos desta espécie são utilizados na forma de chá no tratamento de diarreia, feridas, hemorróidas e diabetes. A madeira é utilizada para construção de cercas, tornearia, construção de barcos, lenha e paisagismo (CARNEIRO et al., 2010).

Estudos científicos, acerca das propriedades farmacológicas do *C. erectus*, comprovam suas propriedades antioxidante, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica e hepatoprotetora (RAZA et al., 2016; SILVA, 2004; ABDEL-HAMEED et al., 2012, 2013; SHOHAYEB et al., 2013; ABDEL-HAMEED et al., 2014). Também foi sugerido que as frações de extratos desta planta poderiam ser uma fonte potente de agente terapêutico na prevenção ou retardamento do processo de envelhecimento e idade associados à oxidação, estresse e doenças degenerativas relacionadas (AYOUB, 2010). A avaliação toxicológica do extrato aquoso de *Conocarpus erectus* L. em ratos albinos suíços classifica o extrato de baixa toxicidade com DL₅₀ estimada em 2.000 mg / kg de peso corporal (NASCIMENTO et al., 2016). A administração do extrato metanólico desta planta não apresentou toxicidade em camundongos albinos suíços após 24 horas de tratamento (ABDEL-HAMEED et al., 2013).

A análise por CLAE de extratos de acetato de etilo e n-butanol de folhas, caule, flores e frutos de *C. erectus* revelou a presença de ácido gálico (1), Catequina (2), apigenina (3), quercetina (4), quercetina-3-O-glucosido (5), kaemferol-3-O-glucosido (6), Rutina (7) e quercetina-3-O- glucosídeo-6-O-gálico (8) (ABDEL-HAMEED et al., 2012). *Conocarpus erectus* também contém conocarpol e 2'-methoxyconocarpol, lignana do tipo simples 1,4-diarylbutane e conocarpan uma lignana do tipo dehydrodi-isoeugenol (HAYASHI; THOMSON, 1975). Ácido elágico (10), vescalagina (11)/castalagina (12) e di- (hexa-hidroxi Difenilo) Isômero de galloyl hexose foram identificados no extrato metanólico desengordurado de frutos de *C. erectus* (ABDEL-HAMEED et al., 2014). Glicósido trimetoxi-elágico (4-O-β-glucupiranuronido de 3,3 ', 4'-triO-metilellágico) foi isolado das folhas de *Conocarpus erectus* L, este composto mostrou efeito inibitório contra o ataque de espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico (AYOUB, 2010).

3.1.4 Citotoxicidade

A Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, sob condições específicas de exposição. Portanto, investiga experimentalmente a ocorrência, a natureza, a incidência, os mecanismos e os fatores de risco dos efeitos deletérios de agentes químicos. (OGA et al., 2008). Um modelo de avaliação de toxicidade que vem ganhando força entre os pesquisadores é a citotoxicidade. Tal modelo utiliza-se de células de mamífero e avalia os danos causados a célula, a formação ou não de colônias celulares e a viabilidade celular. O uso de culturas de células tem se tornado um modelo muito apreciado, pois são reprodutíveis, sensíveis e rápidos (BEDNARCZUK et al., 2010).

Citotoxicidade significa causar efeito tóxico a nível celular. O efeito tóxico pode ser morte celular, alterações na permeabilidade da membrana, inibição enzimática, etc. É uma avaliação que utiliza cultura celular e que pode ser medida quantitativamente pela lise das células (morte celular), inibição de crescimento celular e outros efeitos causados nas células pelos dispositivos, materiais e/ou seus extratos (ROGERO et al., 2006).

O desenvolvimento dos testes de citotoxicidade “*in vitro*” e seu reconhecimento pelos órgãos internacionais como “Food and Drug Administration”, em 1993 e “Organization for Economic Cooperation and Development”, em 1987 tem favorecido a substituição dos ensaios que utilizam animais de laboratórios (CRUZ, 1998). Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO et al., 2003).

Williams (2008) diz que a utilização de células em cultura é preferida pela homogeneidade das amostras e a facilidade de uma padronização, uma vez que é possível o controle de fatores tais como: pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂. Os métodos de cultura celular *in vitro* têm diversas vantagens quando comparados com testes *in vivo*; eles são mais reproduzíveis, mais rápidos e mais fáceis de serem realizados. Porém, algumas desvantagens devem ser consideradas para este método de estudo, entre elas a necessidade de se trabalhar em ambiente estéril e asséptico (ARAÚJO, 2015). Portanto, existe uma demanda crescente por ensaios *in vitro* para rastreio de drogas e melhorias destes ensaios

a fim de reduzir significativamente o custo e o tempo de lançamento de novas terapias (ZANG et al., 2016)

A citotoxicidade pode ser determinada medindo os efeitos na viabilidade celular utilizando citometria de fluxo para detectar e quantificar células apoptóticas e necróticas com Anexina V. A superfície das células saudáveis é composta de lipídios que são distribuídos assimetricamente no folheto interno e externo da membrana plasmática. Um destes lipídios, fosfatidilserina (PS), é normalmente restrito ao folheto interno da membrana plasmática e é, portanto, apenas exposto ao citoplasma celular. No entanto, durante a apoptose, a assimetria lipídica é perdida e a PS fica exposta no folheto externo da membrana plasmática. Anexina V, marcada fluorescentemente, liga-se a PS; portanto, a Anexina V pode ser utilizada para detectar PS que é exposta no exterior de células apoptóticas. A Anexina V pode também marcar células necróticas porque estas células têm membranas rompidas que permitem que a Anexina V acesse toda a membrana plasmática. No entanto, as células apoptóticas podem ser distinguidas das células necróticas por co-coloração com iodeto de propídio (PI) o qual entra em células necróticas, e liga-se ao DNA (CROWLEY et al., 2016).

3.1.5 Resposta imune

A proteção imunológica é um mecanismo de defesa notavelmente equilibrado para proteger o hospedeiro de ameaças ambientais e patógenos sem desencadear respostas aberrantes a auto-antígenos (MANGINO et al., 2016). Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares de ocorrência em microrganismos, mas que não ocorrem na espécie humana. Moléculas tais como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos, comumente encontradas na superfície de microrganismos, constituem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) (CRUVINEL et al., 2010).

A função imunológica tem sido conceitualmente dividida em imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). Por sua

vez o sistema imune adaptativo explora a diversidade de receptores codificados na superfície de células B e T para reconhecer patógenos desconhecidos e proteger o organismo hospedeiro de infecções (CALLAN JR. et al., 2016).

O passo inicial para a eliminação do patógeno envolve componentes do sistema imune inato, tais como células fagocíticas, células NK (natural killer), produção de citocinas e quimiocinas. Desta forma, após a invasão do patógeno, células fagocíticas, principalmente neutrófilos e macrófagos, são recrutados para o sítio de replicação bacteriana por meio de quimiocinas (IL-8, MCP-1) e citocinas pró-inflamatória (IL-1, IL-6, TNF- α). Na tentativa de eliminar as bactérias intracelulares, macrófagos e neutrófilos ativados produzem uma variedade de mediadores bioquímicos que atuam diretamente contra as bactérias, dentre eles, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e o óxido nítrico (NO), são os mais eficazes (LE-BARILLEC et al., 2005). A ativação das células NK resulta na produção de IFN- γ , principal citocina envolvida na ativação de macrófagos, promovendo, assim, a morte das bactérias capturadas. Além disso, a estimulação dos macrófagos pelo IFN- γ resulta na produção de TNF- α , o qual juntamente com IFN- γ contribui com a atividade antibacteriana dessas células (CASTELO et al., 2009).

O sistema inato e o sistema adaptativo trabalham juntos, sendo que após a migração dos leucócitos para o lugar infectado e a execução da fagocitose de microrganismos, os macrófagos digerem os mesmos e transportam para a superfície algumas de suas partículas (antígenos), que serão reconhecidas pelos linfócitos dando continuidade à resposta imune (BASTOS, 2016).

Existem dois tipos principais de linfócitos que agem no sistema adaptativo, os linfócitos B e os linfócitos T. Os linfócitos B são responsáveis pela produção e secreção dos anticorpos, e os linfócitos T apresentam diferentes funções de acordo com a classe a qual pertencem. Classicamente os dois principais subtipos de linfócitos T são os auxiliares (Th) e os citotóxicos, CD4 ou CD8, respectivamente (WYKES et al., 2017). Os linfócitos T CD4 (Th) são responsáveis por orquestrar outras células da resposta imune na erradicação de patógenos e são também muito importantes na ativação dos linfócitos B, macrófagos ou mesmo linfócitos T CD8. Os linfócitos T CD8 estão envolvidos principalmente nas respostas antivirais e possuem também atividade antitumoral (JÚNIOR et al., 2010).

As células Th são subdivididas, funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem, em Th0, Th1, Th2 e Th17. As citocinas são componentes chave na comunicação

entre as células, são responsáveis pela diferenciação, proliferação e sobrevivência das células linfóides, desempenhando um importante papel nas respostas imunes e inflamatórias (NUNES et al., 2017). As células Th1 produzem grandes quantidades de IL-2, que induzem proliferação de linfócitos T (incluindo as próprias células T CD4 de maneira autócrina). A IL-2 também induz a proliferação e aumenta a capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8. Outra citocina produzida em grandes quantidades pelas células Th1 é o INF- γ , importante na ativação de macrófagos infectados com patógenos intracelulares. O INF- γ apresenta também um papel relevante na ativação de linfócitos T CD8 (ARAÚJO et al., 2008).

A segunda população Th, muito importante nas respostas imunes é o Th2, que produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, favorecendo a produção de anticorpos (PARKIN; COHEN, 2001). As respostas Th2 estão associadas com as doenças alérgicas e infecções por helmintos, uma vez que a IL-4 induz a troca de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B para IgE e a IL-5 induz a produção e ativação de eosinófilos. De forma análoga ao INF- γ , a IL-4 também promove retroalimentação positiva para a via Th2 e suprime a via Th1 (JÚNIOR et al., 2010).

A atividade imunomoduladora de extratos de diferentes plantas, utilizadas na medicina complementar e alternativa, tem sido amplamente explorado. Os extratos metanólicos de folhas, casca e polpa de frutas de *Adansonia digitata* L. produzem aumentos significativos na hipersensibilidade tardia, produção de anticorpos e no índice fagocitário, indicando atividades imunoestimulantes em animais experimentais (SHARMA; RANGARI, 2016).

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

Chandran e Patwardhan (2016), por sua vez, relatam o potencial da *Withania Somnifera* em modular 15 vias do sistema imunológico, como a via de sinalização de quimiocina, sistema complemento e cascatas de coagulação, ativação plaquetária, processamento e apresentação de antígenos, caminho de sinalização do receptor de células T, via de sinalização do receptor de células B, entre outros.

3.1.6 Atividade antibacteriana

Após a revolução na "era dourada", quando quase todos os grupos de antibióticos importantes (tetraciclina, cefalosporinas, aminoglicosídeos e macrólidos) foram descobertos e os principais problemas da quimioterapia foram resolvidos na década de 1960, a história se repete hoje em dia e estes compostos excitantes correm perigo de perda de eficácia devido ao aumento da resistência microbiana (BALOUIRI et al., 2016). Atualmente, seu impacto é considerável com falhas de tratamento associadas a bactérias multi-resistentes e tornou-se uma preocupação global para a saúde pública (MARTIN et al., 2015)

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno natural resultante da pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos, mas que tem sofrido uma expansão muito acelerada devido à utilização inadequada destes fármacos, existindo uma correlação muito clara entre um maior consumo de antibióticos e níveis mais elevados de resistência microbiana (DUARTE, 2006). Com o surgimento crescente de organismos multirresistentes, é necessário avaliar a susceptibilidade dos patógenos a novos antimicrobianos para gerar antibiogramas locais para tomada de decisão do formulário hospitalar e otimizar a gestão antimicrobiana (AMBLER et al., 2016). Dantas et al. (2015) demonstraram que 70% a 100% das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* envolvem amostras resistentes e multirresistentes. Bactérias antes sensíveis aos antibióticos usados na rotina clínica estão se tornando cada vez mais resistentes, fato que tem motivado o interesse de vários pesquisadores na prospecção de novas substâncias com propriedades antimicrobianas.

Baquero e Blázquez (1997) relataram o perigo do retorno a uma era pré-antibiótica, particularmente considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas.

Diferentes partes de plantas que foram utilizadas como remédios de ervas no passado acabaram por ser boas fontes de antibióticos no mundo moderno (MUTUA et al., 2016). Até a presente data, várias espécies de plantas tradicionalmente utilizadas foram selecionadas por suas bioatividades, sendo que a maior parte destas apresenta uma atividade antimicrobiana promissora. Várias evidências científicas para o desenvolvimento de produtos

antimicrobianos a partir de plantas levaram a patentes bem-sucedidas (GHUMAN et al., 2016).

Em particular, a atividade antimicrobiana dos óleos vegetais e dos extratos constituiu a base de muitas aplicações, incluindo a conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (HAMMER et al., 1999). Os produtos naturais ainda são uma das principais fontes de novas moléculas de drogas hoje. Plantas e outras fontes naturais podem fornecer uma enorme variedade de compostos complexos e estruturalmente diversos (BALOUIRI et al., 2016). Recentemente, muitos pesquisadores se concentraram na investigação de extratos vegetais e microbianos, óleos essenciais, metabólitos secundários puros e novas moléculas sintetizadas como potenciais agentes antimicrobianos (NAZZARO et al., 2013).

3.2 JUSTIFICATIVA

O Brasil detém uma grande parte da biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural, representa uma gama de valiosos conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração. Ao longo das últimas duas décadas, a descoberta de drogas tem testemunhado avanços sem precedentes com a utilização de produtos naturais. Mesmo quando produtos naturais bioativos são identificados com propriedades farmacológicas sem a potência ideal para o desenvolvimento de novos medicamentos, suas estruturas químicas podem ser utilizadas como modelos valiosos para a concepção de novos análogos com otimizadas propriedades biológicas.

Em revisão de literatura, observou-se que poucos estudos foram realizados acerca das propriedades farmacológicas do *Conocarpus erectus* L. Diante do exposto, este trabalho nos trará informações a respeito de propriedades bioativas do *Conocarpus erectus*, uma espécie utilizada popularmente no tratamento de diversas doenças, estabelecendo se este é capaz de ativar células imunológicas a realizar seus mecanismos efetores sem induzir morte celular, bem como se o mesmo apresenta atividade citotóxica sobre linfócitos humanos e atividade antimicrobiana.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo geral

Investigar as atividades antibacteriana, citotóxica e imunomodulatória do extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus*.

3.3.2 Objetivos específicos

- Realizar análise cromatográfica do extrato aquoso de folhas de *C. erectus*;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato em bactérias Gram-positivas e negativas multiresistentes isoladas de feridas;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato em linfócitos humanos;
- Avaliar o extrato aquoso de folhas de *C. erectus* quanto à capacidade de ativar linfócitos de sangue periférico humano (PBMCs) através da quantificação da produção das citocinas, liberação de óxido nítrico (NO) e ativação e proliferação dos subconjuntos de linfócitos T.

4 MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo pré-clínico *in vitro* sobre atividades citotóxica, imunomodulatória e antibacteriana do EAFCe em células humanas e bactérias Gram-positivas e negativas multiresistentes isoladas de feridas.

4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

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

4.3 CASUÍSTICA

4.3.1 Critérios de inclusão

Células viáveis isoladas de sangue periférico de humanos voluntários e culturas de bactérias Gram positivas e negativas não contaminadas.

4.3.2 Critérios de exclusão

Células isoladas de sangue periférico de humanos portadores de doenças infecciosas e tumorais e cultura de células e bactérias contaminadas.

4.3.3 Amostra

As células foram selecionadas por conveniência, obtidas a partir de aproximadamente 4 mL de sangue periférico humano de 6 voluntários adultos (23 a 38 anos), saudáveis, de ambos os sexos, não fumantes, sem infecções ativas nos últimos três meses, imunossupressão e / ou doença auto-imune.

4.4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

4.4.1 Material Botânico

As folhas de *Conocarpus erectus* L. foram coletadas em estágio adulto no período de floração (março de 2015) no manguezal da cidade de Itamaracá, distrito de Vila Velha, no estado de Pernambuco, com 7 ° 40 'de latitude sul e 34 ° 50' longitude oeste, sendo selecionado folhas verdes, aparência vistosa, visualmente intacta, livre de danos mecânicos, pragas, doenças ou cor alterada. Uma exsicata foi identificada por Marlene Barbosa e depositada no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob número UFP: 75.457. A coleta foi autorizada pela Companhia Pernambucana de Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos sob autorização CA DFRB N. 120/2014 (anexo B).

4.4.2 Extração de folhas de *Conocarpus erectus* L.

O extrato foi preparado por infusão a partir de 250 g de folhas frescas de *C. erectus* L. O material foi pesado, moído e a infusão foi realizada por adição de água destilada a 40 ° C durante 30 minutos. O extrato aquoso foi liofilizado e armazenado a 5° C. O rendimento da extração foi de 1,38%.

4.4.3 Análise cromatográfica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

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

Tabela 1. Sistemas de eluição de metabolitos utilizados para triagem fitoquímica do EAFCe.

Classe de metabolitos secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonoides e fenilpropano-glicosídeos	Quercetina, Rutina e Ácido clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt, 1996 Brasseur & Angenot, 1986
Triterpenos e esteroides	β-sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Saponinas	-	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Mono e sesquiterpenos	Timol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e Lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner & Bladt, 1996
Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidinas condensadas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts et al., 1957
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	n-BuOH-H ₂ O-AcOH (40:50:10 v/v)	Alúmen de ferro 1%	Stiasny, 1912

4.4.4 Análise cromatográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O EAFCe foi analisado por CLAE (1200 Infinity Series, Agilent) equipado com bomba quaternária, amostrador automático, forno de coluna e detector de matriz de diodos. A separação foi realizada numa coluna RP 18 (Zorbax SB-C18, Agilent, 4,6 x 250 mm, 5 µm). A amostra (5 µL) foi sujeita ao seguinte gradiente linear a um fluxo de 2,4 mL / min e 30 ° C (A: ácido acético a 0,3% em água, B: Acetonitrila): 98% A (0 min) - 90% A (10 min) - 15% A (27 min).

4.4.5 Antibacteriano

4.4.5.1 Meios de cultura

No teste de difusão em disco de papel foram utilizados os meios Ágar Mueller Hinton para bactérias. Para avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB), o meio de cultura utilizado foi Müller Hinton (MH) em caldo e em Ágar, respectivamente.

4.4.5.2 Microrganismos teste

Foram utilizados cinco isolados clínicos: três de *Staphylococcus aureus* e dois de *Pseudomonas aeruginosa* todos provenientes de secreções purulentas (feridas) e obtidos da Coleção de Micro-organismo do Departamento de Antibióticos da UFPE (tabela 2). Micro-organismos que apresentam resistência a dois ou mais grupos de antimicrobianos são considerados multirresistentes (TEIXEIRA et al., 2004).

Tabela 2 - Micro-organismos escolhidos para o ensaio antimicrobiano

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

* Número de identificação da cepa da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

4.4.5.3 Padronização do Inóculo

As suspensões bacterianas foram padronizadas de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 108 UFC/mL (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

4.4.5.4 Teste de difusão em Disco de Papel

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

4.4.5.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do EAFCe

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

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

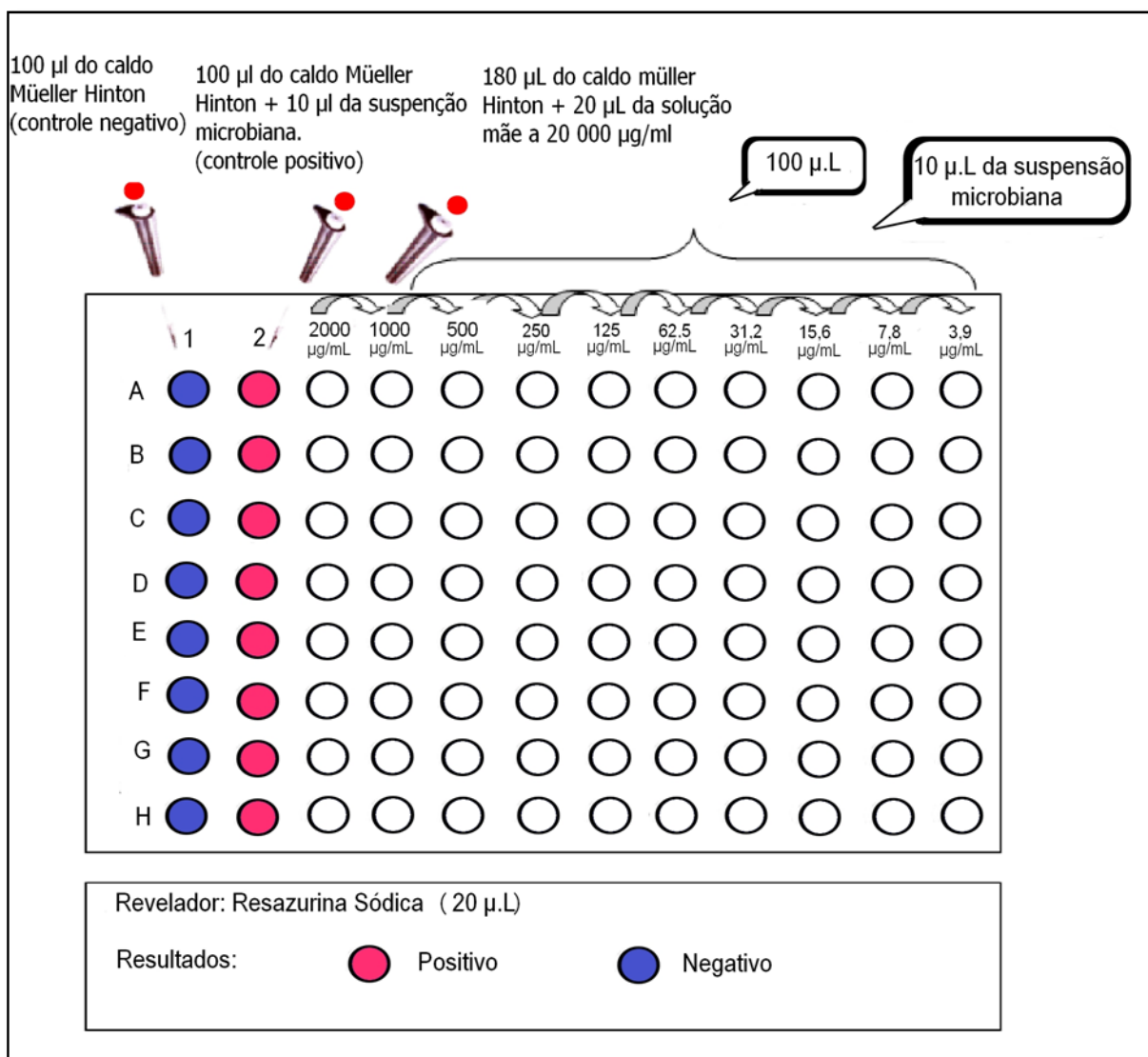


Figura 3: Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

O valor de CMI foi determinado na concentração do último poço onde não houve turbidez visível. A partir deste poço foram feitos semeios por esgotamento em placas com meio Agar Müller Hinton, para estabelecer a CMB, que será a concentração onde não houver crescimento de colônias. Toda a análise foi feita em triplicata (CLSI, 2015).

4.4.6 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Foram recolhidos 4 ml de sangue de 6 doadores voluntários em tubos de heparina (Vacuette) para obter as PBMCs através de uma técnica de gradiente de concentração (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare Life Sciences, Suécia). As células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e após centrifugação (400 g, 30 min, 20°C), obteve-se um anel de PBMC, recolheu-se e contou-se as células numa câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripam (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram utilizadas apenas quando a viabilidade foi > 98%. As amostras foram coletadas após aprovação de todos os voluntários do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (UFPE, Brasil nº 1.870.360 / 2016) (anexo C).

4.4.7 Cultura de linfócitos e estimulação in vitro com EAFCe

Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com soro bovino fetal a 10% (p / v) (Sigma-Aldrich, EUA) em placas de 24 poços (TPP Techno Plastic Products, Suíça) a uma densidade de 106 Células / poço. Utilizaram-se culturas de sobrenadantes de linfócitos em ensaios para avaliar a viabilidade celular, produção de citocinas, libertação de óxido nítrico e activação de CD4⁺ e CD8⁺. Todas as culturas foram tratadas com 50, 25, 12,5 e 6 µg / mL de EAFCe e permaneceram com este estímulo por 24h em ensaios para análise de viabilidade celular. Os controlos foram realizados utilizando células não tratadas em meio de cultura.

4.4.8 Análise da viabilidade celular

Linfócitos tratados com EAFCe passaram 24 horas de incubação bem como células não tratadas e foram centrifugados a 450 g e 4 ° C durante 10 min. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de PBS 1X ao precipitado e após ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (450 g, 4°C, 10 min). O sedimento foi ressuspensado em 300 µL de tampão de ligação (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM), transferido para um tubo citométrico marcado e anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1: 500) e iodeto de propídio (PI, 20 µg / mL). A citometria de fluxo foi realizada em uma plataforma FACSCalibur (BD Biosciences, San

Jose, EUA) e os resultados foram analisados usando o software CellQuest Pro (BD Biosciences). As células anexos-FITC negativo / PI positivo foram consideradas como necróticas e as células Anexina-FITC positivas / PI negativas foram consideradas na fase inicial da apoptose. Os negativos duplos foram considerados células viáveis.

4.4.9 Medição da produção de citocinas e quimiocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)

Os sobrenadantes das culturas tratadas com EAFCe durante 24 h, assim como as células não tratadas, foram recolhidos para a medição de citocinas, quimiocinas e ensaios de óxido nítrico. A avaliação das citocinas foi realizada utilizando a citocina Th1 / Th2 humana II (Becton Dickinson Biosciences, EUA) para a detecção simultânea das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ). As quimiocinas foram avaliadas utilizando o kit O Kit BD TM CBA de Quimiocinas Humanas para medir quantitativamente a interleucina-8 (CXCL8 / IL-8), a RANTES (CCL5 / RANTES), a monocina induzida pelo interferon- γ (CXCL9 / MIG) Proteína quimioatratante-1 (CCL2 / MCP-1) e proteína-10 induzida por interferon- γ (CXCL10 / IP-10). A medição de citocinas e quimiocinas baseou-se no princípio da tecnologia Cytometric bead array (CBA) e todos os dados foram adquiridos na plataforma FACSCalibur. A CBA utiliza micropartículas ou esferas marcadas com intensidade de fluorescência discreta. As pérolas de captura foram marcadas com alo ficocianina e foram lidas a 650 nm. O anticorpo de detecção específico para citocinas e quimiocinas foi marcado com fluorocromo de ficoeritrina que emite a 585 nm em parâmetros amarelos. A intensidade de fluorescência do parâmetro amarelo é proporcional à quantidade de citocina e quimiocina presente nas amostras de teste. Resumidamente, amostras de teste (50 μ L) e anticorpo de detecção de ficoeritrina foram incubadas com o reagente de pérola de captura durante 3 h no escuro à temperatura ambiente. Todos os anticorpos não ligados foram lavados (1,0 mL de tampão de lavagem kit) e ressuspenso em 300 μ L de tampão de fixação (kit) antes da aquisição de dados na plataforma FACSCalibur. Cada citocina e quimiocina tinha um pico único e bem separado e seis curvas padrão de citocina e quimiocina individuais (0-5000 pg / mL) foram executadas em cada ensaio. A gama de detecção foi entre 3000 pg / mL e 5000 pg / mL de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.10 Análise *in vitro* de nitritos

Os sobrenadantes de culturas de células incubadas ou não com EAFCe a 12,5 µg / mL durante 24 h foram utilizados para análise de nitrito pelo método colorimétrico de Griess (DING et al., 1988). A concentração de óxido nítrico (NO) foi estimada usando uma curva padrão (3,12-100 µmol / mL). A leitura foi realizada num espectrofotômetro (Bio-Rad 3550, Hercules, CA) a 595 nm.

4.4.11 Ensaio de imunofenotipagem de linfócitos

Os linfócitos e monócitos presentes nas PBMC foram cultivados em placas de 24 poços (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), com uma densidade de 10⁶ células / poço, na presença e ausência de EAFCe a 12,5 µg / mL e RPMI. Após este tempo de incubação, as células foram removidas das placas utilizando PBS-Wash 1% gelado e inseridas em tubos de polipropileno de 15 mL (BD Biosciences) com 6 mL de PBS-Wash para centrifugação (400 x g durante 10 min). Após descartar o sobrenadante, as células foram lavadas com 2 mL de PBS-Wash e centrifugadas (400 x g durante 5 min). O sobrenadante foi descartado e os anticorpos monoclonais de superfície foram adicionados a tubos e incubados durante 30 minutos. Após este tempo, realizaram-se duas etapas de lavagem com 1 mL de PBS-Wash seguido de centrifugação (400 x g durante 5 min). Os sobrenadantes foram rejeitados e as células foram fixadas durante 15 minutos com 150 µL de solução de Cytofix (BD Biosciences). As células foram lavadas com 2 mL de PBS-Wash seguido de centrifugação (400 x g durante 5 min). Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 300 µL de PBS-Wash a cada tubo, o qual foi carregado na plataforma FACSCalibur. Os anticorpos monoclonais utilizados neste ensaio foram anti-CD4-PerCP, anti-CD8-FITC, anti-CD-28-PE e anti-CTLA-4-APC (BD Biosciences).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Brazil nº 1.870.360/2016; CAAE 62119716.5.0000.5208) (Anexo C) e os indivíduos foram esclarecidos quanto aos procedimentos necessários para a participação do estudo. Todos os procedimentos relacionados ao estudo foram iniciados apenas após o esclarecimento do paciente e sua autorização, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS

5.1.1 Prospeção fitoquímica do extrato aquoso de folhas de *C. erectus* por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE

O perfil qualitativo do EAFCe foi obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A tabela 2 mostra as classes de compostos secundários analisados de acordo com a presença (fraca, média e forte) ou ausência no extrato. A CCD mostrou a presença de: 3',4'-OH Flavonóide (fraco), Fenilpropanoglicosídeos (fraco), Saponinas (médio), Proantocianidinas poliméricas (médio) e Taninos hidrolisáveis (médio) e ausência de: Triterpenos, Esteróides, Monoterpenos e sesquiterpenos, Alcalóides, Cumarinas e Quinonas.

Tabela 3. Análise fitoquímica do extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus*.

Classe de metabólitos secundários	Extrato aquoso de folhas de <i>Conocarpus erectus</i> L.
Flavonóides	+ ¹
Fenilpropanoglicosídeos	+
Triterpenos	-
Esteróides	-
Saponinas	++
Monoterpenos e sesquiterpenos	-
Alcalóides	-
Cumarinas	-
Quinonas	-
Proantocianidinas e Leucoantocianidinas	++ ²
Taninos hidrolisáveis	++

Nota: (-) ausente; (+) fraco; (++) médio; (+++) forte; ¹3',4'-OH Flavonóides;

²Proantocianidinas poliméricas.

A figura 4 representa o cromatograma de pico de base (BPC) da CLAE, mostrando regiões de um cromatograma representativo de compostos com intensidade de absorbância de 256 nm. Os principais compostos da EAFCe foram caracterizados com base no seu tempo de

retenção e dados espectrométricos comparados com os padrões disponíveis. Os principais compostos identificados na EAFCe não têm semelhanças com os padrões disponíveis.

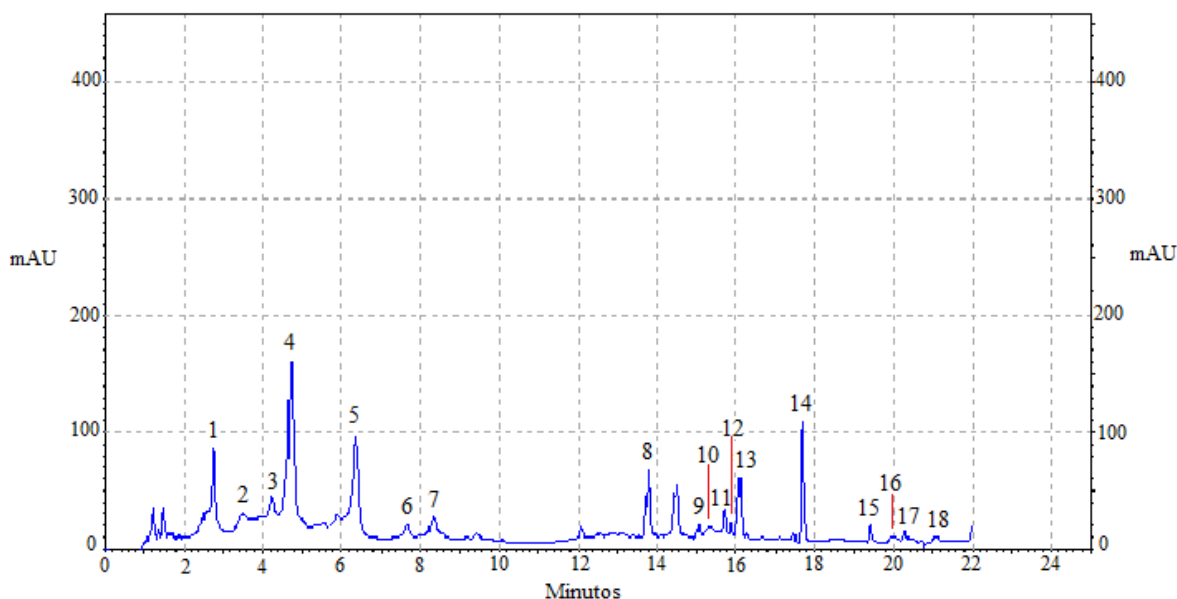


Figura 4: Cromatograma dos principais compostos identificados no EAFCe pelo tempo de retenção em minutos à 256nm: (1) 2,753; (2) 3,487; (3) 4,240; (4) 4,727; (5) 6,367; (6) 7,660; (7) 8,347; (8) 13,820; (9) 15,093; (10) 15,353; (11) 17,727; (12) 15,900; (13) 16,107; (14) 17,693; (15) 19,433; (16) 19,987; (17) 20,300; (18) 21,093.

5.1.2 Avaliação antibacteriana

5.1.2.1 Teste de difusão em disco de papel do EAFCe

O EAFCe apresentou atividade antimicrobiana principalmente para as bactérias gram-positivas, *S. aureus*, não sendo observada atividade sobre as cepas Gram-negativas de *P. aeruginosa* (tabela 4). Segundo Estevam et al. (2009), são considerados ativos os extratos de plantas que formaram zonas de inibição ≥ 10 mm.

Tabela 4 – Valores dos halos de inibição para EAFCe

Cepas	Micro-organismos									
	261		262		679		700		719	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
EAFCe (mm)	0	0	0	0	10,66	0,57	13,66	0,57	14,66	0,57

Nota: M: média; DP: Desvio padrão.

5.1.2.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB) do EAFCe

Na avaliação da CMI e CMB, os valores encontrados variaram de 250 a >2000 µg/mL para a CMI e >2000 µg/mL para CMB frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os resultados estão representados na tabela 5.

O EAFCe atuou em 20% das cepas 719, 679 e 700 de *S. aureus* com CMI nas concentrações 250, 500 e 1000 µg/mL respectivamente e 40% sobre as cepas 261e 262 de *P. aeruginosa* na concentração >2000 µg/mL. A CMB ficou em 100% na concentração >2000 µg/mL para todas as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Segundo Holetz et al. (2002) e Regasini et al. (2010), extratos de plantas com atividade antimicrobiana com valores de CMI e CMB entre 100-500 µg/mL possuem atividade moderada, entre 500 e 1000 µg/mL, a atividade é considerada fraca e os extratos de plantas com CMI e CMB em 2000 e >2000 µg/mL são consideradas inativas.

Tabela 5 – Valores de CMI e CMB para EAFCe

Cepas	Micro-organismos									
	261		262		679		700		719	
EAFCe (µg/mL)	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
	>2000	>2000	>2000	>2000	500	>2000	1000	>2000	250	>2000

5.1.3 Citotoxicidade

Inicialmente investigamos a viabilidade celular de linfócitos humanos tratados com EAFCe. O teste de morte celular mostrou que 95% dos linfócitos permaneceram vivos após o tratamento com EAFCe em todas as concentrações analisadas. Nos 5% de células inviáveis, a concentração de 50 µg / mL do EAFCe induziu necrose mais elevada e a concentração de 25 µg / mL do EAFCe induziu apoptose e necrose em valores mais elevados em relação ao controle. Os valores apoptóticos e necróticos encontrados nas concentrações de 12,5 e 6 ug / mL para as células tratadas com EAFCe não foram estatisticamente significativos em relação controle (células + meio) (Figura 2).

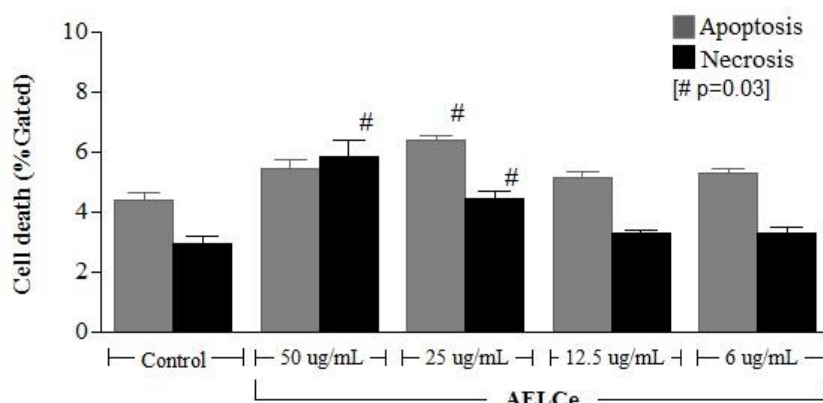


Figura 5: Viabilidade celular de linfócitos humanos tratados com EAFCE em diferentes concentrações. As células tratadas com EAFCE permaneceram vivas (95%) em 24 horas de incubação. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicata.

Consideramos a concentração de 12,5 ug / mL a concentração ideal para realizar os testes imunológicos, levando em consideração uma concentração que não induziu morte celular significativa e que possa conter imunogenicidade.

5.1.4 Produção de quimiocinas e citocinas

EAFCE não estimulou a produção de quimiocinas e os resultados da produção de citocinas mostraram que IL-4, IL-6 e IL-17 não foram produzidos por células tratadas com o EAFCE. Por outro lado, linfócitos tratados com EAFCE a 12,5 µg / mL tiveram em relação ao controle maior e significativa produção de TNF- α (Figura 6), IL-2 (Figura 7), IL-10 (Figura 8) e IFN- γ (Figura 9A). Além disso, os linfócitos tratados com EAFCE também liberaram óxido nítrico (Figura 9B).

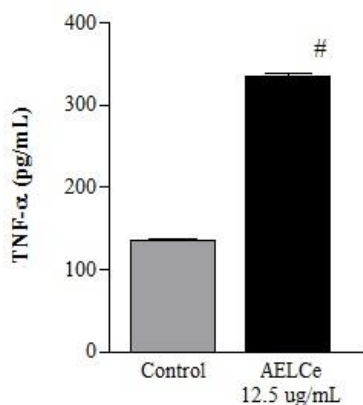


Figura 6: Perfil da produção de TNF- α promovido por EAFCe em culturas de linfócitos humanos em 24 horas de ensaio. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicata. # P = 0,03

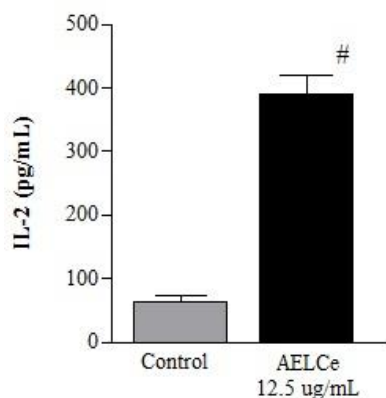


Figura 7: Perfil da produção de citocinas IL-2 promovida por EAFCe em linfócitos humanos em 24 horas de ensaio. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicata. #P<0,03.

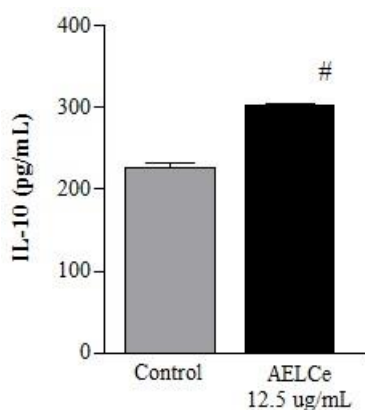


Figura 8: Perfil da produção de citocinas IL-10 promovida por EAFce em linfócitos humanos em 24 horas de ensaio. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicata. [#]P <0,02.

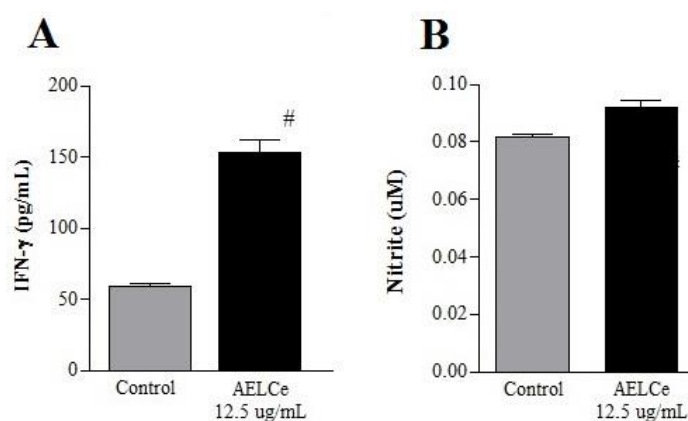


Figura 9: Produção de IFN- γ (A) e liberação de NO (B) promovida por EAFce em culturas de linfócitos humanos em 24 horas de ensaio. As barras horizontais representam a média de seis experiências independentes realizadas em duplicata. [#] P = 0,01.

5.1.5 Proliferação, ativação e inibição de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺

Os ensaios foram realizados para analisar a capacidade do EAFce em induzir proliferação, ativação ou inibição de subunidades de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Os resultados mostraram que EAFce na concentração de 12,5 μ g/mL induziu ativação (Figura 7B) e proliferação (Figura 7A) dos linfócitos T CD8⁺ sem alteração nos subgrupos de linfócitos T CD4⁺ e não inibiu subgrupos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 7C).

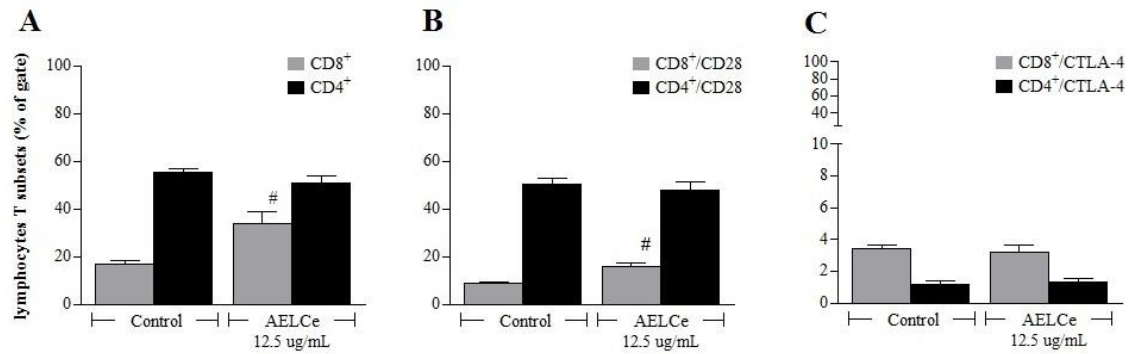


Figura 10: Ensaio de proliferação, ativação e inibição *in vitro* induzidos por EAFCe em subconjuntos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. **A** - A contagem total de linfócitos mostrou que os subgrupos de linfócitos T CD8⁺ apresentam maiores valores em relação às células controle ([#] P = 0,01); **B** - Estudo de ativação mostrou que os subgrupos de linfócitos T CD8⁺ estavam mais ativados do que as células de controle ([#] P = 0,01); **C** - O estudo de inibição mostrou que EAFCe não inibiu ambos os subconjuntos de linfócitos T. As barras horizontais representam a média de seis experiências independentes realizadas em duplicata.

5.2 DISCUSSÃO

5.2.1 Prospecção Fitoquímica

O EAFCe apresentou em sua composição diversas classes de compostos do metabolismo secundário, como 3',4'-OH flavonóide, fenilpropanoglicosídeos, saponinas, proantocianidinas poliméricas e taninos hidrolisáveis. Além disso, a análise realizada através da CLAE identificou dezoito compostos desconhecidos quando comparados aos padrões disponíveis, sendo alguns deles ou a associação deles responsáveis pela atividade biológica deste extrato. De fato, o extrato aquoso apresentou polifenóis entre outros componentes (NASCIMENTO et al., 2016) apoiando a hipótese de que o extrato pode exibir propriedades imunomoduladoras quando avaliadas *in vitro*. A composição fitoquímica e as propriedades farmacológicas de *Conocarpus erectus* têm sido estudadas há muitos anos (IRVINE, 1961; HAYASHI; THONSON, 1975; BASTOS, 1995). A maioria desses estudos tem investigado principalmente suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (RAZA et al., 2016; SHOHAYEB et al., 2013; ABDEL-HAMEED et al., 2014; ABDEL-HAMEED et al., 2012). Os compostos fenólicos, especialmente os taninos, são os principais componentes desta espécie (ABDEL-HAMEED et al., 2012). Estes compostos fenólicos têm sido eficazes em tratamentos que promovem a cicatrização de feridas (OFORI-KWAKYE et al., 2011), possuem muitas atividades biológicas relacionadas à saúde, tais como atividades antimicrobianas e antivirais. (TOHIDI et al., 2016; PAN et al., 2010; CHEN et al., 2016). Há relatos de que taninos agem sobre o metabolismo do ácido araquidônico em leucócitos com papéis importantes nas inflamações (OKUDA, 2005).

5.2.2 Atividade Antimicrobiana

No teste de difusão em disco, o EAFCe mostrou ser eficaz principalmente contra bactéria gram-positiva, *S. aureus*, pelo método de difusão em papel com halos de inibição superiores a 10 mm, conforme considera Estevam et al. (2009) como sendo o valor mínimo para classificar extratos de planta com atividade antimicrobiana.

Shohayeb et al., 2013, estudando extratos alcoólicos de folhas, caule, fruto e flor de *C. erectus* coletados na Arábia Saudita em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, ácido-rápidas e fungos por método de difusão em disco de ágar, também mostraram atividade

antibacteriana para *Staphylococcus aureus* com halo de inibição de 21 mm. Além disso, mostraram atividade antibacteriana para *Bacillus subtilis* (Gram-positiva), *Mycobacterium pheli* ácido-rápido e bactérias Gram-negativas testadas (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa*). Shohayeb et al., 2013 ainda, mostra que taninos purificados de *C. erectus* possui maior atividade contra bactérias em comparação com diferentes extratos e sugere que os taninos são responsáveis em grande parte pela atividade antimicrobiana *C. erectus*. Isto pode ser explicado pelo fato de substâncias tânicas presentes no em extrtos de plantas formarem um complexo enzimático capaz de provocar danos à parede celular e citoplasmática, inviabilizando a troca de íons essenciais para a sobrevivência microbiana (LOGUERCIO et al., 2005; ANDRADE JR et al., 2006).

O EAFCe apresentou CMI de 500 e 250 µg/mL para as cepas 679 e 719 de *S. aureus* respectivamente, apresentando atividade antimicrobiana moderada. A CMB do EAFCe ficou acima de 2000. Segundo Holetz et al. (2002) e Regasini et al. (2010), extratos de plantas com atividade antimicrobiana com valores de CMI e CMB entre 100-500 µg/mL possuem atividade moderada, entre 500 e 1000 µg/mL, a atividade é considerada fraca e os extratos de plantas com CMI e CMB em 2000 e >2000 µg/mL são consideradas inativas.

O extrato metanólico de diferentes partes do *C. erectus* (folha, caule, fruto e flor), fracionado com clorofórmio, acetato de etilo e n-butanol também foi avaliado quanto sua atividade antimicrobiana. A fração de acetato de etila foi a mais potentes entre as outras frações com CIMs de 0,21 mg / mL, 0,33 mg / mL, 0,42 mg / mL e 0,33 mg / mL para *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *M. pheli* respectivamente (ABDEL-HAMEED et al., 2012). Isto é bastante interessante levando em consideração que *P. aeruginosa* e *M. pheli* são conhecidos por serem menos suscetíveis a antimicrobianos incluindo antibióticos, conservantes, anti-sépticos e desinfetantes (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Os isolados clínicos Gram-positivo de *S. aureus* utilizados neste estudo foram multidrogas-resistentes, o que não afetou sua susceptibilidade ao extrato aquoso de folhas de *C. erectus*. Ou seja, sugere-se que os mecanismos de ação dos fitoconstituintes de *C. erectus* são diferentes daqueles dos antibióticos.

S. aureus é um colonizador transitório da pele predominantemente nas regiões úmidas e quentes do corpo, como a virilha, axila e narinas anteriores. Até 60% das pessoas são portadoras intermitentes, enquanto 20% das pessoas podem ser colonizadas de forma estável (PRINCE et al., 2012). Enquanto o transporte normal é assintomático, *S. aureus* pode invadir

tecidos (por exemplo, através de pele quebrada), onde provoca doenças que vão desde o impetigo relativamente menor e a síndrome de pele escaldada até condições que ameaçam a vida, como a septicemia (KRUT et al., 2003). Além disso, a infecção por *S. aureus* é freqüentemente um fenômeno secundário na pele com condições subjacentes como a dermatite atópica (KINTARAK et al., 2004). Neste sentido, é importante que drogas sintéticas e naturais de uso terapêutico na cicatrização de feridas possuam atividade antibacteriana principalmente contra *S. aureus*.

5.2.3 Atividade Citotóxica

Os resultados deste estudo, realizados por citometria, mostraram que o EAFCe não induziu lesão celular em linfócitos humanos na concentração de 12,5 e 6 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Esses resultados são promissores porque, atualmente, os estudos sobre a propriedade biológica promovida por compostos naturais indicam que doses menores devem ser suficientes para induzir atividades imunológicas ou antitumorais (LIU et al., 2010, ZHENG et al., 2016).

Não há relatos na literatura sobre atividade citotóxica do *C. erectus* em células imunológicas. Estudos realizados com plantas pertencentes à mesma família do *C. erectus* (Combretaceae) mostraram que o extrato etanólico de casca de tronco de *Terminalia catappa* L. não apresentou danos nas células quando testado, em concentrações crescentes (5 a 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) contra células RAW 264.7 (ABIODUN et al., 2016) e duas frações de polissacarídeos ácidos isolados de *Combretum Racemosum* também não induziram efeito deletério na viabilidade de células PBMC ou MonoMac-6 quando testadas em concentrações de 10 a 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (SCHEPETKIN et al., 2013). No entanto, Silva et al. (2015) mostraram que um triterpeno chamado lupino isolado de *Combretum leprosum* Mart. apresentou citotoxicidade contra PBMC e pode ser usado somente em concentrações abaixo de 1,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$. A divergência entre estes resultados pode ser explicada pela diferença de técnicas utilizadas nos testes realizados nestes estudos, isto é, ensaio MTS, ensaio de viabilidade de células luminescentes e ensaio MTT, respectivamente.

O uso popular tradicional não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não são diferentes de quaisquer outros xenobióticos sintéticos, e a permissão oficial do uso como drogas deve ser baseada em evidências experimentais (ARGENTA et al., 2011). Sendo assim, a determinação

do teste de citotoxicidade é um importante passo nas investigações toxicológicas de extratos de plantas, constituindo uma das avaliações farmacognósticas preliminares para observar os possíveis efeitos tóxicos do extrato na fisiologia dos organismos, explorando os recursos manipulados pela população para uma perspectiva da produção farmacêutica. Resultados preliminares de nossos estudos em camundongos mostraram que o extrato aquoso de *C. erectus* foi classificado como pertencente à categoria 4 de acordo com o guia Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) com uma toxicidade moderada. A DL_{50} do extrato aquoso de *Conocarpus erectus* L. foi estimada em 500 mg / kg de peso corporal, mostrando um nível de segurança moderado em estudo *in vivo* (NASCIMENTO et al., 2016).

5.2.4 Atividade Imunomodulatória

O subconjunto de linfócitos T $CD8^+$ ativados por EAFCe induziram a proliferação destas células imunes e promoveram a resposta Th1 através da produção elevada de citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ e óxido nítrico em PBMC humanas estimuladas *in vitro*. A IL-10 tem um papel essencial de proteção do hospedeiro contra respostas inflamatórias exageradas a agentes patogênicos, produzidos por células T (PALOMARES et al., 2014). Embora a IL-10 também tenha sido produzida em valores elevados, o estado pró-inflamatório foi prevalente em nossos achados e a presença de IL-10 pode explicar a incapacidade do extrato aquoso de *C. erectus* de estimular a produção de quimiocinas observadas em nossos resultados.

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

Da mesma forma, muitos estudos investigando espécies da família Combretaceae apresentaram ações imunomoduladoras promovidas por diferentes extratos. *Terminalia arjuna* mostrou efeito imunomodulador quando usado como terapia adjuvante na doença arterial coronariana (KAPOOR et al., 2015). Os extratos e pectinas de *Terminalia macroptera* mostraram atividades de fixação do complemento (ZOU et al., 2014, ZOU et al., 2015),

polissacarídeos isolados das folhas de *Combretum racemosum* induziram a produção de interleucina IL-10 e TNF- α em PBMC e MonoMac (SCHEPETKIN et al., 2013) e extrato de *Terminalia chebula* também induziram alterações imunomoduladoras como proliferação de linfócitos do baço e aumento da expressão das citocinas IL-2, TNF- α e IL-10 em ratos wistar machos (AHER; WAHI, 2011).

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

Nossos resultados trata-se dos primeiros a relatos da ação imunomodulatória do *C. erectus* em linfócitos humanos, mais estudos são necessários para esclarecer o potencial terapêutico alternativo desta planta.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que o extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus* L. possui em sua composição substâncias com potenciais propriedades farmacológicas. Além disso, mostrou ser um extrato sem atividade citotóxica, com uma taxa de viabilidade celular de 95% mesmo nas doses mais elevadas do extrato. A atividade imunomodulatória apresentou um perfil Th1 (pro-inflamatório) de acordo com as citocinas produzidas pelos linfócitos humanos através da sua ativação pelo EAFCe. Estes achados mostraram uma dose de segurança do extrato e proporcionaram uma compreensão inicial da resposta imunológica *in vitro* promovida por EAFCe.

O *Conocarpus erectus* L. é uma planta amplamente utilizada na cultura popular para o tratamento de doenças, no entanto, ainda pouco estudada acerca das suas propriedades terapêuticas e seus constituintes químicos. Diante do exposto, este trabalho experimental trouxe informações adicionais a respeito de atividades biológicas desta planta. Efeitos imunológicos produzidos em células humanas pelo extrato aquoso das folhas desta espécie, bem como a atividade antimicrobiana consiste em dados valiosos para a compreensão do uso desta planta para fins terapêuticos. Nossos resultados sugerem que o extrato aquoso de *C. erectus* pode ser eficiente na cicatrização de feridas. Sendo assim, estes resultados contribuem para uma base científica quanto à eficácia da utilização medicamentosa desta planta, que possui o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapias apropriadas.

6.2 CONCLUSÕES

- O extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus* (EAFCe) apresentou em sua composição 3',4'-OH flavonóides, fenilpropanoglicosídeos, saponinas, proantocianidinas, leucoantocianidinas e taninos hidrolisáveis.
- EAFCe apresentou regiões de um cromatograma representativo de compostos com intensidade de absorbância de 256 nm, identificando compostos que não apresentaram semelhanças com os padrões disponíveis.
- O extrato aquoso de folhas de *C. erectus* apresentou atividade antibacteriana principalmente contra bactérias gram-positivas *S. aureus* multiresistentes isoladas de feridas.
- O teste de morte celular mostrou que 95% dos linfócitos permaneceram viáveis após o tratamento com EAFCe em todas as concentrações analisadas.
- EAFCe em concentração de 12,5 ug / mL foi capaz de promover imunomodulação em PBMC humanas através da, ativação e proliferação de subconjuntos de linfócitos T CD8⁺, produção de citocinas de TNF- α , IL-2, IL-10 e IFN- γ e liberação de óxido nítrico.

REFERÊNCIAS

1. ABDEL-HAMEED, E. S.; BAZAID, S.A.; SHOHAYEB, M.M. RP-HPLC–UV–ESI-MS phytochemical analysis of fruits of *Conocarpus erectus* L. *Chemical Papers*. v. 68, n. 10, p. 1358–1367, 2014.
2. ABDEL-HAMEED, E. S.; ABDEL, S. A. B.; SABRA, N. A. Protective effect of *Conocarpus erectus* Extracts on CCl₄-Induced chronic liver injury in mice. *Global Journal of Pharmacology*. v. 7, n. 1, p. 52-60, 2013.
3. ABDEL-HAMEED, E. S.; BAZAID, S. A.; SHOHAYEB, M. M.; EL-SAYED, M. M.; EL-WAKIL, E. A. Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants*. v. 2, n. 2. p. 93-112, 2012.
4. ABIODUN, O.O., NOGALES, A.R., ALGIERI, F., CARAVACA, A.M.G., CARRETERO, A.S., UTRILLA, M.P., CABEZAS, M.E.R., GALVEZ, J. Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and in vivo evidences. *J. of Ethnoph.* v. 192, p. 309-319, 2016.
5. AEJAZUDDIN, Q. M. A. Herbal Medicine: A Comprehensive Review. *International Journal of Pharmaceutical Research*. v. 8, n. 8, p. 1-5, 2016.
6. AHER, V.; WAHI, A. Immunomodulatory activity of alcohol extract of *Terminalia chebula* Retz Combretaceae. *Tropical Journal of Pharmac. Research*. v. 10, n. 5, p. 567-575, 2011.
7. ALONSO, J. R. Tratado de Fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas. ISIS Ediciones S. R. L., Buenos Aires, Argentina, 1998, p. 1039.
8. ALWHAIBI, M.; SAMBAMOORTHY, U. Sex differences in the use of complementary and alternative medicine among adults with multiple chronic conditions. *Hindawi Publishing Corporation*. v. 2016, p. 1-8, 2016.
9. AL-HUMAYD, A. I.; MOFTAH, A. E.; Effects of hydrophilic polymer on the survival of buttonwood seedlings grown under drought stress. *J. of Plant Nutrit.* v. 30, n. 1, p. 53-66, 2007.
10. AMBLER, J. E.; KRAUSE, K. M.; STEENBERGEN, J. N.; OMAN, N. E. S.; MILLER, L. A.; BHAGWAT, S. S.; SERIO, A. W.; CHESNEL, L.; MAHONEY, N. M.; MOTYL, M. R.; CRITCHELY, I. A.; IACONIS, J. P.; STONE, G. G.; ALDER, J.; XERRI, L.; McCURDY, S. P.; VEENHUYZE, D. F.; GROSSMAN, T.; ECHOLS, R. M.; WILLIAMS, G.; BRADFORD, P. A. New Antimicrobial Agents ... but No Susceptibility Tests! *Clin. Infect. Dis.* v. 63, n. 11, p. 1530-1531. 2016.
11. ANDRADE JR, R. G.; GINANI, J. S.; LOPES, G. K. B.; DUTRA, F.; ALONSO, A.; HERMES-LIMA, M. Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochimie, Paris*, v. 88, n. 9, p. 1287-1296, 2006.

12. ARAÚJO, J. A. P.; CASTELAN, T. T. T.; CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, D.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Linfócitos T: da imunobiologia aos imunobiológicos. *Revista Brasileira de Medicina*. v. 1, p. 3-19. 2008.
13. ARAUJO, J. G. Desenvolvimento de creme de *Rhizophora Mangle*: Avaliação do potencial cicatrizante em feridas cutâneas. 2015. 126 f. Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Interna), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
14. ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. *Vivências: Rev. Elet. Exten. da URI*, v.7, n.12, p.51-60, 2011.
15. AYOUB, N. A. A trimethoxyellagic acid glucuronide from *Conocarpus erectus* leaves: Isolation, characterization and assay of antioxidant capacity. *Pharm. Biol.* v. 48, n. 3, p; 328-332, 2010.
16. BAILEY, L.H. *Hortus Third: A Concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada*. New York, MacMillan Collier MacMillan, 1976, p. 306.
17. BALOUIRI, M.; SADIKI, M. IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.
18. BANDEIRA, A. R. G. Estudo fitoquímico e a atividade biológica de *Conocarpus erectus* L. (Mangue Botão). 2003. 92 f. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE. 2003.
19. BAQUERO, F.; BLÁZQUES, J. Evolution of antibiotic resistance. *Trends Ecol Evol*. v. 12, n. 12, p. 482-487. 1997.
20. BARROS, H. M., ESKINNAZI-LEÇA, E., MACEDO, S. J., LIMA, T. Gerenciamento participativo de estuários e manguezais. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2000. 240 p.
21. BARTZ, M. C.; JÚNIOR, J. C. F. M.; LARCHER. L. Variação morfológica de *Laguncularia racemose* (L.) C. F. Gaertn. (Combretaceae) em áreas de manguezal e de transição entre manguezal e floresta de restinga. *Biotemas*. v. 28, n. 1, p. 21-29, 2015.
22. BASTOS, C. R. Alterações No Receptor Crhr1 E Níveis De Il-1 β No Comportamento Suicida. 2016. 77 f. Dissertação (Pós-Graduação em Saúde e Comportamento), Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, 2016.

23. BASTOS, M. N. A importância das formações vegetais da restinga e do manguezal para as comunidades pesqueiras. Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, série Antropologia. v. 11, n. 1, p. 41-56, 1995.
24. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHEVIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Pathol., v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
25. BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo Utilizados na Triagem Toxicológica de Produtos Naturais. Visão Acadêmica. v. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.
26. BERNINI, E.; REZENDE, C. E. Variação estrutural em florestas de mangue do estuário do Rio Itabapoana, ES-RJ. Biotemas. v. 23, n. 1, p. 49-60, 2010.
27. BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf. Acesso em: jan. 2017.
28. BRASSEUR & ANGENOT. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate D'aminoethanol -Peg 400. J. Chromatogr. v. 351, p. 351-355, 1986.
29. BRITO, B. B. O.; PEREIRA, L. T. V.; DUARTE, T. S.; ALEXANDRE, T. A.; MAIA, P. C. G. G. S.; SOUSA, M. N. A. Terapias complementares utilizadas no tratamento de crianças. Rev. Interdisciplinar em Saúde. v. 2, n. 3, p. 301-313, 2015.
30. BURANELLI, R. C. Variabilidade populacional em manguezais: análises moleculares e morfológicas em caranguejos Brachyura (Crustacea: Decapoda). 2016. 188 f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Comparada), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto. 2016.
31. CALLAN JR. C. G.; MORA, T.; WALCZAK, A. M. Repertoire sequencing and the statistical ensemble approach to adaptive immunity. Current Opinion in Systems Biology. No prelo. 2016.
32. CARVALHO, L. L. Estrutura de manguezais Sulbrasileiros e sua relação com o gradiente da planície da inundação. 2016. 129 f. Tese (Pós-Graduação em Ecologia e Conservação), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
33. CARNEIRO, D.B.; BARBOZA, M.S.L.; MENEZES, M.P. Plantas nativas úteis na Vila dos Pescadores da Reserva Extrativista Marinha Caeté-Taperaçu, Pará, Brasil. Acta bot. bras. v. 24, n. 4, p. 1027-1033, 2010.
34. CASTELO, A. A. M. C.; TROMBONE, A. P. F.; ROCHA, C. D.; LORENZI, J. C. C. Resposta imune a doenças infecciosas. Medicina. v. 42, n. 2, p. 127-142. 2009.

35. CHANDRAN, U.; PATWARDHAN, B. Network ethnopharmacological evaluation of the immunomodulatory activity of *withania somnifera*. J. of Ethnoph. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/27487266/>>. Acesso em: fev. 2017.
36. CHEN, X. M.; TAIT, A. R.; KITTS, D. D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. Food Chemistry, v.218, p. 15-21 2016.
37. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA. 23rd informational supplement, M100-S23, 2015.
38. CLOUGH, B. F. Primary productivity and growth of mangrove forests. Tropical Mangrove Ecosystems. 1992. p. 225-249.
39. COSTA, I. C. F. A Importância da atenção farmacêutica no uso de fitoterápicos emagrecedores contendo sene (*Cassia angustifolia* Vanh). Rev. Espec. On-line IPOG. v. 1, n. 10, p. 1-15, 2015.
40. CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. Cold Spring Harb Protoc. v. 11, p. 953-957. 2016.
41. CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev Bras Reumatol. v. 50, n. 4, p. 434-461. 2010.
42. CRUZ, A. S.; FIGUEIREDO, C. A.; IKEDA, T. I.; VASCONCELOS, A. C. E.; CARDOSO, J. B.; GOMES, L. F. S. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade “in vitro” de materiais biocompatíveis. Rev. Saúde Pública. v. 32, n. 2, p. 153-159. 1998.
43. CRUZ, M. Z. A integração da medicina complementar e alternativa em sistemas de saúde convencionais. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado - Ciências Biológicas - Modalidade Médica), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo, 2008.
44. CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. Diversitas Journal. v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.
45. DAHDOUH-GUEBAS, F.; JAYATISSA, L. P.; DI NITTO, D.; BOSIRE, J. O.; LO SEEN, D.; KOEDAM, N. How effective were mangroves as a defence against the recent tsunami? Curr. Biol. v. 15, n. 12, p. 443–447. 2005.

46. DANTAS, V. M. C.; MEDEIROS, K. L.; AZEVÊDO, T. K. B.; SANTANA, G. M.; PEREIRA, A. V.; GÓIS, M. B.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, J. V. Taninos: principal componente do extrato *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke inibe o crescimento de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. *Biotemas*, v. 29, n. 1, p. 109-114, 2016.
47. DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology*, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.
48. DOSKOCIL, I.; HAVLIK, J.; VERLOTTA, R.; TAUCHEN, J.; VESELA, L.; MACAKOVA, K.; OPLETAL, L.; KOKOSVA, L.; RADA, V. In vitro immunomodulatory activity, cytotoxicity and chemistry of some central European polypores. *Pharmac. Biol.* v. 54, n. 11, p. 2369-2376, 2016.
49. DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *Ver. Multi Cien.*, n. 7, p. 1-16, 2006.
50. ESTEVAM, C. S.; CAVALCANTI, A. M.; CALUMBI, E. V. F.; NETO, V. A.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M.; ARAUJO, B. S.; PORFÍRIO, Z.; SANT'ANA, A. E. G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). *Revista Brasileira de farmacognosia*. v. 19, n. 1, p. 299-303, 2009.
51. FENALTI, J. M.; BACCEGA, B.; SANTOS, T. M.; SANTOS, P. C.; SCAINI, C. J. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. *Vitalle – Revista de Ciências da Saúde*. v. 26, n. 1, p. 39-48, 2016.
52. FREIRE, A. M. S.; MONTEIRO, R. J. S.; OLIVEIRA, J. F.; RANDAU, K. P. Prática popular de saúde: a concepção dos usuários da unidade de saúde engenho do meio sobre o uso de plantas medicinais. *Rev. APS*. v. 18, n. 2, p. 205-212, 2015.
53. GHOSH, A.; SCHMIDT, S.; FICKERT, T.; NÜSSER, M. The Indian Sundarban Mangrove Forest: History, Utilization, Conservation Strategies and Local Perception. *Diversity*. v. 7, n. 2, p. 149-169, 2015.
54. GHUMAN, S.; NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; MCGAW, L. J.; COOPOOSAMY, R. M.; STADEN, J. V. Antimicrobial activity, phenolic content, and cytotoxicity of medicinal plant extracts used for treating dermatological diseases and wound healing in KwaZulu-Natal, South Africa. *Frontiers in Pharmacology*. v. 7, p. 1-9, 2016.
55. HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.
56. HARBORNE J.B. *Phytochemical Methods*. 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall, 1998. 278 p.

57. HAYASHI, T.; THOMSON, R. H. New lignans in *Conocarpus Erectus*. *Phytochemistry*. v. 14, n.4, p. 1085-1087. 1975.
58. HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
59. IRVINE, F.R. Woody plants of ghana with special reference to their uses. Oxford University. Press, London. 1961.
60. JUNIOR, D. M.; ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II. *Rev. Bras. Reumatol*. v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.
61. KAPOOR, D.; TRIKHA, D.; VIJAYVERGIYA, R.; PARASHAR, K. K.; KAUL, D.; DHAWAN, V. Short-term adjuvant therapy with terminalia arjuna attenuates ongoing inflammation and immune imbalance in patients with stable coronary artery disease: in vitro and in vivo evidence. *J. of Cardiovasc. Trans. Res*. v. 8, n. 3, p.1173-1186, 2015.
62. KATHIRESAN, K. Methods of study mangroves. 2008. p. 116-125. Disponível em: <<https://www.scribd.com/.../Methods-of-Studying-Mangroves>> Acesso em: jan. 2017.
63. KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*, v. 40, p. 81-251, 2001.
64. KHAN, A. A.; KUMAR, V.; SINQH, B. K.; SINGH, R. Evaluation of wound healing property of Terminalia catappa on excision wound models in Wistar rats. *Drug Res. (Stuttg)*. v. 64, n. 5, p. 225-228, 2014.
65. KINTARAK S.; NAIR S. P.; SPEIGHT P. M.; WHAWELL S. A. A recombinant fragment of the fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus* inhibits keratinocyte migration. *Arch. Dermatol. Res*. v. 296, n. 6, p. 250 –257, 2004.
66. KRUT O.; UTERMOHLEN O.; SCHLOSSHERR X.; KRÖNKE M. Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect. Immun*. v. 71, n. 5, p. 2716–2723, 2003.
67. LE-BARILLEC, K.; MAGALHÃES, J. G.; COUCUFF, E.; THUIZAT, A.; SANSONETTI, P. J.; PHALIPON, A.; DI SANTO, J.P. Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. *J. Immunol*. v. 175, n. 3, p. 1735-1740, 2015.
68. LINSINGEN, L. V.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. Sinopse taxonômica da família combretaceae R. Brown na Região Sul do Brasil. *Acta bot. bras*. v. 23, n; 3, p. 738-750, 2009.

69. LIU, B.; BIAN, H. J.; BAO, J. K. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Lett.* v. 1, n. 1, p. 1-12, 2010.
70. LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.
71. MANGINO, M.; ROEDERER, M.; BEDDALL, M. H.; NESTLE, F. O.; SPECTOR, T. D. Innate and adaptive immune traits are differentially affected by genetic and environmental factors. *Nat. Commun.* v. 8, p. 1-6, 2017.
72. MANOSROI, A.; JANTRAWUT, P.; AKIHISA, T.; MANOSROI, W.; MANOSROI, J. In vitro and in vivo skin anti-aging evaluation of gel containing niosomes loaded with a semi-purified fraction containing gallic acid from *Terminalia chebula* galls. *Pharmaceutical Biology*. v. 49, n. 11, p. 1190-1203, 2011.
73. MATNI, A. S.; MENEZES, M. P. M.; MEHLIG, U. Caracterização estrutural dos bosques de mangue na Península Bragatina. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*. v. 3, n. 2, p. 45-54, 2006.
74. MARTIN, I.; SAWATZKY, P.; LIU, G.; MULVEY, M. R. Antimicrobial resistance to *Neisseria gonorrhoeae* in Canada: 2009-2013. *Can. Commun. Dis. Rep.* v. 41, n. 2, p. 40-41. 2015.
75. MARTINS, M. C.; GARLET, T. M. B. Desenvolvendo e divulgando o conhecimento sobre plantas medicinais. *Rev. Elet. Gest., Educ. e Tecn. Amb.* v. 20, n. 1, p. 438-448, 2016.
76. McDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.
77. MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. JR. Innate immunity. *New Engl. J. Med.* v. 3, n. 5 p.338-344, 2000.
78. MUMBY, P. J.; HASTINGS, A. The impact of ecosystem connectivity on coral reef resilience. *J. Appl. Ecol.* v. 45, n. 3, p. 854–862, 2008.
79. MUTUA, J. K.; IMATHIU, S.; OWINO, W. Evaluation of the proximate composition, antioxidant potential, and antimicrobial activity of mango seed kernel extracts. *Food Science & Nutrition*. 2016. Disponível em: < doi:10.1002/fsn3.399>. Acesso em: 15 jan. 2017.
80. NAGELKERKEN, I.; BLABER, S. J. M.; BOUILLON, S.; GREEN, P.; HAYWOOD, M.; KIRTON, L. G.; MEYNECKE, J.-O.; PAWLIK, J.; PENROSE, H.M.; SASEKUMAR, A.; ET AL. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquat. Bot.* v. 89, n. 2, p. 155–185, 2008.

81. NASCIMENTO, D.K.D. Toxicidade aguda de extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus*. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2014.
82. NASCIMENTO, D. K. D.; SOUZA, I. A.; OLIVEIRA, A. F. M.; BARBOSA, M. O.; SANTANA, M. A. N.; JÚNIOR, D. F. P.; LIRA, E. C.; VIEIRA, J. R. C. Phytochemical screening and acute toxicity of aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus in swiss albino mice. *Acad. Bras. Ciênc.* v. 88., n. 3, p. 1431-1437, 2016.
83. NASIRI, E., HOSSEINIMEHR, S.J., AZADBAKHT, M., AKBARI, J., ENAYATI-FARD, R., AZIZI, S. The effect of terminalia chebula extract vs. silver sulfadiazine on burn wounds in rats. *J Complement Integr Med.* v. 12, n. 2, p. 127-135, 2015.
84. NATIONAL CENTER FOR COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE. The use of complementary and alternative medicine in the United States. Retrieved. 2011.
85. NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L.; COPPOLA, R.; FEO, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals (Basel).* v. 6, n. 12, p. 1451-1474. 2013.
86. NETTEL, A.; DODD, R. S.; CID-BECERRA, J. A.; ROSA-VELEZ J. D. L. Ten new microsatellite markers for the buttonwood mangrove (*Conocarpus erectus* L., Combretaceae). *Molecular Ecology Resources.* v. 8, n. 4, p. 851-853, 2008.
87. NUNES, G. S.; SPEZIALI, E.; CARVALHO, A. T.; AVELAR, D. M. V.; AVELAR, M. V.; AVELAR, R. S.; SOARES, T. F.; SILVA, M. L.; MAGALHÃES, V. P.; CHAVES, D. G.; MELO, G. E. B.; CARDOSO, G. M.; SOARES, E. B.; SANTOS, S. M. E.; TEIXEIRA, R.; QUEIROZ, D. M.; OLIVEIRA, R. C.; FARIA, A. M. C.; FILHO, O. A. M. Lifewide profile of cytokine production by innate and adaptive immune cells from Brazilian individuals. *Immunity & Ageing.* v. 14, n. 2, p. 1-14, 2017.
88. OFORI-KWAKYE K.; KWAPONG A. A.; BAYOR M. T. Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med* v. 8, n. 3, p. 218-223, 2011.
89. OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de toxicologia. 3ª ed. Atheneu Editora São Paulo LTDA, 2008. p. 1-8.
90. OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry.* v. 66, n. 17, p. 2012-2031. 2005.
91. OXELMARK, L.; LINDBERG, A.; LÖFBERG, R.; STERNBY, B.; ERIKSON, A.; ALMER, S.; BEFRITS, R.; FOSSUM, B.; KARLÉN, P.; BROSTRÖM, O.; TYSK, C. Use of complementary and alternative medicine in Swedish patients with

- inflammatory bowel disease: a controlled study. *Eur J. Gastroenterol Hepatol.* v. 28, n. 11, p. 1320-1328, 2016.
92. PALOMARES, O.; MARTÍN-FONTECHA, M.; LAUENER, R.; TRAUDL-HOFFMANN, C.; ÇAKAYTAR, O.; AKDIS, M.; AKDIS, C.A. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes and Immunity.* v. 15, p. 511-520, 2014.
 93. PAN, M. H.; LAI, C. S.; HO, C. T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Function.* v. 1, n. 1, p. 15-31, 2010.
 94. PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. *Lancet.* v. 375. p. 1777-1789. 2001.
 95. PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *Journal of Biotechnology and Biodiversity,* v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.
 96. PRINCE, T.; MCBAIN, A. J.; O'NEILL, C. A. *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-Induced Cell Death by Competitive Exclusion. *Appl Environ Microbiol.* v. 78, v. 15, p. 5119-5126, 2012.
 97. RAPOSO, V. L. A medicina não convencional no contexto do direito à saúde e dos direitos dos pacientes. *Juris Poiesis.* v. 19, n. 21, p. 1-8, 2016.
 98. RAWAT, P.; SINGH, P. K.; KUMAR, V. Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. *Journal of Herbal Medicine.* v. 6, n. 3, p. 107-118, 2016.
 99. RAZA, M.A.; ANWAR, F.; SHAHWAR, D.; MAJEED, A.; MUMTAZ, M.W., DANISH, M.; NAZAR, M.F.; PERVEEN, I.; KHAN, S.U. Antioxidant and antiacetylcholine esterase potential of aerial parts of *Conocarpus erectus*, *Ficus variegata* and *Ficus maclellandii*. *Pak. J. Pharm. Sci.* v.29, n. 2, p. 489-495, 2016.
 100. REGASINI, L.O.; PIVATTO, M.; SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; GIANNINI, M.J.S.M.; BARREIRO, E. J.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. *Brazil. J. Pharmac.* v. 20, n.5, p.706-711, 2010.
 101. ROBERTS, E.A.H.; CARTWRIGHT, R.A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *J. Sci. Food. Agr.* v. 8. p.72-80, 1957.
 102. ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research.* v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
 103. ROGERO, S. O.; SAIKI, M.; CRUZ, A. S.; COSTA, I. Estudo Da Citotoxicidade De Elementos De Ligas Metálicas Utilizadas Como Biomateriais. 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Foz do Iguaçu, PR,

- Brasil. 2006. Disponível em: <
<http://repositorio.ipen.br:8080/xmlui/handle/123456789/18517>>. Acesso em: jan.
 2017.
104. ROSSATO, A. E.; CHAVES, T. R. C.; PIERINI, M. M.; AMARAL, P. A.; SANTOS, R. R.; CITADINI-ZANETTE, V. Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos. 1ª ed. Florianópolis: DIOESC, 2012. 213 p.
 105. SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; De-Rosa, T. Brazilian mangroves. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* v. 3, n. 4, p. 561–570, 2000.
 106. SCHEPETKIN, I. A.; KOUAKOU, K.; YAPI, A.; KIRPOTINA, L. N.; JUTILA, M. A.; QUINN, M. T. Immunomodulatory and hemagglutinating activities of acidic polysaccharides isolated from *Combretum racemosum*. *Int Immunoph.* v. 15, n. 3, p. 628-637, 2013.
 107. SHARMA, A.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of methanol extract of *Adansonia digitata* L. *Trop. J. Pharm. Res.* v. 15, n. 9, p. 1923-1927, 2016.
 108. SHOHAYEB, M. M.; ABDEL-HAMEED, E. S.; BAZAID, S. A. Antimicrobial Activity of Tannins and Extracts of Different Parts of *Conocarpus Erectus* L. *Biological Sciences.* v. 3, n. 2, p. 544-553, 2013.
 109. SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. *Rev. Elet. Gest., Educ. e Tecn. Amb.* v. 20, n. 1, p. 381-388, 2016.
 110. SILVA, L. F.; XAVIER, C. V.; SETÚBAL, S. S.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; CASTRO, O. B.; FERNANDES, C. F. C.; HONDA, E. R.; ZANCHI, F. B.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; JARDIM, I. S.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J. P. 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 Compl. Altern Medic.* v. 15, n. 1-10, 2015.
 111. SILVA, M. R. O. Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá-PE. 2004. 49 f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2004.
 112. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.
 113. SPALDING, M.; KAINUMA, M.; COLLINS, L. *World Atlas of Mangroves*. Earthscan. 2010. p. 135.

114. SHI, Q. W.; LI, L. G.; HUO, C. H.; ZHANG, M. L.; WANG, Y. F. Study on natural medicinal chemistry and new drug development. *Chin. Tradit. Herb. Drugs.* v. 41, n. 10, p. 1583–1589, 2010.
115. STIASNY, E. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins. *Collegium*, 1912. p.483-499.
116. TEIXEIRA, A. H.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; VAL, D. R.; FILHO, S. M. P.; SILVA, A. A. R. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. *SANARE.* v. 13, n. 1, p. 23-28, 2014.
117. TEIXEIRA, P. J. Z.; HERTZ, F. T.; CRUZ, D. B.; CARAVER, F.; HALLAL, R. C.; MOREIRA, J. S. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. *J. Bras. Pneum.* v. 30, n. 6, p. 540-548, 2004.
118. THOMAS, K. F. Immune modulating agents. Marcel Dekker, INC. Newyork. 1998. p. 1-19
119. TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; ARZANI, A. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry.* v. 220, n. 1, p. 153-161, 2016.
120. WAGNER H.; BLADT, S. Plant drug analysis -A thin layerchromatography atlas. Springer. 2.ed. Munich. 1996. 383 p.
121. WHO. WHO traditional medicine strategy 2014–2023. Geneva: World Health Organization; 2013. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/> Acesso em: dez. 2016.
122. WIESENER, S.; FALKENBERG, T.; HEGYI, G.; HÖK, J.; ROBERTI, D. P., FONNEBO, V. Legal status and regulation of complementary and alternative medicine in Europe. *Forsch Komplementmed.* v. 19, n. 2, p. 29-36, 2012.
123. WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.
124. WYKES, M. N.; STEPHENS, R.; COCKBURN, I. A. Adaptive Immunity to Plasmodium Blood Stages. Springer International Publishing Switzerland. No prelo. 2017.
125. YAKAEW, S.; ITSARASOOK, K.; NGOENKAM, J.; JESSADAYANNAETHA, A.; VIYOUCH, J.; UNGSURUNGSIE, M. Ethanol extract of *Terminalia chebula* fruit protects against UVB-induced skin damage. *Pharm Biol.* v. 54, n. 11, p. 2701-2707, 2016.
126. YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Nature Products. *Molecules.* v. 21, n. 5, p. 1-18, 2016.

127. ZANG, R.; ZHANG, X.; SUN, J.; YANG, S. T. In vitro 3-D multicellular models for cytotoxicity assay and drug screening. *Process Biochemistry*. v. 51, n. 6, p. 772-780, 2016.
128. ZHENG, Y. F.; ZHANG, Q.; LIU, X. M.; MA, L.; LAI, F. Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on *Magnolia kwangsiensis* Figlar & Noot. *Carbohydrate Polymers*. v. 142, p. 98–104, 2016.
129. ZOU, Y. F.; BARSETT, H.; HO, G. T. T.; INNGJERDINGEN, K. T.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T. E.; PAULSEN, B. S. Immunomodulating pectins from root bark, stem bark, and leaves of the Malian medicinal tree *Terminalia macroptera*, structure activity relations. *Carbohydrate Research*. v. 403, p. 167-173, 2015.
130. ZOU, Y. F.; HO, G. T. T.; MALTERUD, K. E.; LE, N. H. T.; INNGJERDINGEN, K. T.; BARSETT, H.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T. E.; PAULSEN, B. S. Enzyme inhibition, antioxidant and immunomodulatory activities, and brine shrimp toxicity of extracts from the root bark, stem bark and leaves of *Terminalia macroptera*. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 155, p. 1219-1226, 2014.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Investigação imunológica e antitumoral de compostos naturais extraídos de plantas**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo, Av. Prof. Moraes Rego, s/n.º - Cidade Universitária – Recife – PE – CEP 50.670.420, fone: 2126.8866, e-mail: cristianemout@gmail.com. Também participam desta pesquisa os alunos:

Bruno Rafael Barboza, telefone: 997738245; Jéssica de Santana Brito, telefone: 998746208; Leydianne Leite de Siqueira Patriota Queiroz, telefone: 997990623; Glêzia Renata da Silva Lacerda, telefone: 997132402; Dayane Kelly Dias do Nascimento, telefone: 993947520; Vanessa Silva de Almeida, telefone: 986991635; Camila Joyce Alves da Silva, telefone: 996855413 e Bárbara Rafaela da Silva Barros, telefone: 985554155 e está sob a orientação da Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo, fone: 2126.8866.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa Investigação imunológica e antitumoral de compostos naturais extraídos de plantas, a qual pretende analisar o efeito de compostos naturais extraídos de plantas sobre o sistema imunológico e em células humanas de câncer. Sua participação é necessária, pois, como não portador de doenças infecciosas e tumorais, o seu sangue será utilizado como controle negativo. Sua participação é voluntária e se dará através de dois itens: (1) coleta de até 9 (nove) colheres de chá de sangue (4 ml) através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). Caso ocorra qualquer desconforto ou promoção de hematoma local você receberá ajuda da equipe de coleta através de cuidados paliativos. O sangue será utilizado para a realização do cultivo das células do sangue quando em contato diversos compostos naturais com o objetivo de: (i) verificar produção de citocinas e quimiocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças), (ii) analisar a presença de marcadores de superfície celular (que identifica quais células são e se houve aumento ou diminuição da população de células), (iii) dosar a quantidade de óxido nítrico (que também está envolvido na defesa contra as doenças).

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. As amostras sanguíneas coletadas nesta pesquisa serão processadas e ficarão armazenadas em freezer a -20°C, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo, no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Investigação imunológica e antitumoral de compostos naturais extraídos de plantas**, como participante da pesquisa. Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa

e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B - ARTIGO ORIGINAL**Antibacterial, Cytotoxic and Immunomodulatory Activity of
Conocarpus erectus Linneus (Combretaceae)**

Dayane Kelly Dias do Nascimento^a; Vanessa Silva de Almeida^a; Daniel Rodrigo Cavalcante de Araujo^b; Wolfgang Harand^b; Ana Karine de Araújo Soares^c; Leyllane Rafael Moreira^c, Virgínia Maria Barros de Lorena^c; Maria de Fátima Rodrigues^d; Lucimeri Paulino Machado Magalhães^d; Rafael Matos Ximenes^d; Kesia Xisto da Fonseca Ribeiro^d; Thiago Henrique Napoleão^e; Cláudia Sampaio de Andrade Lima^f; Ricardo Yara^g; Cristiane Moutinho Lagos de Melo^d; Jeymesson Raphael Cardoso Vieira^{a*}.

^a Department of Histology and Embryology, Postgraduate Program in Morphotechnology, University Federal of Pernambuco, University City, Recife, 50670-901, Pernambuco, Brazil.

^b National Institute for Semi-Arid – INSA, Campina Grande, 58434-700, Paraíba, Brazil.

^c Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Pernambuco, Brazil;

^d Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Brazil;

^e Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Brazil.

^f Department of Biophysics, Federal University of Pernambuco, Brazil.

^g Department of Biomedical Engineering, Federal University of Pernambuco, Brazil.

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

E-mail address: jeymesson@gmail.com

7 Summary

1.	Introduction	83
2.	Material and methods	84
2.1.	Plant Materials	84
2.2.	Extraction of <i>Conocarpus erectus</i> leaves.....	85
2.3.	Phytochemical screening	85
2.4.	Chromatographic analysis	85
2.5.	Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).....	85
2.6.	Culture of lymphocytes and in vitro stimulation with aqueous extract of leaves of <i>Conocarpus erectus</i> L. (AELCe).....	86
2.7.	Analysis of cell viability.....	86
2.8.	Measurement of cytokine and chemokines production using Cytometric Bead Array (CBA) Kit	87
2.9.	In vitro nitrite analysis	87
2.10.	Lymphocytes immunophenotyping assay	88
2.11.	Antimicrobial assays.....	88
2.11.1.	Microorganisms chosen for the antimicrobial test.....	88
2.11.2.	Inoculum Standardization.....	89
2.11.3.	Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC)	89
2.12.	Statistical analysis.....	90
3.	Results.....	90
4.	Discussion.....	93
5.	Conclusion.....	96
	Acknowledgements.....	96
	References.....	97

Abstract

Ethnopharmacological relevance: Mangroves are areas rich in economically important resources exploited by the human coastal population. *Conocarpus erectus* (Combretaceae) known as button mangrove is one of the species found in mangroves and it is used in folk medicine in treatment of anemia, catarrh, conjunctivitis, diabetes, diarrhea, fever, gonorrhea, headache, hemorrhage, orchids, rash, bumps and syphilis.

Aim of the study: This study aimed to evaluate biological properties of the aqueous extract of leaves of *C. erectus* (AELCe) in bacterial and immunological targets.

Material and methods: The extract was characterized through the qualitative high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Cell viability analysis was performed by the annexin V-FITC test and staining with propidium iodide in AELCe concentration of 50, 25, 12.5 and 6 µg/mL. Measurement of cytokine and chemokines levels in the lymphocytes supernatants, *in vitro* nitric oxide analysis, and assessment of lymphocyte activation were performed for investigate the immunological profile promoted by AELCe. Assays against bacteria were promoted analyzing disk diffusion, MIC and MIB parameters.

Results: AELCe presented 3 ', 4'-OH flavonoid, phenylpropanoglycosides, saponins, polymeric proanthocyanidins and hydrolyzable tannins in its composition, as well as eighteen unknown compounds when compared to the available standards. AELCe showed antimicrobial activity mainly for gram-positive *S. aureus*. AELCe did not promote cell death in 95% of human lymphocytes. IL-2, IL-10, TNF- α , IFN- γ cytokines and nitric oxide were produced by lymphocytes and the subset of CD8 + T lymphocytes were activated through stimulation with AELCe.

Conclusion: AELCe showed moderate antibacterial activity according to MIC levels, did not show cytotoxic activity and presented immunomodulatory activity in human white blood cells, confirming its potential use as an immunomodulator and antibacterial, suggesting an alternative therapeutic potential of this plant for the safe and effective treatment of wounds.

Keywords: *Conocarpus erectus*, citotoxicity, immunomodulatory, mangroves, phytochemical, antimicrobial

1. Introduction

Virtually all civilizations have to some extent used plants as part of their medical system, often embedded in a holistic context combining evidence-based knowledge with supernatural concepts and belief systems (Helfenstein and Tammela, 2016). Botanical derived traditional medicines are used by about 60% of the world's population (Dey, 2016). In many areas, traditional medications are preferred over conventional treatments because ethnomedicines are relatively inexpensive, readily available and efficacious having fewer side-effects (Modak et al., 2015). According to World Health Organization (WHO) medicinal plants would be the best source to obtain a variety of drugs. About 80% of individuals from developed countries use traditional medicines which has compounds derived from medicinal plants (Bashir et al., 2015)

Conocarpus erectus L., popularly known as mangrove button, belongs to the family Combretaceae and it is found in tropical and subtropical regions around the world (Nascimento et al., 2016). Being more widespread in the southern coast of Florida, Bahamas, West Indies, Mexico, Central America and Islands Galapagos. In South America it develops from Ecuador to Brazil. It is also native to the coastal areas of Africa. In Brazil it has been registered in the coastal areas of Pará to the northern coast of Paraná (Linsingen et al., 2009). It is widely cultivated as an ornamental tree in many countries around the world (Shohayeb et al., 2013).

The plant is used as folk remedy in anemia, catarrh, conjunctivitis, gonorrhea, diabetes, diarrhea, fever, headache, bleeding, tumors, rchitis, pricklyheat, swellings, and syphilis (Abdel-Hameed et al., 2012, Ayoub, 2010, Shohayeb et al., 2013). The leaves are eaten, or their decoction drunk for fever (Irvine, 1961). The bark and the fruit of this species are used in the form of tea in the treatment of diarrhea, wounds, hemorrhoids and diabetes. Wood is used for fence posts, crossties, turnery, boat building, firewood and landscaping purposes (Carneiro et al., 2010).

Phytochemical studies identified in the aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* L. some flavonoids, saponins and tannins (Nascimento et al., 2016). In the methanol extract and n-hexane of leaves of *Conocarpus erectus* also were indicated the presence of triterpenes (Bandeira, 2003). In the high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of ethyl acetate and n-butanol extracts of leaves, stem, flowers and fruits of *C. erectus* revealed the presence of gallic acid, catechin, apigenin, quercetin, quercetin-3-O-glucoside,

kaemferol-3-O-glucoside, rutin and quercetin-3-O-glucoside-6-O-gallic acid (Abdel-Hameed et al., 2012).

The toxicological evaluation of the aqueous extract of *Conocarpus erectus* L. in Swiss Albino Mice classify the extract of low toxicity with LD₅₀ estimated at 2,000 mg/kg body weight (Nascimento et al., 2016). In methanol plant extracts no dead animals were observed post 24 hours of treatment (Abdel-Hameed et al., 2013).

Medicinal properties published by *Conocarpus erectus* are antioxidant, hepatoprotective, anticancer and antimicrobial activities. Also was suggested that plant fractions could be a potent source of therapeutic agent in preventing or slowing the process of aging and age associated oxidative stresses and related degenerative diseases (Abdel-Hameed et al., 2012, Abdel-Hameed et al., 2014, Abdel-Hameed et al., 2013, Shohayeb et al., 2013, Silva, 2004, Raza et al., 2016)

In this study we investigated the phytochemical profile of aqueous extract of leaves of *C. erectus*, cytotoxic activity against human lymphocytes and immunological response promoted with *in vitro* assays. This study aimed to promote initial molecular studies to provide safe and scientific basis through pre-clinical studies for its potential use in biological models.

2. Material and methods

2.1. Plant Materials

Conocarpus erectus L. leaves were collected in adult stage in the flowering period (March 2015) in the mangrove of the city of Itamaracá, district of Vila Velha of the state of Pernambuco- Brazil with 7° 40' south latitude and 34° 50' west longitude, being selected green leaves, showy, visually intact appearance, free of mechanical damage, pests, diseases or altered color. A voucher specimen was identified by Marlene Barbosa and is deposited in the Herbarium of the Federal University of Pernambuco (UFPE) under UFP number 75.457. The collection was authorized by Pernambuco Company for the Control of Environmental Pollution and Administration of Water Resources under authorization CA DFRB N. 120/2014.

2.2. Extraction of *Conocarpus erectus* leaves

The extract was prepared by infusion from 250 g of fresh leaves of *C. erectus* L. The material was weighed, ground and the infusion was performed by adding distilled water at 40°C for 30 minutes. The aqueous extract was lyophilized and stored at 5° C. The ratio of extraction was 1.38 %.

2.3. Phytochemical screening

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

Table 1. Metabolites eluting system developers and used for photochemical screening of the aqueous extract of *Conocarpus erectus* L.

2.4. Chromatographic analysis

The extract was analyzed by HPLC (1200 Infinity Series, Agilent) equipped with quaternary pump, autosampler, column oven and diode array detector. Separation was performed on a RP 18 column (Zorbax SB-C18, Agilent, 4.6x250mm, 5µm). The sample (5µL) was subjected to the following linear gradient at a flow rate of 2.4 mL/min and 30 °C (A: 0.3% acetic acid in water, B: Acetonitrile): 98% A (0 min) - 90% A (10 min) - 15 % A (27 min).

2.5. Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Blood (4 mL) from 6 young healthy volunteers (23 to 38 years old), without recent infectious disease, immunosuppression and/or autoimmune disease were collected in heparin tubes (Vacuette) to obtain the PBMCs through a concentration gradient technique (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare Life Sciences, Sweden). Cells were washed twice with sterile PBS and after centrifugation (400 g, 30 min, 20°C), a ring of PBMCs was obtained, collected and cells were counted in a Neubauer chamber. Cell viability was evaluated by the trypan blue (Sigma-Aldrich, USA) exclusion method. Cells were only used when viability was

>98%. Samples were collected after all of voluntaries signed the “Term of Free and Informed Consent” and experimental protocols were approved by Federal University of Pernambuco Research Ethics Committee (UFPE, Brazil n° 1.870.360/2016; CAAE 62119716.5.0000.5208).

2.6. Culture of lymphocytes and in vitro stimulation with aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* L. (AELCe)

Lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) with 10% (w/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA) in 24-well plates (TPP Techno Plastic Products, Switzerland) at a density of 10^6 cells/well. Lymphocytes supernatant cultures were used in assays to evaluate cell viability, cytokine production, nitric oxide release and CD4⁺ and CD8⁺ activation. All cultures were treated with 50, 25, 12.5 and 6 µg/mL of aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* L. (AELCe) and remained with this stimulus for 24h in assays for analysis of cell viability. Other assays were performed using 12.5 µg/mL of AELCe in 24h of incubation time. Controls were performed using untreated cells in culture medium.

2.7. Analysis of cell viability

Lymphocytes treated with AELCe for 24 hours of incubation as well as untreated cells and were centrifuged at 450 g and 4°C for 10 min. After discarding the supernatant, 1 mL of PBS 1X was added to the precipitate and after resuspension, the cells were centrifuged again (450 g, 4°C, 10 min). The pellet was resuspended in 300µL of binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1.8 mM CaCl₂), transferred to a labelled cytometer tube, and annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500) and propidium iodide (PI, 20 µg/mL) were added. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur platform (BD Biosciences, San Jose, USA) and the results were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences). Annexin-FITC negative/PI positive cells were considered as necrotic and Annexin-FITC positive/PI negative cells were considered in the early stage of apoptosis. Double negatives were considered viable cells.

2.8. *Measurement of cytokine and chemokines production using Cytometric Bead Array (CBA) Kit*

Supernatants of cultures treated with AELCe for 24 h as well as untreated cells were collected to quantify cytokines, chemokines and nitric oxide assays. Cytokine assessment was carried out using human Th1/Th2 cytokine kit II (Becton Dickinson Biosciences, USA) for simultaneous detection of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN- γ). Chemokines assessment was carried out using of the kit The BD™ CBA Human Chemokine Kit for quantitatively measure interleukin-8 (CXCL8/IL-8), RANTES (CCL5/RANTES), monokine induced by interferon- γ (CXCL9/MIG), monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1), and interferon- γ -induced protein-10 (CXCL10/IP-10). The cytokine and chemokines measurement was based on the principle of cytometric bead array (CBA) technology and all data were acquired on FACSCalibur platform. CBA utilizes microparticles or beads labeled with discrete fluorescence intensity. The capture beads were labeled with allophycocyanin and were read at 650 nm. The detection antibody specific for cytokines was labeled with phycoerythrin fluorochrome which emits at 585 nm on yellow parameters. The intensity of fluorescence of the yellow parameter is proportional to the amount of cytokine present in test samples. Briefly, test samples (50 μ L) and phycoerythrin detection antibody were incubated with capture bead reagent for 3 h in the dark at room temperature. All unbound antibodies were washed (1.0 mL kit wash buffer) and resuspended in 300 μ L kit fixing buffer before acquisition of data on FACSCalibur platform. Each cytokine had a single and well separated peak and six individual cytokine standard curves (0–5000 pg/mL) were run in each assay. The range of detection was between 3000 pg/mL and 5000 pg/mL in accordance with the manufacturer's instructions.

2.9. *In vitro nitrite analysis*

The supernatants from cultures of cells incubated or not with AELCe at 12.5 μ g/mL for 24 h were used for nitrite analysis by the colorimetric Griess method (Ding et al., 1988). Nitric oxide (NO) concentration was estimated using a standard curve (3.12–100 μ mol/mL). The reading was carried out in a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan FC, Waltham-USA) at 595nm.

2.10. *Lymphocytes immunophenotyping assay*

Lymphocytes and monocytes present among the PBMCs were for 24 h cultured in 24-well plates (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) at a density of 10^6 cells/well, in presence and absence of AELCe at 12.5 µg/mL and RPMI. After this incubation time, cells were removed of plates using ice cold PBS-Wash 1% and inserted in 15-mL polypropylene tubes (BD Biosciences) with 6 mL of PBS-Wash for centrifugation (400 x g for 10 min). After discarding the supernatant, cells were washed with 2 mL of PBS-Wash and centrifuged (400 x g for 5 min). Supernatant was discarded and surface monoclonal antibodies were added to tubes and incubated for 30 minutes. After this time, it was performed two washing steps with 1 mL of PBS-Wash followed by centrifugation (400 x g for 5 min). Supernatants were discarded and cells were fixed for 15 minutes with 150 mL of Cytifix solution (BD Biosciences). Cells were washed with 2 mL of PBS-Wash followed by centrifugation (400 x g for 5 min). After discarding the supernatant, 300 µL of PBS-Wash was added to each tube, which was loaded onto the FACSCalibur platform. Monoclonal antibodies used in this assay were anti-CD4- PerCP, anti-CD8- FITC, anti-CD- 28-PE and anti-CTLA- 4-APC (BD Biosciences).

2.11. *Antimicrobial assays*

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

2.11.1. *Microorganisms chosen for the antimicrobial test*

Five clinical isolates were used for the antimicrobial test: three of *Staphylococcus aureus* and two of *Pseudomonas aeruginosa* all from purulent secretions (wounds) and obtained from the Microorganism Collection of the UFPE Department of Antibiotics - UFPEDA (table 2). Microorganisms that are resistant to two or more antimicrobial groups are considered multi-resistant (Teixeira et al., 2014).

Table 2 - Microorganisms used for the antimicrobial test

2.11.2. *Inoculum Standardization*

Bacterial suspensions were standardized according to the turbidity equivalent to 0.5 tube of the McFarland scale, corresponding to approximately 108 CFU / mL (CLSI, 2015).

Six-mm diameter discs were soaked with 20µL of the AELCe extract under study, each disk being 2000µg, and placed on the surface of the medium previously seeded with standardized test microorganisms in Petri dishes. The plates were refrigerated for 20 minutes (to start diffusion before growth of the microorganism) and then incubated at 35 °C for 24 hours (bacteria). The tests were performed in triplicate and the results, expressed in mm, were calculated by the arithmetic mean of the diameter of the inhibition halos formed around the disks in the three replicates (Bauer et al., 1966 modified). As a standard, Ketoconazole (Neo-Chemistry) was used for Gram-positive and Gram-negative bacteria (Bauer et al., 1966 modified).

2.11.3. *Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC)*

The determination of MIC was evaluated according to the criteria adopted by the Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2015). Plates of 96 wells were enumerated from 1 to 12 horizontally and in alphabetical order, from A to H and were used vertically. The AELCe extract was completely dissolved in sterile water until a homogeneous 20,000 µg/mL mixture entitled stock solution was obtained, and a standard suspension of the microorganisms under study was made according to the 0.5 tube of the MacFarland scale. With the exception of the third column, 100 µl of the Müller Hinton broth medium was placed in the other columns, the first column being the negative control, ie containing only 100 µl of the Müller Hinton broth; In the second, 10 µl of the standardized microbial suspension was added to 100 µl of the Müller Hinton broth (positive control). In the third column, 180 µl of the Müller Hinton broth was added and then 20 µL of the stock solution of the crude extract was added. From this column serial dilutions of 1: 2 were made, that is, 100 µl of the current column was withdrawn and added in the next column, to the twelfth column. To the wells of the dilutions were placed 10 µl of the suspension of the clinical isolates. The plate was incubated for 18 hours and after the incubation period a developing dye (reassuring

sodium) was applied, able to more accurately show whether there was turbidity in the well. The MIC value was determined in the concentration of the last well where there was no visible turbidity. From this well, seeds were made by exhaustion on plates with Mueller Hinton Agar medium, to establish CBM, which will be the concentration where there is no growth of colonies. All analysis was performed in triplicate (CLSI, 2015).

2.12. Statistical analysis

The data were analyzed in Sigma software, version 2.23.03. Normality of the quantitative variables was performed by the Kolmogorov-Smirnov test. To detect the differences between groups, the Wilcoxon test was used. Student's t-test was used to analyze the results from cell viability assay. All results were expressed as mean $\pm$ SD and a value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

Many biological activities are attributed by *Conocarpus erectus* in folk medicine. Here, we performed an *in vitro* study to evaluate microbiological target and both molecular and cellular immunological mediators stimulated by this plant.

AELCe presented in its composition several classes of secondary metabolism compounds, such as 3', 4'-OH flavonoid, phenylpropanoglycosides, saponins, polymeric proanthocyanidins and hydrolysable tannins (Table 3).

Table 3. Phytochemical analysis of the aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* (AELCe) obtained by thin layer chromatography (TLC)

Other qualitative profile of the aqueous extract was obtained by RP-HPLC-DAD. These figures depict the base peak chromatogram (BPC), showing regions of a representative chromatogram with compounds with the highest intensity at 256 nm. The main compounds from the AELCe were characterized on the basis of their retention time (Figure 1) and spectrometric data compared to standards available. The analysis performed through the HPLC identified eighteen unknown compounds when compared to the available standards, some of them or the association of them responsible for the biological activity of this extract.

The major compounds identified in the AELCe do not bear similarities to the available standards.

Figure 1: RP-HPLC-DAD (256 nm) chromatogram of major compounds identified in the AELCe by the retention time in minutes; (1) 2.753; (2) 3.487; (3) 4.240; (4) 4.727; (5) 6.367; (6) 7.660; (7) 8.347; (8) 13.820; (9) 15.093; (10) 15.353; (11) 17.727; (12) 15.900; (13) 16.107; (14) 17.693; (15) 19.433; (16) 19.987; (17) 20.300; (18) 21.093.

After phytochemical characterization, we performed antimicrobial investigation how initial study about biological property promoted by AELCe. Results showed that AELCe present antimicrobial activity, in paper disk diffusion test, mainly for the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and no activity was observed on Gram-negative strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Table 4).

Table 4 – Profile of antimicrobial activity promoted by aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* (AELCe) through paper disk diffusion test

Evaluation of MIC and MBC showed that values found ranged from 250 to >2000 µg/mL for MIC and >2000 µg/mL for MBC against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. In fact, AELCe was active in 20% of *S. aureus* strains 719, 679 and 700 with MIC at 250, 500 and 1000 µg/mL concentrations, respectively. To *P. aeruginosa*, strains 261 and 262, AELCe showed 20% of activation in MIC test above 2000 µg/mL. MBC showed 100% of efficacy above 2000 µg/mL concentration for all strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Results are shown in table 5.

Table 5 - Evaluation of MIC and MBC values for microorganisms treated with AELCe

After microbiological tests we investigated if AELCe was able to promote cell damage in human cells. For this, human lymphocytes were treated with AELCe in different concentrations to analyze its cytotoxicity power. The cell death test showed that 95% of lymphocytes remained alive after treatment with AELCe in all concentrations analyzed. In 50 µg/mL AELCe induced higher necrosis and in 25 µg/mL induced both apoptosis and necrosis in higher values in relation to control. Apoptotic and necrotic values found to AELCe treated cells were similar to control cells (cells + medium) in 12.5 and 6 µg/mL (Figure 2).

Figure 2: Effects of cell viability of human lymphocytes treated with AELCe in different concentrations. Cells treated with AELCe (95%) remained alive in 24 hours of incubation. Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. # p=0.03

AELCe was unable to stimulate the production of chemokines and results of cytokine production showed that IL-4, IL-6 and IL-17 were not produced by AELCe in treated cells. On the other hand, lymphocytes treated with AELCe at 12.5µg/mL induced higher and significant production of TNF- α (Figure 3A), IL-2 (Figure 3B), IL-10 (Figure 4) and IFN- γ (Figure 5A) cytokines in relation to control. Beyond, lymphocytes treated with AELCe also released nitric oxide (Figure 5B).

Figure 3: Profile of TNF- α and IL-2 production promoted by AELCe on human lymphocytes cultures in 24 hours of assay. **A** - AELCe was able to produce higher TNF- α in relation to control cells. **B** - Significant values of IL-2 production were observed in cultures treated with AELCe in relation to control cells. Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. #P= 0.03

Figure 4: Profile of IL-10 cytokine production promoted by AELCe in human lymphocytes in 24 hours of assay. AELCe was able to induce higher IL-10 production in stimulated cells in relation to control cells. Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. #P <0.02.

Figure 5: IFN- γ production and NO release promoted by AELCe on human lymphocytes cultures in 24 hours of assay. **A** - IFN- γ was produced in higher values by human lymphocytes stimulated by AELCe at 12.5 ug/mL (#P= 0.03) and this production was sufficient to stimulate NO release. **B** - AELCe induced higher NO release in relation to control (#P= 0.01). Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate.

Assays were performed to analyze the capacity of AELCe to induce proliferation, activation or inhibition of T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes subsets. Results showed that AELCe induced activation (Figure 6B) and proliferation (Figure 6A) of the T CD8⁺ lymphocytes.

Figure 6: Assays of proliferation, activation and inhibition induced by AELCe in T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes subsets, *in vitro*. **A** - Total lymphocyte count showed that T CD8⁺ lymphocytes subsets present higher values in relation to control cells (#P= 0.01); **B** - Activation study showed that T CD8⁺ lymphocytes subsets were more activated than control cells (#P= 0.01). Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate.

4. Discussion

The AELCe presented in its composition several classes of secondary metabolism compounds, such as 3',4'-OH flavonoid, phenylpropanoglycosides, saponins, polymeric proanthocyanidins and hydrolysable tannins. In addition, the analysis performed through the HPLC identified eighteen unknown compounds when compared to the available standards, some of them or the association of them responsible for the biological activity of this extract. In fact, the aqueous extract presented polyphenols among other components (Nascimento et al., 2016) supporting the hypothesis that the extract may exhibit immunomodulatory properties when evaluated *in vitro*.

Phytochemical composition and pharmacological properties of *Conocarpus erectus* has been studied since many years ago (Irvine, 1961; Hayashi and Thonson, 1975; Bastos, 1995). Phenolic compounds especially tannins are the major components of this species (Abdel-Hameed et al., 2012). Most of these studies have investigated mainly its antimicrobial and antioxidant properties (Raza et al., 2016; Shohayeb et al, 2013; Abdel-Hameed et al., 2014; Abdel-Hameed et al., 2012). These compounds have been effective in many health related properties such as antimicrobial, antiviral activities and also act in the activation of leukocytes, adhesion, aggregation and platelet secretion (Tohidi et al, 2016, Pan et al., 2010, Chen et al., 2016, Lopes et al., 2000).

Species of plants with therapeutic purposes has been used in several scientific investigations around the world (Valli et al., 2012). Filho and Yunes (1998), emphasizes that plants, in addition to their use in popular medicine for therapeutic purposes, have contributed over the years to obtaining several drugs through the discovery of new compounds, such as morphine, emetin, vincristine, colchicine and rutin.

In the disc diffusion test, AELCe showed antibacterial activity mainly for gram-positive bacteria, *S. aureus*, by paper diffusion method with inhibition halos of 10.66 ± 0.57 , 13.66 ± 0.57 and 14.66 ± 0.57 . According to Estevam et al., (2009), the extracts of plants that formed zones of inhibition ≥ 10 mm are considered active.

Shohayeb et al., 2013, studying alcoholic extracts of leaves, stem, fruit and flower of *C. erectus* collected in Saudi Arabia in Gram-positive, Gram-negative, acid-fast bacteria and fungi by disc diffusion method of agar, also showed antibacterial activity for *Staphylococcus aureus*. In addition, they showed antibacterial activity for *Bacillus subtilis* (Gram-positive), *Mycobacterium pheli* acid-fast and Gram-negative bacteria tested (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonie* and *Pseudomonas aeruginosa*). This fact reinforces the proposal presented by Gobbo-Neto and Lopes (2007) of the need for studies that evaluate the differences in chemical composition between organs of the same plant, different collection moments, different cultivation environments and even different forms of nutrition plant used. Tannins of *C. erectus* have higher activity against bacteria compared to different extracts and suggest that tannins are largely responsible for *C. erectus* antimicrobial activity (Shohayeb et al., 2013). This can be explained by the fact that tannic substances present in plant extracts form an enzymatic complex capable of causing damage to the cell wall and cytoplasm, making it impossible to exchange essential ions for microbial survival (Loguercio et al., 2005; Andrade Jr et al., 2006; Dantas et al., 2016).

According to Holetz et al. (2002) and Regasini et al. (2010), extracts of plants with antimicrobial activity with MIC and MBC values between 100-500 $\mu\text{g/mL}$ have moderate activity, between 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$, the activity is considered weak and the extracts of plants with MIC and MBC in 2000 and above 2000 $\mu\text{g/mL}$ are considered inactive. Results showed that AELCe presented moderate antimicrobial activity.

The methanolic extract of different parts of *C. erectus* (leaf, stem, fruit and flower), fractionated with chloroform, ethyl acetate and n-butanol was also evaluated for its antimicrobial activity. The fraction of ethyl acetate was the most potent among the other fractions with MICs of 210 $\mu\text{g/ml}$, 330 $\mu\text{g/ml}$, 420 $\mu\text{g/ml}$ and 330 $\mu\text{g/ml}$ for *S. aureus*, *B. Subtilis*, *P. aeruginosa* and *M. pheli*, respectively (Abdel-Hameed et al., 2013). This is very interesting considering that *P. aeruginosa* and *M. pheli* are known to be less susceptible to antimicrobials including antibiotics, preservatives, antiseptics and disinfectants (Mcdonnell and Russell, 1999).

Results of this study, performed by cytometry assay, showed that aqueous extract of *C. erectus* did not induce cellular damage in human lymphocytes from concentration of

12.5µg/mL to below. Some studies were carried out to analyze cytotoxic activity of species of Combretaceae family. Ethanol extract of stem bark of *Terminalia catappa* L. did not show cell damage when tested, in increasing concentrations (5 to 100 µg/mL) against RAW 264.7 cells (Abiodun et al., 2016) and two fractions of acidic polysaccharides isolated from *Combretum racemosum* also did not induce deleterious effect on the viability of PBMC or MonoMac-6 cells when tested in 10 to 250µg/ml concentrations (Schepetkin et al., 2013). Lacouth-Silva et al. (2015) showed that a triterpene called lupine isolated from *Combretum leprosum* Mart. showed cytotoxicity against PBMC and it can be used only in concentrations below 1.5µg/mL. The divergence between these findings can be explained by the difference of techniques used in the tests carried out in these studies, i.e., MTS assay, Luminescent cell viability assay and MTT assay, respectively.

Cytokines are released by different cells of the host to stimulate and regulate other cells via specific receptors which participate in the control of all immunologically relevant events as the activation, differentiation, maturation, proliferation and apoptosis induction (Thomas, 1998). These immune proteins can influence the quantitative, as well as the qualitative outcome of immune response (Aher and Wahi, 2011).

Results of this study showed that AELCe activated T CD8⁺ lymphocytes subsets, induced the proliferation of these immune cells and promoted Th1 response through high production of IL-2, TNF-α, IFN-γ cytokines and nitric oxide in human PBMC stimulated *in vitro*. IL-10 has an essential role of protecting the host from exaggerated inflammatory responses to pathogens, produced by T cells (Palomares et al., 2014). Although IL-10 was also produced in high values, the pro-inflammatory status was prevalent in our findings and the presence of IL-10 may explain the inability of aqueous extract of *C. erectus* to stimulate the production of chemokines observed in our results.

Few studies investigating biological activities of *C. erectus* are found in literature, studies investigating species of Combretaceae family showed immunomodulatory actions promoted by different extracts. *Terminalia arjuna* showed immunomodulatory effect when used as adjuvant therapy in coronary artery disease (Kapoor et al., 2015). Extracts and pectins from *Terminalia macroptera* showed complement fixation activities (Zou et al., 2014; Zou et al., 2015), polysaccharides isolated from the leaves of *Combretum racemosum* induced the production of interleukin IL-10 and TNF-α in PBMC and MonoMac-6 monocytic cells (Schepetkin et al., 2013) and extract of *Terminalia chebula* also induced immunomodulatory changes as spleen lymphocyte proliferation and increase of expression of the IL-2, TNF-α and IL-10 cytokines in male wistar rats (Aher and Wahi, 2011).

The Th1 profile is very interesting in first 48 hours of wound healing when leukocyte recruitment is necessary on lesion area. In this phase, called pro-inflammatory stage, the role of immunological cells and their chemical products are fundamental to efficient repair. In fact, many studies have been shown healing effect promoted by extract of different species of Combretaceae family. *Terminalia catappa* ointment promotes significant wound healing in rats (Khan et al., 2014), ethanol extract of *Terminalia chebula* accelerating wound healing in burn wounds of rats (Nasiri et al., 2015), semi-purified fraction containing gallic acid from *T. chebula* showed anti-aging activities (Manosroi et al., 2011) and ethanol fruit extract of this same plant is an efficacious pharmaceutical protectant of skin against UVB-photodamage (Yakaew et al., 2016). The immunomodulatory results added to the knowledge of the antimicrobial tests of our study suggest that EAFCe may be effective in wound healing, but *in vivo* studies are needed to clarify the alternative therapeutic potential of this plant.

5. Conclusion

Aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* (AELCe) at 12.5 ug/mL concentration was able to promote immunomodulation in human PBMC through T CD8⁺ lymphocytes subsets activation and proliferation, TNF- α , IL-2, IL-10 and IFN- γ cytokines production and nitric oxide release. These findings showed a safety dose of the extract and provided an initial understanding of *in vitro* immunological response promoted by AELCe.

8 Acknowledgements

We would like to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the grant of a master's degree scholarship during the entire research period. The authors are deeply grateful for the technical assistance of Mr. Mineo Nakazawa of Immunoparasitology Laboratory of Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Pernambuco, Brazil.

9 References

- Abdel-Hameed, E.S., Bazaid, S.A., Shohayeb, M.M., 2014. RP-HPLC–UV–ESI-MS phytochemical analysis of fruits of *Conocarpus erectus* L. *Chemical Papers*. 68, 1358–1367.
- Abdel-Hameed, E.S., Abdel, S.A.B., Sabra, N.A., 2013. Protective effect of *Conocarpus erectus* Extracts on CCl₄-Induced chronic liver injury in mice. *Glob. Jour. of Pharmacology*. 7, 52-60.
- Abdel-Hameed, E.S., Bazaid, S.A., Shohayeb, M.M., El-Sayed, M.M., El-Wakil, E.A., 2012. phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants*. 2, 93-112.
- Abiodun, O.O., Nogales, A.R., Algieri, F., Caravaca, A.M.G., Carretero, A.S., Utrilla, M.P., Cabezas, M.E.R., Galvez, J. 2016. Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and in vivo evidences. *Journal of Ethnopharmacology*. 192, 309-319.
- Aher, V., Wahi, A., 2011. Immunomodulatory activity of alcohol extract of *Terminalia chebula* Retz Combretaceae. *Tropical Journal of Pharmacology Research*. 10, 567-575.
- Andrade JR, R.G., Ginani, J.S., Lopes, G.K.B., Dutra, F., Alonso, A., Hermes-Lima, M., 2006. Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochimie*, 88, 1287-1296.
- Ayoub, N.A. 2010. A trimethoxyellagic acid glucuronide from *Conocarpus erectus* leaves: Isolation, characterization and assay of antioxidant capacity. *Pharmacology Biology*., 48, 328-332.
- Bandeira, A.R.G., 2003. Estudo fitoquímico e a atividade biológica de *Conocarpus erectus* L. (Mangue Botão). 2003. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE. 92 f.
- Bashir, M., Uzair, M., Chaudhry, B.A., 2015. A review of phytochemical and biological studies on *Conocarpus erectus* (Combretaceae). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Research*. 1, 1-8.
- Bastos, M.N., 1995. A importância das formações vegetais da restinga e do manguezal para as comunidades pesqueiras. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, série Antropologia*. 11, 41-56.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Shevis, J.C., 1966. Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal Clinical Pathology*. 45, 493-496.
- Brasseur and Angenot., 1986. Un Reactif De Choix Pour La Revelation Des Flavonoïdes: Le Melange Diphenylborate D'aminoethanol -Peg 400. *J. Chromatography*. 351, 351-355.
- Carneiro, D.B., Barboza, M.S.L., Menezes, M.P., 2010. Plantas nativas úteis na Vila dos pescadores da reserva extrativista marinha Caeté-Taperaçu, Pará, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*. 24, 1027-1033.
- Chen, X-M., Tait, A.R., Kitts, D.D., 2016. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*, 218, 15-21.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)., 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA. 23rd informational supplement, M100-S23.

Dantas, V.M.C., Medeiros, K.L., Azevêdo, T.K.B., Santana, G.M., Pereira, A.V., Góis, M.B., Pereira, M.S.V., Pereira, J.V., 2016. Taninos: principal componente do extrato *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke inibe o crescimento de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. *Biotemas*. 29, 109-114.

Dey, A., Gorai, P., Mukherjee, A., Dhan, R., Modak, B.K., 2016. Ethnobiological treatments of neurological conditions in the Chota Nagpur Plateau, India. *Journal of Ethnopharmacology*. 198, 33-44.

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

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

Filho, V.C., Yunes, R.A., 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*. 21, 99-105.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 30, 371-81.

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

Hayashi, T., Thomson, R.H., 1975. New lignans in *Conocarpus Erectus*. *Phytochemistry*. 14, 1085-1087.

Helfenstein, A., Tammela, Päivi, 2016. Analyzing user-generated online content for drug discovery: development and use of med-crawler. *Bioinformatics Advance Access*. <http://10.1093/bioinformática/btw782>.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., Dias-Filho, B.P., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*. 97, 1027-1031.

Irvine, F.R., 1961. *Woody plants of Ghana with special reference to their uses*. Oxford University. Press, London.

Kapoor, D., Tripathi, D., Vijayvergiya, R., Parashar, K.K., Kaul, D., Dhawan, V. 2015. Short-term adjuvant therapy with *Terminalia arjuna* attenuates ongoing inflammation and immune imbalance in patients with stable coronary artery disease: in vitro and in vivo evidence. *Journal of Cardiovascular. Trans. Res*. 8, 1173-1186.

Khan, A.A., Kumar, V., Singh, B.K., Singh, R. 2014. Evaluation of wound healing property of *Terminalia catappa* on excision wound models in Wistar rats. *Drug Research. (Stuttg)*. 64, 225-228.

Lacouth-Silva, F., Xavier, C.V., Setúbal, S.S., Pontes, A. S., Nery, N.M., Castro, O.B., Fernandes, C. F. C., Honda, E. R., Zanchi, F.B., Calderon, L.A., Stábeli, R.G., Soares. A. M.,

- Jardim, I.S., Facundo, V.A., Zuliani, J.P., 2015. 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*. 15, 1-10.
- Linsingen, L.V., Cervi, A.C., Guimarães, O., 2009. Sinopse taxonômica da família combretaceae R. Brown na Região Sul do Brasil. *Acta Botânica Brasilica*. 23, 738-750.
- Loguercio, A.P., Battistin, A., Vargas, A.C., Henzel, A., Witt, N.M., 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, 35, 371-376.
- Lopes R.M., Oliveira T.T., Nagem T.J., Pinto A.S., 2000. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*. 17, 18-22.
- Manosroi, A., Jantrawut, P., Akihisa, T., Manosroi, W., Manosroi, J. 2011. In vitro and in vivo skin anti-aging evaluation of gel containing niosomes loaded with a semi-purified fraction containing gallic acid from *Terminalia chebula* galls. *Pharmaceutical Biology*. 49, 1190-1203.
- McDonnell, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology. Rev.* 12, 147-179.
- Modak, B.K., Gorai, P., Dhan, R., Mukherjee, A., Dey, A., 2015. Tradition in treating taboo: Folkloric medicinal wisdom of the aboriginals of purulia district, West Bengal, India against sexual, gynaecological and related disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 169, 370-386.
- Nascimento, D.K.D., Souza, I.A., Oliveira, A.F.M., Barbosa, M.O., Santana, M.A.N., Júnior, D.F.P., Lira, E.C., Vieira, J.R.C., 2016. Phytochemical screening and acute toxicity of aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus in Swiss Albino Mice. *Acadêmia Brasileira de Ciências* 88, 1431-1437.
- Nasiri, E., HosseiniMehr, S.J., Azadbakht, M., Akbari, J., Enayati-Fard, R., Azizi, S. 2015. The effect of *Terminalia chebula* extract vs. silver sulfadiazine on burn wounds in rats. *Journal of Complementary Integrative Medicine*. 12,127-135.
- Palomares, O., Martín-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cakaytar, O., Akdis, M., Akdis, C.A., 2014. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes and Immunity*. 15, 511-520.
- Pan, M.-H., Lai, C.-S., e Ho, C.-T., 2010. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Function*. 1, 15-31.
- Raza, M.A., Anwar, F., Shahwar, D., Majeed, A., Mumtaz, M.W., Danish, M., Nazar, M.F., Perveen, I., Khan, S.U., 2016. Antioxidant and antiacetylcholine esterase potential of aerial parts of *Conocarpus erectus*, *Ficus variegata* and *Ficus maclellandii*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 29, 489-495.
- Regasini, L.O., Pivatto, M., Scorzoni, L.; Benaducci, T., Almeida, A.M., Giannini, M.J.S.M., Barreiro, E.J., Silva, D.H.S., BOLZANI, V.S., 2010. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20, 706-711.

Roberts, E.A.H., Cartwright, R.A., Oldschool, M., 1957. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 8, 72-80.

Schepetkin, I.A., Kouakou, K., Yapi, A., Kirpotina, L.N., Jutila, M.A., Quinn, M.T. 2013. Immunomodulatory and hemagglutinating activities of acidic polysaccharides isolated from *Combretum racemosum*. *International Immunopharmacology*. 15, 628-637.

Shohayeb, M.M., Abdel-Hameed, E.S., Bazaid, S.A., 2013. Antimicrobial activity of tannins and extracts of different parts of *Conocarpus Erectus* L. *Biological Sciences*. 3, 544-553.

Silva, M.R.O., 2004. Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá-PE. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE. 49 f.

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

Teixeira, A.H., Bezerra, M.M., Chaves, H.V., Val, D.R., Filho, S.M.P., Silva, A.A.R. 2014. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. *SANARE*. 13, 23-28.

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

Tohidi, B., Rahimmalek, M., Arzani, A., 2016. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220, 153-161.

Valli, M., Pivatto M., Danuello, A., Castro-Gamboa, I., Silva, D.H.S., Cavaleiro, A.J., Araújo, A.R., Furlan, M., Lopes, M.N., Bolzani, V.S., 2012. tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? *Química Nova*. 35, 2278-2287.

Wagner H.; Bladt, S. 1996. Plant drug analysis -A thin layerchromatography atlas. Springer. 2.ed. Munich.

Yakaew, S. Itsarasook, K., Ngoenkam, J., Jessadayannamaetha, A., Viyoch, J. Ungsurungsie, M. 2016. Ethanol extract of *Terminalia chebula* fruit protects against UVB-induced skin damage. *Pharmacology Biology*. 54, 2701-2707.

Zou, Y.F., Barsett, H., Ho, G.T.T., Inngjerdingen, K.T., Diallo, D., Michaelsen, T.E., Paulsen, B.S. 2015. Immunomodulating pectins from root bark, stem bark, and leaves of the Malian medicinal tree *Terminalia macroptera*, structure activity relations. *Carbohydrate Research*. 403, 167-173.

Zou, Y.F., Ho, G.T.T., Malterud, K.E., Le, N.H.T., Inngjerdingen, K.T., Barsett, H., Diallo, D., Michaelsen, T.E., Paulsen, B.S. 2014. Enzyme inhibition, antioxidant and immunomodulatory activities, and brine shrimp toxicity of extracts from the root bark, stem bark and leaves of *Terminalia macroptera*. *Journal of Ethnopharmacology*. 155, 1219-1226.

Table 1. Metabolites eluting system developers and used for photochemical screening of the aqueous extract of *Conocarpus erectus* L.

Class of secondary metabolites	Patterns	Elution System	Developer	References
Flavonoids and phenylpropano-glycosides	Quercetin, Rutine and Chlorogenic Acid	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt, 1996 Brasseur & Angenot, 1986
Triterpenes and steroids	β-sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Saponins	-	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Monoterpenes and sesquiterpenes	thymol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
Coumarins and Quinones	Coumarin and Lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner & Bladt, 1996
Alkaloids	Pilocarpine	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	xWagner & Bladt, 1996
Condensed proanthocyanidins	Catechin	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanillin hydrochloric	Roberts et al., 1957
Hydrolysable tannins	Gallic acid	n-BuOH-H ₂ O-AcOH (40:50:10 v/v)	Iron alum 1%	Stiasny, 1912

Table 2 - Microorganisms used for the antimicrobial test

Microorganisms (Collection)	Number Id. of UFPEDA	Origin site	Antibiotics Resistance
<i>Staphylococcus aureus</i>	679	Infected Wound	Erythromycin, Clindamycin, Penicillin.
	700	Ulcer secretion	Erythromycin, Clindamycin
	719	Surgical wound secretion	Erythromycin, gentamicin, Ciprofloxacin, Sulfamethoxazole+trimethoprim, Chloramphenicol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	261	Surgical wound secretion	Azetreonam, Cefepime, Gentamicin, Imipenem, Ceftazidime, Piperacillin + tazobactam
	262	Surgical wound secretion	Imipenem, Meropenem, Ceftazidime

UFPEDA = Collection of Microorganisms of the Department of Antibiotics of UFPE.

Table 3. Phytochemical analysis of the aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* (AELCe) obtained by thin layer chromatography (TLC)

Class of secondary metabolites	Aqueous extract of leaves of <i>Conocarpus erectus</i> L.
Flavonoids	+ ¹
Phenylpropanoglycosides	+
Triterpenes	-
Steroids	-
Saponins	++
Monoterpenes and sesquiterpenes	-
Alkaloids	-
Coumarins	-
Quinones	-
Proanthocyanidins and Leucoanthocyanidins	++ ³
Hydrolysable tannins	++

Legend: (-) absent; (+) weak; (++) medium; (+++) strong; ¹ 3', 4'-OH Flavonoids; ² 3'-OH Flavonoids; ³ Polymeric proanthocyanidins

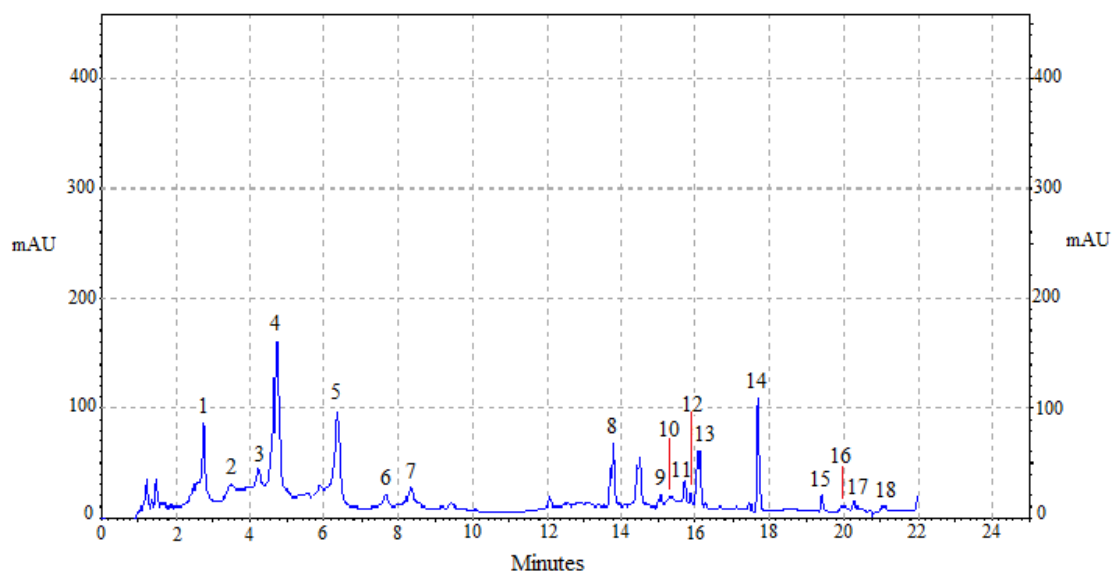


Figure 1: RP-HPLC-DAD (256 nm) chromatogram of major compounds identified in the AELCe by the retention time in minutes; (1) 2.753; (2) 3.487; (3) 4.240; (4) 4.727; (5) 6.367; (6) 7.660; (7) 8.347; (8) 13.820; (9) 15.093; (10) 15.353; (11) 17.727; (12) 15.900; (13) 16.107; (14) 17.693; (15) 19.433; (16) 19.987; (17) 20.300; (18) 21.093.

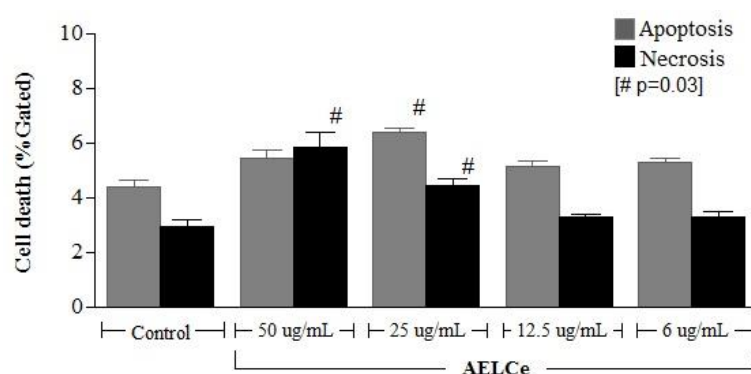


Figure 2: Effects of cell viability of human lymphocytes treated with AELCe in different concentrations. Cells treated with AELCe (95%) remained alive in 24 hours of incubation. Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. # p=0.03

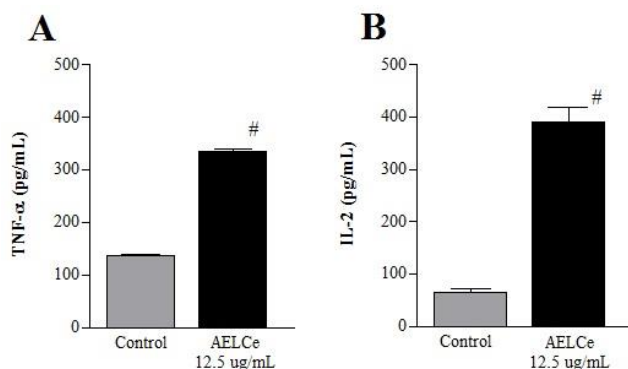


Figure 3: Profile of TNF- α and IL-2 production promoted by AELCe on human lymphocytes cultures in 24 hours of assay. **A** - AELCe was able to produce higher TNF- α in relation to control cells. **B** - Significant values of IL-2 production were observed in cultures treated with AELCe in relation to control cells. Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. #P= 0.03

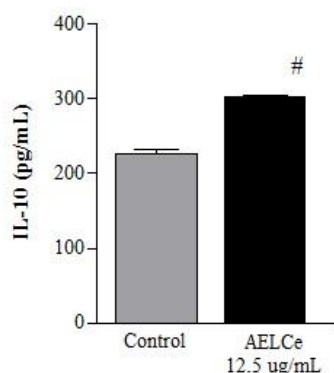


Figure 4: Profile of IL-10 cytokine production promoted by AELCe in human lymphocytes in 24 hours of assay. AELCe was able to induce higher IL-10 production in stimulated cells in relation to control cells. Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. #P <0.02.

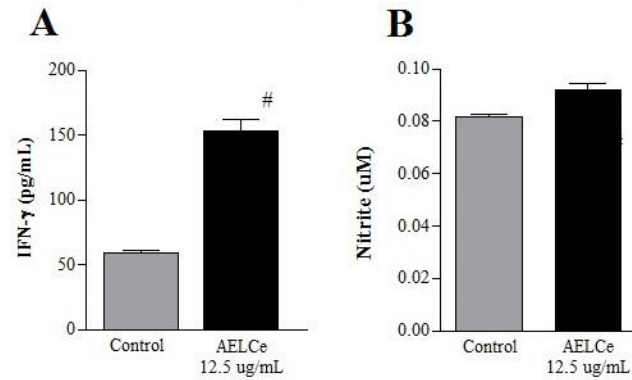


Figure 5: IFN- γ production and NO release promoted by AELCe on human lymphocytes cultures in 24 hours of assay. **A** - IFN- γ was produced in higher values by human lymphocytes stimulated by AELCe at 12.5 ug/mL ($\#P= 0.03$) and this production was sufficient to stimulate NO release. **B** - AELCe induced higher NO release in relation to control ($\#P= 0.01$). Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate.

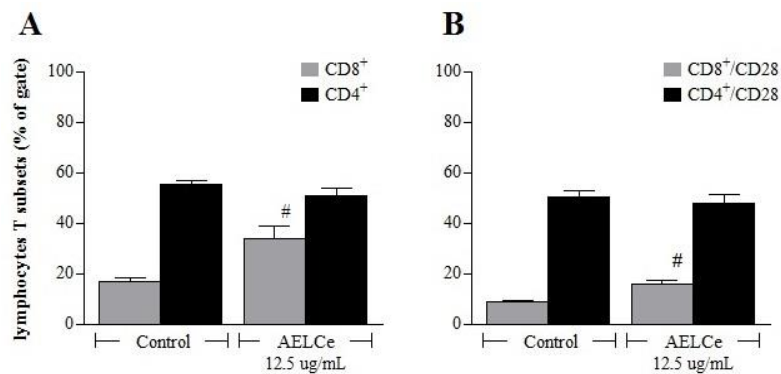


Figure 6: Assays of proliferation, activation and inhibition induced by AELCe in T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes subsets, *in vitro*. **A** - Total lymphocyte count showed that T CD8⁺ lymphocytes subsets present higher values in relation to control cells ($\#P= 0.01$); **B** - Activation study showed that T CD8⁺ lymphocytes subsets were more activated than control cells ($\#P= 0.01$). Horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate.

ANEXO A JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY – GUIDE FOR AUTHORS

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the

research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the **headings *Ethnopharmacological relevance, Aim of the study, Materials and Methods, Results, and Conclusions.*** Click [here](#) to see an example.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found [here](#).

In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information.

Plant names

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with <http://www.theplantlist.org> mentioning the data of accessing that website.

In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
 TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "*Personal communication*" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James

D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-ethnopharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1.
<http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

RESEARCH DATA

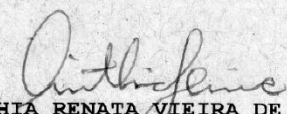
This journal encourages and supports you to share data that underpins your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that are necessary to validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data and materials (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Once you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to databases that give them a better understanding of the research described.

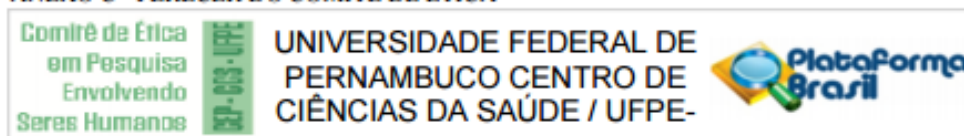
To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, this gives you the opportunity to indicate why. You can also include an email address so readers can request data that is unavailable for publication or under embargo. If you submit [this form](#) with your manuscript as a supplementary file, the statement will appear next to your published article on ScienceDirect. For more information on transparency for research data, visit the [xxx page](#).

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

	 Agência Estadual de Meio Ambiente GOVERNO DE PERNAMBUCO
CA DRFB Nº 120/2014	24 de outubro de 2014.
 Ao Senhor JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA	
 Prezado Senhor,	
 Cumprimentando Vossa Senhoria, nos reportamos ao Processo CPRH nº 013520/2014, referente ao requerimento para realização de atividades de pesquisa na APA de Santa Cruz e na APA Estuarina de Santa Cruz, sendo o local de coleta às margens do Canal de Santa Cruz e Rio Paripe, próximo a Vila Velha, Ilha de Itamaracá - PE.	
 Após análise da documentação apresentada vimos informar que o projeto "Tecnologia Morfológica Aplicada à Inovação Terapêutica: Uma Perspectiva de Investigação de Produtos Naturais da Região de Mangue" foi aprovado, estando autorizada a realização da citada pesquisa. No entanto, em caso de realização de atividades em áreas particulares, estas somente poderão ocorrer mediante a anuência do proprietário das terras. Salientamos ainda, que esta autorização permite as atividades de campo e coleta de material para estudo, entretanto, o acesso ao patrimônio genético deverá ser autorizado pelos órgãos competentes.	
 Informamos que a Unidade de Conservação APA de Santa Cruz possui sede e administração local, desta forma, caso haja necessidade de apoio para a realização das atividades de campo, faz-se necessário contato prévio com a equipe de gestão da Unidade.	
 Atenciosamente,	
 CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA Diretoria de Recursos Florestais e Biodiversidade	

ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO C - PERECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação imunológica e antitumoral de compostos naturais extraídos de plantas

Pesquisador: Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62119716.5.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.870.360

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto a ser desenvolvido no departamento de antibióticos desta universidade a ser conduzido pela pesquisadora Cristiane Moutinho Lagos de Melo e oito colaboradores com desenvolvimento das atividades no Laboratório de Imunoparasitologia - LIMP, Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz - Pernambuco (CPqAM/FIOCRUZ - PE). No presente projeto, compostos naturais como lectinas, inibidores de proteases e frações isoladas de extratos de plantas serão investigados in vitro quanto à sua ação imunológica e antitumoral frente a linhagens decélulas normais e cancerígenas humanas.

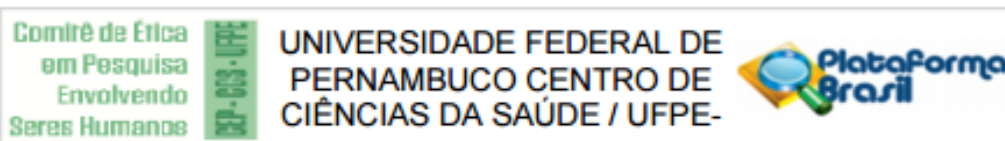
Objetivo da Pesquisa:

Investigar in vitro mecanismos celulares e moleculares de novos compostos naturais candidatos a fármacos imunomoduladores e antitumorais.

Avaliar em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano a atividade citotóxica de compostos naturais;

Determinar in vitro a atividade antitumoral das substâncias avaliadas sobre as linhagens de células cancerígenas JURKAT (câncer de próstata) e MDA MB231 (câncer de mama);

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.870.360

Investigar in vitro a liberação de cálcio citosólico e mitocondrial promovida pelos compostos;

Investigar in vitro a liberação de Espécies Reativas de Oxigênio promovida pelos compostos;

Determinar in vitro a liberação de Citocromo c e ativação das Caspases 8, 9 e 3 promovidas pelos compostos;

Quantificar a produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-4, IL-12, TNF-e TGF- nos sobrenadantes de cultura de PBMC humano e de linhagens celulares tumorais após estimulação in vitro com os compostos;

Investigar a viabilidade celular das células tumorais tratadas in vitro com os compostos avaliados.

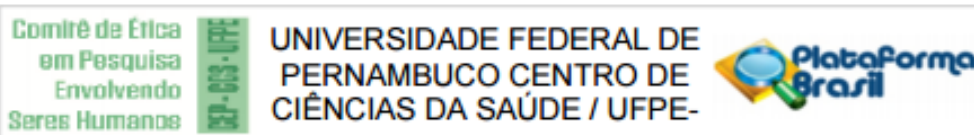
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No caso deste projeto de pesquisa os riscos devem ser considerados mínimos, uma vez que para os experimentos de imunomodulação desses projetos estamos requerendo apenas aliquotas sanguíneas de doadores voluntários sadios, para que possamos isolar os linfócitos e testar os compostos isolados in vitro. Neste procedimento acreditamos ser possível haver apenas um desconforto, especialmente psicológico, com a retirada de sangue do voluntário, assim como acontece em um hemograma comum prescrito por um médico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os compostos serão isolados por alguns grupos de pesquisa no estado de Pernambuco, provenientes do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco e Departamento de Biofísica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Além disso, outras atividades biológicas desses compostos já vêm sendo investigadas no Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZPE. A pretensão desse estudo é investigar novos fármacos naturais potencialmente imunomoduladores e antitumorais, elucidando parte de seu mecanismo de ação de indução de morte celular. Os resultados deste projeto, se bem sucedido, nos permitirá chegar a uma adequada eleição de protótipos a fármacos antitumorais e imunomoduladores, bem como contribuir para o entendimento do mecanismo de ação destas classes de moléculas, aspectos que são cruciais para a inovação terapêutica. A pretensão inicial é a busca de autênticos compostos naturais candidatos a novos fármacos antitumorais, planejados para atuarem de maneira alvo-específica. Isso significa que os resultados

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.870.360

obtidos poderão permitir novos avanços nas estratégias imunoquimioterápicas e profiláticas (tanto a nível regional como mundial).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto tem um orçamento de R\$ 15.750,00 e todos os itens encontram-se já adquiridos e recebidos pelos pesquisadores. O cronograma tem previsão para a coleta das amostras em dezembro de 2016 e janeiro de 2017. O projeto apresenta viabilidade para a realização com a estrutura dos laboratórios citados. Os compostos serão isolados por alguns grupos de pesquisa no estado de Pernambuco, provenientes do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco e Departamento de Biofísica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Apresentou carta de anuência do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE e do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

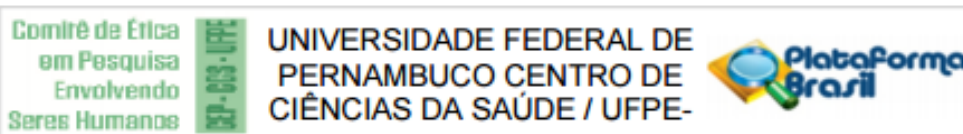
As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.870.360

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_778348.pdf	10/12/2016 00:41:11		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Emanuel.jpeg	10/12/2016 00:40:47	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_de_anuencia_projeto_humanos.pdf	10/12/2016 00:40:32	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Outros	resposta_ao_parecerista.docx	10/12/2016 00:40:05	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_final.docx	10/12/2016 00:39:13	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.doc	10/12/2016 00:38:58	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Outros	termo_confidencialidadecristiane.docx	18/11/2016 12:14:31	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Folha de Rosto	FRCRISTINEMOUTINHO.doc	18/11/2016 12:04:02	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Vanessa.pdf	17/11/2016 23:22:29	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Leydianne.pdf	17/11/2016 23:22:17	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Jessica.pdf	17/11/2016 23:22:04	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Gleza.pdf	17/11/2016 23:21:54	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Dayane.pdf	17/11/2016 23:21:40	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Camila.pdf	17/11/2016 23:21:30	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos CEP - 003 - UFPE	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
---	--	---

Continuação do Parecer: 1.870.360

Outros	Curriculo_Bruno.pdf	17/11/2016 23:20:20	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Outros	Curriculo_Barbara.pdf	17/11/2016 23:19:58	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Outros	lattes_cristiane.pdf	16/11/2016 02:07:15	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_de_anuencia_virginia.jpg	16/11/2016 02:05:46	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_de_anuencia_thiago.jpg	16/11/2016 02:05:33	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 16 de Dezembro de 2016

Assinado por:

LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br