EXTRATOS DAS FOLHAS E CASCAS DE *RHIZOPHORA MANGLE*: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA EM MACRÓFAGOS NUM CENÁRIO DE PROFILAXIA ANTI-INFLAMATÓRIA

RHIZOPHORA MANGLE BARK AND LEAVES EXTRACTS: ANTIOXIDANT AND IMMUNOMODULATORY ACTIVITY IN MACROPHAGES IN AN ANTI-INFLAMMATORY PROPHILAXY SCENARIO

Murillo Alessandro do Nascimento[1, 2, *], Andrews Oliveira Borges.[3,4], Pedro Nobre Azevedo. [3,4], Luiz Felipe Marques Rodrigues.[4], Carlos Arterio Sorgi.[1,3,4], Luciana Lopes Guimarães [2]

E-mail de contato: *murillonascimento@usp.br

[1] Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil [2] Universidade Santa Cecília (Unisanta), Santos, São Paulo, Brasil. [3] PPGIBA, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil. [4] Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO – Os manguezais são ecossistemas ricos em diversos componentes fitoquímicos de atividade biológica relevante. O "mangue vermelho" (Rhizophora mangle) contém diversos compostos fitoquímicos associados à diversas atividades biológicas, o que contribui para sua utilização na medicina popular como anti-inflamatório, antibacteriano, antioxidante e antipirético. Neste estudo, foram avaliadas as atividades antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica dos extratos das folhas e cascas de R. mangle, utilizando os ensaios de viabilidade celular (MTT), potencial antioxidante pela reação com DPPH e quantificação da citocina pró-inflamatória IL-1β. Os resultados demonstraram uma atividade antioxidante dose-dependente, uma diminuição da viabilidade celular e pouca influência na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, criando espaço para uma nova abordagem no que diz respeito às atividades biológicas dos extratos e seu possível papel em linhagens celulares tumorais.

Palavras-chave**:** Mangue vermelho; antioxidante; anti-inflamatório; citotoxicidade.

ABSTRACT – Mangroves are ecosystems rich in several phytochemical components of relevant biological activity. The "red mangrove" (Rhizophora mangle) contains several phytochemical compounds associated with various biological activities, which contributes

to its use in folk medicine as an anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant and antipyretic. In this study, the antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of R. mangle leaf and bark extracts were evaluated, using cell viability (MTT), antioxidant potential by reaction with DPPH and quantification of the pro-inflammatory cytokine IL-1β. The results demonstrated a dose-dependent antioxidant activity, a decrease in cell viability, and little influence on the reduction of pro-inflammatory cytokine production, creating space for a new approach with regard to the biological activities of the extracts and their possible role in tumor cell lines.

*Keywords**:** Red mangrove; antioxidant; anti-inflammatory; cytotoxicity.*

1 INTRODUÇÃO

Popularmente conhecida como “mangue vermelho”, a espécie *Rhizophora mangle* (família *Rhizophoraceae*, gênero *Rhizophora*) se destaca por suas propriedades etnobotânicas, comumente utilizadas em diferentes partes do mundo devido à sua ampla distribuição geográfica em regiões tropicais e subtropicais (Regalado et al., 2016). Os manguezais são ecossistemas costeiros extremamente ricos em espécies que contêm inúmeros compostos de atividade biológica de interesse farmacológico. O mangue vermelho é rico em diversos compostos de diferentes classes fitoquímicas como alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos. terpenos, saponinas e esteroides. Existe uma quantidade expressiva de atividades atribuídas à diversidade de componentes presentes nesta espécie, sendo utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, antibacteriano, antioxidante e antipirético (Kalasuba et al., 2023)

Os compostos fenólicos, como catequina e epicatequina, triterpenos e taninos são moléculas reconhecidas por suas propriedades antioxidantes, com alto grau de hidroxilação, atuando na prevenção da oxidação de moléculas impedindo sua interação com espécies reativas de oxigênio (*ROS - reactive oxygen species)*. A atividade antioxidante corrobora com diversos efeitos farmacológicos, o que confere à *R. mangle* atividade hipoglicemiante, anti-câncer, bactericida, antifúngico e hipolipemiante. Um dos principais ensaios empregados na determinação dessa atividade envolve a reação de sequestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Damm et al., 2023).

Um dos principais constituintes que podem ser obtidos das cascas de *R. mangle* são os taninos, que variam numa proporção de 15 a 36%. (Berenguer et al., 2006). Com isso, os componentes fitoquímicos são importantes na redução de radicais livres, moléculas produzidas durante processos fisiológicos como respiração, fagocitose e metabolismo de ácidos graxos. Em plantas, as *ROS* são formadas normalmente durante o crescimento e metabolismo, com isso, os

compostos bioativos em plantas de manguezal são produzidos em resposta à formação de radicais em diferentes condições, podendo ser utilizados como fonte rica no tratamento de diversas doenças que possuem envolvimento dessas espécies reativas como parte da patogênese (Thatoi et al., 2014).

Apesar das atividades biológicas de diversas espécies vegetais serem descritas e consolidadas, existe uma escassez no que diz respeito à *R. mangle* e seu papel na modulação da inflamação. Em estudos de Vinod Prabhu & Guruvayoorappan (2012), foram avaliadas as atividades anti-inflamatória e anti-tumoral do extrato metanólico de *Rhizophora apiculata*, onde demonstraram a redução da inflamação em edemas induzidos por carragenina em camundongos.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo preencher a lacuna no tocante à atividade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* dos extratos etanólicos obtidos das folhas e cascas de *Rhizophora mangle*, utilizando um cenário de tratamento profilático seguido de estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos diferenciados da linhagem THP-1.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras vegetais foram coletadas na zona de manguezal do Parque Ézio Dall' Acqua (23°59'12.0"S 46°24'11.8"W), no município de Praia Grande, São Paulo. Posteriormente, foi realizada a identificação no Herbário da Universidade Santa Cecília e registro em exsicatas sob o número HUSC-15733. As folhas e cascas foram secas em estufa, na temperatura máxima de 45ºC e trituradas. As cascas e folhas secas e trituradas foram submetidas à extração por turbólise com etanol absoluto grau UHPLC utilizando um aparelho Ultraturrax a 4000 rpm durante 10 minutos.

Os ensaios para avaliação do potencial antioxidante foram realizados utilizando o reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), um radical livre estável que é eliminado na presença de substâncias antioxidantes. Os resultados expressos em percentual de atividade antioxidante foram obtidos após 30 minutos de reação, utilizando um leitor de microplacas (espectrofotômetro) com o comprimento de onda de $\lambda = 517$nm.

Nos ensaios de atividade biológica dos extratos vegetais, utilizou-se células da linhagem celular monocítica humana THP-1. As células foram cultivadas em placa de 96 poços em meio *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) *High Glucose* suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e uma mistura de antibiótico + antimicótico. Após 24 horas em estufa de

cultura (temperatura de 37ºC; pCO_2 de 5%), o meio de cultura foi trocado e os monócitos foram diferenciados em macrófagos pela adição de 25 ng de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato).

. Os extratos etanólicos filtrados foram secos em concentrador a vácuo (*SpeedVac* SPD 1030, *ThermoScientific*) por duas horas a 35ºC e pressão de 13,5 mTorr, sendo posteriormente ressuspensos em metanol (MeOH) em uma solução-estoque de 20mg/mL. Os tratamentos foram realizados através da diluição da solução estoque em meio de cultura. Os macrófagos foram plaqueados e submetidos aos tratamentos com os extratos de folhas e cascas de *R. mangle* durante o período de 3h, seguido da adição de LPS a 1 μg/mL como estímulo inflamatório por um período de 24h. Ao fim do ensaio, o sobrenadante foi recolhido para a quantificação de interleucina 1β (IL-1β), enquanto as células aderidas à placa foram utilizadas no ensaio de viabilidade celular (MTT).

Para a realização do teste de viabilidade celular, foram adicionados 100 μL de MTT na concentração de 0,5 mg/mL aos poços contendo as células aderidas remanescentes. A placa foi incubada por 4h em estufa (37ºC; pCO_2 de 5%) cobertas com papel alumínio. Ao fim do período de incubação, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) em todos os poços. A leitura foi realizada por espectrofotometria em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 570 nm após 10 min. A quantificação de IL-1β foi realizada utilizando o kit comercial *BD OptEIA™ Set Human IL-1β* (Lote: 4170083). A citocina foi quantificada nas amostras por meio de uma curva padrão de IL-1β, realizada a partir da proteína recombinante e seguindo as recomendações do fabricante.

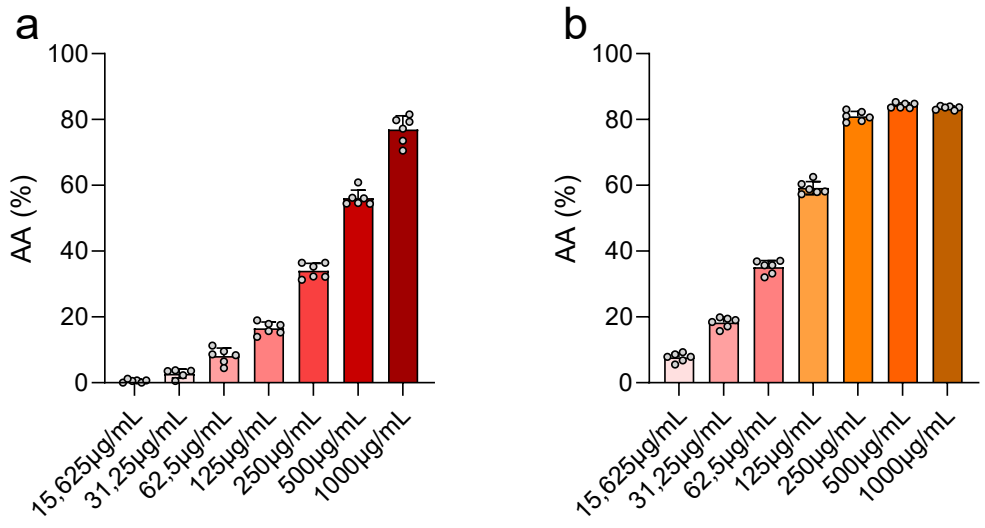
Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular (MTT) foram submetidos à análise estatística por *one-way ANOVA*, comparando os tratamentos em relação ao controle. Os resultados de quantificação de IL-1β foram submetidos à análise estatística por *one-way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas (*multiple comparison*) de *Tukey*, comparando todos os grupos entre si. As análises foram realizadas por meio do software *GraphPad Prism* 9.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antioxidante (AA) foi expressa em porcentagem de acordo com os resultados obtidos do ensaio com o radical livre DPPH. Tanto os extratos das folhas quanto das cascas de *R. mangle* demonstraram um aumento da atividade antioxidante *in vitro* proporcional ao aumento da concentração testada. O extrato das folhas (1a) representa mais claramente a relação entre a atividade antioxidante e a concentração, ao passo que o extrato obtido das cascas (figura 1b)

apresentou uma atividade antioxidante mais acentuada, contudo, atingindo um platô na concentração de 250 µg/mL.

Figura 1: Atividade antioxidante (AA) (a) folhas e (b) cascas de Rhizophora mangle.



O veículo não demonstrou diferença na redução da viabilidade celular em relação ao controle, indicando que não interfere de forma significativa nos tratamentos com extratos vegetais utilizados. O controle (DMSO 10%) reduziu significativamente a viabilidade celular, desta forma, ambos os controles estão de acordo com os parâmetros esperados para a análise, onde o grupo Controle representa as células viáveis, enquanto o grupo DMSO 10% representa o controle de morte celular.

No tratamento com as folhas de *R. mangle* (Figura 2a), todas as concentrações testadas reduziram a viabilidade celular de forma significativa, em destaque a maior concentração (1000 µg/mL), indicando uma possível citotoxicidade. No tratamento com as cascas de *R. mangle* (Figura 2b), a menor concentração (10 µg/mL) aumentou a viabilidade celular de forma significativa.

No tratamento com as folhas de *R. mangle* (Figura 3a), o veículo não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle, ao passo que apenas a maior concentração causou um aumento significativo na quantificação de IL-1β em relação ao controle e aos demais tratamentos.

Figura 2: Viabilidade para as células tratadas com os extratos de (a) folhas e (b) cascas de Rhizophora mangle.

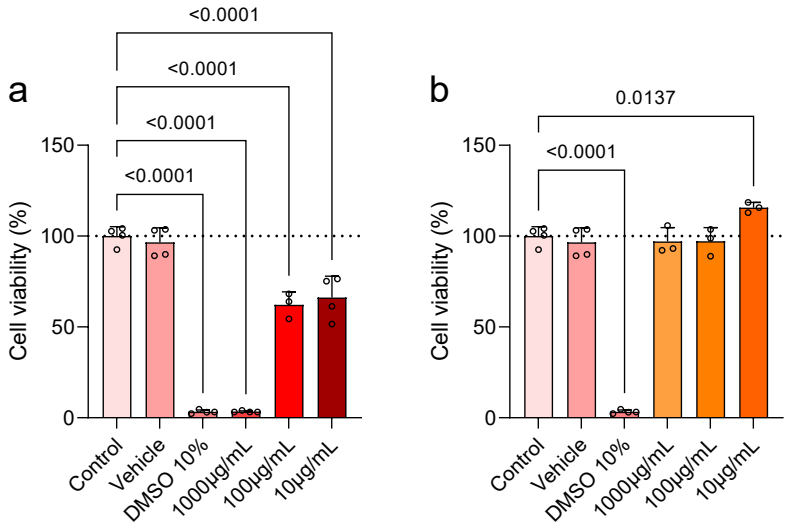
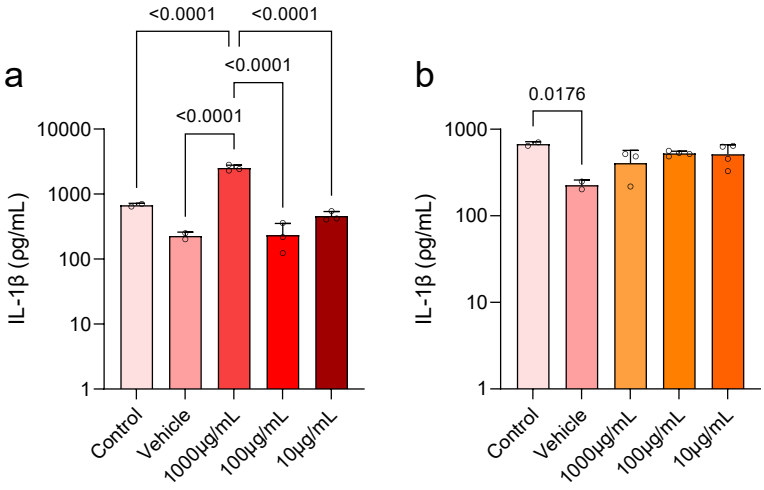


Figura 3: Quantificação de IL-1β no sobrenadante das células tratadas com os extratos de (a) folhas e (b) cascas de Rhizophora mangle.



No tratamento com as cascas de *R. mangle* (Figura 3b), apenas o veículo apresentou uma redução significativa na concentração de IL-1β, enquanto as diferentes concentrações do tratamento não se diferenciaram significantemente em relação ao controle ou entre si.

4 CONCLUSÃO

No contexto da utilização de produtos naturais como insumos terapêuticos inovadores e de acesso facilitado, faz-se necessário a busca por novas espécies com atividades biológicas que contribuam para o desenvolvimento de novas terapias. Desta forma, os extratos das folhas e cascas

de *Rhizophora mangle* demonstram um potencial elevado na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Apesar de não demonstrar um potencial elevado no que diz respeito à redução de citocinas pró-inflamatórias e reduzir significativamente a viabilidade celular, os resultados abrem espaço para discussões acerca do potencial citotóxico dos extratos, além da possibilidade de diferentes concentrações que possam ser empregadas em modelos *in vitro* para modular a inflamação em diferentes fenótipos de macrófagos, bem como explorar a atividade citotóxica em linhagens celulares cancerígenas.

5 REFERÊNCIAS

Berenguer, B., Sánchez, L. M., Quílez, A., López-Barreiro, M., De Haro, O., Gálvez, J., & Martín, M. J. (2006). Protective and antioxidant effects of Rhizophora mangle L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*, *103*(2), 194–200. https://doi.org/10.1016/J.JEP.2005.08.029

Damm, B. M., Schaffel, I. de F., Santos, G. F. S. dos, Azevedo, L. E. S., Ferreira, R. de Q., & de Moura, P. R. G. (2023). Antioxidant Capacity of Rhizophora mangle Bark Extracts: A Contextualized Approach in the Teaching of Analytical Chemistry. *Journal of Chemical Education*, *100*(11), 4449–4455. https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.3C00418/SUPPL_FILE/ED3C00418_SI_002.DOCX

Kalasuba, K., Miranti, M., Rahayuningsih, S. R., Safriansyah, W., Syamsuri, R. R. P., Farabi, K., Oktavia, D., Alhasnawi, A. N., & Doni, F. (2023). Red Mangrove (Rhizophora stylosa Griff.)—A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacological Activities, and Prospects. *Plants 2023, Vol. 12, Page 2196*, *12*(11), 2196. https://doi.org/10.3390/PLANTS12112196

Regalado, A. I., Sánchez, L. M., & Mancebo, B. (2016). Rhizophora mangle L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico [Rhizophora mangle L. (red mangrove): A species with potential therapeutic uses]. *& Pharmacognosy Research*, *4*(1), 1–17. http://jppres.com/jppres

Thatoi, H. N., Patra, J. K., & Das, S. K. (2014). Free radical scavenging and antioxidant potential of mangrove plants: A review. *Acta Physiologiae Plantarum*, *36*(3), 561–579. https://doi.org/10.1007/S11738-013-1438-Z/TABLES/3

Vinod Prabhu, V., & Guruvayoorappan, C. (2012). Anti-inflammatory and anti-tumor activity of the marine mangrove Rhizophora apiculata. *Journal of Immunotoxicology*, *9*(4), 341–352. https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.660997;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER