



Universidade Estadual do Maranhão – UEMA
Centro de Ciências Agrárias - CCA
Programa de Pós-Graduação em Ciência



EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTITUMORAL DA ERVA-DE-PASSARINHO (*Passovia ovata*)

Isadora de Fátima Braga Magalhães

São Luís – MA

2023

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTITUMORAL DA ERVA-DE-
PASSARINHO (*Passovia ovata*)**

Isadora de Fátima Braga Magalhães

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal

Linha de pesquisa: Microbiologia dos alimentos, Patogênese, Epidemiologia e Controle de Doença Animal

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lucia Abreu Silva
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Almeida de Souza

**Ficha gerada por meio do SIB/UEMA Biblioteca com dados
fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UEMA**

Magalhães, Isadora de Fátima Braga.
Efeitos anti-inflamatório e tumoral da erva-de-passarinho (*Passovia ovata*)
/ Isadora de Fátima Braga Magalhães. – São Luís, 2023.
91 f

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do
Maranhão, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva.
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Almeida de Souza.

1.Erva-de-passarinho. 2.Anti-inflamatório. 3.Câncer. I.Título.

CDU: 633.88



Universidade Estadual do Maranhão
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA Nº 1

Aos dezesseis dias do mês de maio de dois mil vinte e três, às quatorze horas, compareceu à sala virtual na plataforma Google Meet, a Pós-Graduanda Isadora de Fátima Braga Magalhães (CPF 654201443-87), para apresentar e defender a Tese intitulada "Efeitos Anti-inflamatório e Antitumoral da Erva-de-passarinho (*Passovia ovata*)", perante a Banca Examinadora de TESE abaixo relacionada. Após a apresentação e arguição pelos membros da Banca, a Pós-Graduanda foi considerada (Aprovada /Reprovada), aprovada, conferindo-a o título de "Doutora em Ciência Animal", conforme as normas vigentes na Universidade Estadual do Maranhão-UEMA. Encerrados os trabalhos foi lavrado a presente ATA que, eu, professora Dra. Ana Lúcia Abreu Silva (Orientadora) li, e após aprovada, recebeu a assinatura dos membros da Banca. A versão final da TESE, deverá ser entregue ao Programa, no prazo de 60 dias, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante na folha de correção anexa. Conforme o Artigo 43 da Resolução 072/2004 - CONSEPE, a Pós-Graduanda não terá o título se não cumprir as exigências acima.

Digitally signed by Ana
Claudia Maretti Mira
Date: 2023.06.05 15:12:32
-07'00'

Dr. (a) ANA CLAUDIA MARETTI MIRA, USC

Examinador(a) Externo à Instituição



Documento assinado digitalmente

JOICY CORTEZ DE SA SOUSA

Data: 06/06/2023 09:19:11-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. (a) JOICY CORTEZ DE SA SOUSA, Uniceuma

Examinador(a) Externo à Instituição



Documento assinado digitalmente

FERDINAN ALMEIDA MELO

Data: 06/06/2023 11:42:02-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. (a) FERDINAN ALMEIDA MELO, UEMA

Examinador(a) Interno



Documento assinado digitalmente

FERNANDO ALMEIDA DE SOUZA

Data: 06/06/2023 11:52:49-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. (a) FERNANDO ALMEIDA DE SOUZA, UEMA

Examinador(a) Interno

Dr. (a) ANA LÚCIA ABREU SILVA, UEMA

Presidente(a)



Documento assinado digitalmente

ISADORA DE FATIMA BRAGA MAGALHAES

Data: 06/06/2023 12:58:39-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ISADORA DE FÁTIMA BRAGA MAGALHÃES

Doutorando



Universidade Estadual do Maranhão
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE CORREÇÕES

ATA Nº 1

Autor: ISADORA DE FÁTIMA BRAGA MAGALHÃES

Título: "Efeitos Anti-inflamatório e Antitumoral da Erva-de-passarinho (Passovia ovata)"

Banca examinadora:

Prof.(a) ANA CLAUDIA MARETTI MIRA

Examinador(a) Externo à
Instituição


Digitally signed by
Ana Claudia Maretti
Mira
Date: 2023.06.05
15:13:04 -07'00'

Documento assinado digitalmente

Prof.(a) JOICY CORTEZ DE SA SOUSA

Examinador(a) Externo à **gov.br**
Instituição

JOICY CORTEZ DE SA SOUSA
Data: 06/06/2023 09:21:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente

Prof.(a) FERDINAN ALMEIDA MELO

Examinador(a) Interno **gov.br**

FERDINAN ALMEIDA MELO
Data: 06/06/2023 11:38:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente

Prof.(a) FERNANDO ALMEIDA DE SOUZA

gov.br FERNANDO ALMEIDA DE SOUZA
Data: 06/06/2023 11:55:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.(a) ANA LÚCIA ABREU SILVA

Presidente(a)



Os itens abaixo deverão ser modificados, conforme sugestão da banca

1. [] INTRODUÇÃO
2. [] REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
3. [] METODOLOGIA
4. [] RESULTADOS OBTIDOS
5. [] CONCLUSÕES

COMENTÁRIOS GERAIS:



Universidade Estadual do Maranhão
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



Declaro, para fins de homologação, que as modificações, sugeridas pela banca examinadora, acima mencionada, foram cumpridas integralmente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ana Lúcia'.

Prof. ANA LÚCIA ABREU SILVA

Orientador

*À minha mãe, pelo empenho e dedicação investidos em
minha educação.*

“Nunca se esqueça do que você é, pois com certeza o mundo não esquecerá.

*Faça disso a sua força. Então, nunca poderá ser a sua
fraqueza.”*

Tyrion Lannister

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus Cristo, por nunca me deixar sozinha, por conhecer todas as minhas angústias, me amparar nos meus momentos difíceis e sorrir ao meu lado nos bons momentos.

Agradeço ao apoio da minha mãe Georgina Braga, meu maior exemplo de independência, fé e força. Seus ensinamentos sobre a importância da educação e disciplina para atingir resultados foram os alicerces da minha vida profissional.

À minha irmã Esperanza, minha melhor amiga, confidente, minha alma gêmea e aquela que marcou os momentos mais difíceis e felizes da minha vida. Obrigada por compreender a minha necessária ausência para concluir esse projeto, por existir, me ouvir e me amparar.

À minha avó Celsa, pelas risadas, fofocas e pelo seu olhar de admiração toda vez que me vê. Te amo para sempre.

Ao meu coorientador, Fernando Almeida de Souza. Pelo apoio e participação ativa em todas as fases desse projeto. Agradeço todos os ensinamentos, os cálculos, os desenhos experimentais, a paciência e os sorrisos. Você é um grande exemplo de pesquisador.

À minha orientadora, Profa. Ana Lucia Abreu Silva, um exemplo de mulher, pesquisadora e professora. Obrigada por ter acreditado na minha capacidade, mesmo quando eu ainda não acreditava. Obrigada por toda a sua compreensão e apoio. Não consigo imaginar minha vida profissional sem a sua presença e o seu exemplo.

Ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz – RJ), em nome da Dra. Kátia da Silva Calabrese, um lugar essencial para a realização deste trabalho. Agradeço a toda equipe e amigos do LIMP, em especial Henrique Previtalli, Lanne Pinheiro, Daiana Hardoim, Celeste Souza e Flávia Cardoso.

À professora Cláudia Rocha e ao Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão por todo o apoio.

Aos amigos do Laboratório de Anatomopatologia, da Universidade Estadual do Maranhão, por toda a ajuda, mesmo a distância.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, e ao seu corpo docente, por proporcionarem a conclusão de mais essa etapa da minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo auxílio financeiro.

Agradeço à amiga Renata Mõndego, por ouvir todos os meus áudios, tirar todas as minhas dúvidas, ouvir meus desabafos e reclamações e por sempre torcer por mim não importando a distância física. Não sei se teria conseguido terminar todos os experimentos sem a suas palavras de incentivo e apoio. Você sempre será o meu “controle positivo” e uma das profissionais que mais admiro. Te amo leãozinho.

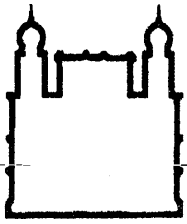
Agradeço ao suporte, escuta e apoio dos amigos queridos, que ouviram muitas reclamações e angústias sem desistir de mim. Em especial Danilo Sá Ribeiro, Rodrigo Cavalcante, Izaías Polary, Shen Lucas e Soares.

Agradeço à Universidade Federal Fluminense e aos médicos veterinários e professores Clarisse Machado, Maurício Chagas, Cláudio Sakamoto, Nathalie Cunha e Luciano Barros. Obrigada pelo apoio e palavras de incentivo para a realização da minha tese e por compreenderem meu estresse e minhas falhas nesse momento tão fundamental para minha carreira. Vocês são exemplos de excelentes professores, pesquisadores e seres humanos.

Obrigada!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 INFLAMAÇÃO	18
2.2 CÂNCER: CONCEITO E ASPECTOS GERAIS	23
2.3 CÂNCER E INFLAMAÇÃO	27
2.4 CÂNCER E FITOTERAPIA	30
2.5 ERVAS-DE PASSARINHO	33
3.OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2 - Efeitos da erva-de-passarinho <i>Passovia ovata</i> em marcadores pró-inflamatórios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	53
CAPÍTULO 3 - Primeiro relato sobre o efeito antioxidante e antitumoral da erva-de-passarinho <i>Passovia ovata</i> (Pohl ex DC.)	69



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC



LICENÇA ADITIVA

L-053/2016- A3

A Comissão CEUA/IOC, em atenção à pesquisadora **KATIA DA SILVA CALABRESE** responsável pela licença (L-053/2016) e das licenças aditivas (L-053/2016-A1),(L-053/2016- A2) do protocolo (CEUA/IOC-041/2016), intitulado “Desenvolvimento de tratamento contra as leishmanioses: ação leishmanicida in vitro e in vivo de extratos, frações e óleos de origem vegetal”, que atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), autoriza o presente aditivo. A referida licença aditiva não exige a observância das Leis e demais exigências legais na legislação nacional.

Esta licença aditiva somente altera a validade de 31/12/2021 para **31/12/2022**.

Observações:

- Esta licença aditiva foi emitida em razão do plano de contingenciamento devido à pandemia de SARS-CoV-2 que alterou o cronograma dos projetos em desenvolvimento.
- Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 18 de dezembro de 2020.

Tânia Zaverucha do Valle
 Matrícula SIAPE 1362665

**Coordenadora Adjunta da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
 Fundação Oswaldo Cruz**

Efeitos anti-inflamatório e antitumoral da erva-de-passarinho (*Passovia ovata*)

Isadora de Fátima Braga Magalhães

RESUMO

A inflamação crônica pode ser associada a diversas patologias, incluindo o câncer de mama, o qual representa uma das principais causas de morte no mundo. A terapêutica atual antineoplásica apresenta diversos efeitos colaterais e deletérios. Nesse contexto, a fitoterapia representa um caminho para novos tratamentos. As ervas-de-passarinho são um grupo de plantas com reconhecido efeito anti-inflamatório e antitumoral, no entanto, a espécie neotropical *Passovia ovata* tem poucos estudos sobre as suas propriedades farmacológicas. O objetivo desse trabalho foi identificar o rendimento, a composição fitoquímica e avaliar os efeitos anti-inflamatório, antioxidante e antitumoral do extrato hidroetanólico de *P. ovata* (POH), e de suas frações hexânica (FHE), acetato de etila (FEA) e aquosa (FW). Para isso, foram realizados ensaios fitoquímicos qualitativos, cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia líquida alta eficiência (HPLC) e quantificação de flavonoides, além de ensaios de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos CCD-1072Sk, ensaios anti-inflamatórios *in vitro* e *in vivo*, avaliação da ação antioxidante por metodologias DPPH, ABTS e FRAP e ensaio antitumoral *in vitro* em linhagens de câncer de mama humanas MCF7 e MDA-MB-231. Os rendimentos foram de 25%, 6.74%, 2.87%, e 1.26% para o POH, FW, FEA e FHE, respectivamente. No POH foi identificada a presença de antraquinonas, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, catequinas e flavanonas. Na FHE detectou-se o maior teor de flavonoides com 36,044±0,733 mg de quercetina (QE)/grama, e em FHE e FEA foram identificados compostos fenólicos através de TLC e HPLC. Nos ensaios *in vitro*, o POH apresentou baixa citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, e reduziu significativamente ($p < 0,01$) os níveis de nitrito, IL-1 β , IL-6 e TNF- α na concentração de 500 μ g/mL após 48 horas de tratamento em macrófagos estimulados com LPS. Nos ensaios *in vivo*, a dose de 500 mg/kg de POH, administrada por via oral após 4 horas de tratamento, reduziu o edema, o infiltrado inflamatório e o número de mastócitos do coxim plantar de camundongos BALB/c estimulados com carragenina. No modelo de peritonite em BALB/c, o POH não influenciou os níveis de citocinas ou a contagem de células. Adicionalmente, FEA foi a fração com maior atividade antioxidante nos ensaios por DPPH, ABTS e FRAP. POH e as frações demonstraram baixa citotoxicidade contra

fibroblastos CCD-1072Sk. Quanto a atividade antitumoral, POH, FHE e FEA demonstraram efeitos citotóxicos contra linhagens de câncer de mama humanas MCF7 e MDA-MB-231, com FHE apresentando a melhor atividade em todos os tempos analisados. Nossos ensaios evidenciaram que *P. ovata* possui potenciais efeitos terapêuticos relacionados com a ação imunomoduladora, antioxidante e antineoplásica, o que pode determinar uma fonte promissora de novos compostos terapêuticos para produção de medicamentos.

Palavras-chave: erva-de-passarinho; anti-inflamatório; câncer

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-TUMORAL EFFECT OF MISTLETOE (*Passovia ovata*)

Isadora de Fátima Braga Magalhães

ABSTRACT

Chronic inflammation can be associated with several diseases including breast cancer, which represents one of the main causes of death in the world. Current antineoplastic therapy has several side and deleterious effects, thus, phytotherapy represents a path to new adjuvant treatments. Mistletoe is a group of plants with recognized anti-inflammatory and antitumor effects, however, only a few studies have been done regarding neotropical species *Passovia ovata* pharmacological properties. This research aimed to determine the extraction yield, the phytochemical composition, and to evaluate the anti-inflammatory, antioxidant, and antitumor effects of the hydroethanolic extract of *P. ovata* (POH), and its hexane (FHE), ethyl acetate (FEA) and aqueous (FW) fractions. For this, qualitative phytochemical assays, high-performance liquid chromatography (HPLC), thin-layer chromatography (TLC), and quantification of flavonoids were carried out, in addition to cytotoxicity assays in RAW 264.7 macrophages and CCD-1072Sk fibroblasts, *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory assays, antioxidant assays by DPPH, ABTS and FRAP methodologies and *in vitro* antitumor assay. Yields were 25%, 17.48%, 3.98% and 0.31% for POH, FW, FEA and FHE, respectively. In the extract POH, were identified anthraquinones, tannins, anthocyanins, anthocyanidins, flavonols, catechins, and flavanones. FHE presented the highest content of flavonoids with 36.044 ± 0.733 mg of quercetin (QE)/gram, and in FHE and FEA, phenolic compounds were detected by TLC and HPLC. In the *in vitro* assay, the extract POH showed low cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages and significantly reduced ($p < 0.01$) the quantification of nitrite, IL-1 β , IL-6 and TNF- α at a concentration of 500 μ g/mL after 48 hours of treatment in macrophages stimulated with LPS. In the *in vivo* study, the concentration of 500 mg/kg of POH after 4 hours from treatment, administered orally, reduced edema, inflammatory infiltrate, and the number of mast cells in the footpad of BALB/c mice stimulated with carrageenan. In BALB/c peritonitis model, POH did not influence cytokine levels or cell counts in the tested concentrations. FEA was the fraction with the highest antioxidant activity in ABTS, DPPH and FRAP assays. POH and fractions

demonstrated low cytotoxicity against CCD-1072Sk fibroblasts cell line. POH, FHE and FEA had cytotoxic effects against breast cancer cells MCF7 and MDA-MB-231, with FHE having the greatest effect at all times tested. Our results showed that *P. ovata* leaves have great therapeutic effects, acting through immunomodulatory, antioxidant and antitumor pathways, which may determine a promising source of new therapeutic compounds for drug production.

Keywords: mistletoe; anti-inflammatory; cancer

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é o processo pelo qual o sistema imunológico reconhece e remove agentes nocivos e inicia o processo de recuperação dos tecidos, atuando, portanto, primariamente como um mecanismo de defesa do organismo (MICHELS DA SILVA; LANGER; GRAF, 2019). No entanto, a inflamação crônica pode provocar danos teciduais e possui associação com diversas patologias como doenças cardiovasculares, autoimunes e neurodegenerativas e com o câncer (FURMAN et al., 2019).

Quando a resposta inflamatória é prolongada podem ocorrer mutações e proliferação celular, criando um ambiente propício ao desenvolvimento do câncer. Por isso, a inflamação tem sido associada a sobrevivência e proliferação de células tumorais, angiogênese e metástase (SINGH et al., 2019). O desenvolvimento do câncer e sua resposta à terapia são regulados pela inflamação, que estimula ou suprime a progressão do tumor e pode até mesmo promover resistência ao tratamento (ZHAO et al., 2021).

A prevalência de doenças inflamatórias crônicas e de câncer aumentou nos últimos anos (BUNGSU et al., 2021) e, devido aos problemas associados ao tratamento atual, buscam-se novas alternativas para combater o câncer. Dessa forma, as plantas medicinais surgem como uma alternativa terapêutica e, embora o uso popular possa sugerir espécies potencialmente importantes, faz-se necessário uma série de estudos que comprovem sua ação farmacológica associada a substâncias ativas (MACHADO; OLIVEIRA, 2014).

As ervas-de-passarinho são plantas hemiparasitas principalmente das famílias Loranthaceae e Santalaceae. Compostos isolados de *Viscum album*, uma erva-de-passarinho europeia pertencente à família Santalaceae, são utilizados no tratamento do câncer com resultados promissores na qualidade de vida de pacientes e melhora dos efeitos colaterais causados pela quimioterapia (PIAO et al., 2004).

O gênero *Passovia* representa ervas-de-passarinho neotropicais (CAIRES et al., 2021) presentes no cerrado brasileiro. Resultados de pesquisas com gêneros próximos como *Struthanthus* sp. chamam atenção quanto ao seu potencial ainda não explorado, por isso busca-se compreender a real abrangência de *Passovia ovata* sobre células neoplásicas e sobre a resposta imunológica inflamatória, ambas estritamente relacionadas, o que justifica a execução deste trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta aos estímulos nocivos aos quais o corpo está exposto, assim, frente a estímulo interno ou externo de origem microbiana, autoimune, alérgica, metabólica e/ou física (HAWIGER; ZIENKIEWICZ, 2019), um mecanismo de ativação do sistema imunológico inato e adaptativo é desencadeado (NEVES; SOUSA-VICTOR, 2020). Esta resposta pode ir desde uma resposta inflamatória local até uma inflamação sistêmica completa, com uma ampla e complexa sequência de eventos (VARELA et al., 2018).

A resposta inflamatória envolve células leucocitárias como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Em resposta a um estímulo, essas células liberam substâncias especializadas, citocinas pró-inflamatórias, aminas e peptídeos vasoativos e proteínas de fase aguda, que orquestram a inflamação para que haja um equilíbrio entre a neutralização do agente estimulador desse processo e os danos teciduais, com a finalidade de cicatrizar o tecido e restaurá-lo (ABDULKHALEQ et al., 2018).

O início da inflamação pode ser mediado por células do sistema imunológico residentes por meio de receptores de reconhecimento de patógenos (*pattern recognition receptors* – PRRs), como os receptores Toll-like (*toll-like receptors* – TLRs) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). A inflamação é induzida quando as células hospedeiras detectam padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns* – PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (*damage-associated molecular pattern* – DAMPs) através dos PRRs (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Estímulos inflamatórios primários, incluindo produtos microbianos e citocinas, como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (*tumor necrosis factor-alpha*, TNF- α) medeiam a inflamação através da interação com os TLRs e outros receptores (KAMINSKA, 2005).

Uma vez iniciada a agressão tecidual, vários componentes do sistema imunológico passam a envolver-se no processo inflamatório, o qual permite a reparação de lesões e destruição de agentes agressores. Como consequência da ação vasodilatadora de mediadores como prostaglandinas, citocinas, TNF- α e interferon gama (IFN- γ), ocorre aumento do fluxo sanguíneo no local atingido e aumento da permeabilidade capilar. Em decorrência desta última alteração, células endoteliais se retraem e expressam moléculas de adesão, que também são expressas em leucócitos. Tais alterações ocasionam passagem de mediadores solúveis para os vasos e saída de células da circulação o que caracteriza a fase aguda da

inflamação (TANIGUCHI; KARIN, 2018). A partir dessa fase pode ocorrer a resolução do processo inflamatório ou, se o estímulo persistir ou se uma reação desproporcional ocorrer, a fase crônica será instaurada e com ela maiores danos teciduais podem ocorrer (GERMOLEC et al., 2018).

Múltiplas células fazem parte do processo inflamatório, dentre elas os mastócitos. Essas células participam ativamente da imunidade inata e adquirida, de reações alérgicas e anafiláticas, além de liberarem mediadores pró-inflamatórios e possuírem ação imunoestimulantes ou imunossupressoras. A interação entre mastócitos e outros leucócitos, como linfócitos T, pode interferir em diversas doenças inflamatórias, como psoríase e dermatite atópica (THEOHARIDES et al., 2012).

Mastócitos possuem grânulos preenchidos por moléculas imunomoduladoras e, quando são ativados, realizam a degranulação no ambiente inflamatório, o que definirá os seus efeitos protetores ou sua função na inflamação (WERNERSSON; PEJLER, 2014). Após a ativação, os mastócitos liberam através de exocitose os grânulos que contêm histamina, proteases lisossômicas e mediadores inflamatórios. Mais tardiamente, através da via constitutiva, ocorre liberação de outros mediadores inflamatórios como citocinas e fatores de crescimento (WEIMERSHAUS et al., 2023).

Dentre as células mais importantes para o processo inflamatório, destacam-se os macrófagos, os quais pertencem ao sistema de fagócitos mononucleares (FOSS; SANCHEZ-BAUTISTA; JAIN, 2018). Durante a embriogênese, os macrófagos teciduais derivam dos progenitores do saco vitelino e do fígado fetal e após o nascimento e na idade adulta, macrófagos derivados de monócitos derivam de progenitores da medula óssea (ITALIANI; BORASCHI, 2015). Segundo essa teoria clássica, células-tronco hematopoiéticas multipotentes da medula óssea se diferenciam em células progenitoras que podem ser linfóides ou mielóides. A partir das células progenitoras linfóides ocorrem diferenciações adicionais em células T, células NK e células B, e a partir das células progenitoras mielóides ocorrem diferenciações em basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos, neutrófilos e monócitos (KLOC et al., 2022).

Os monócitos são leucócitos circulantes fundamentais para a imunidade inata e adaptativa (KRATOFIL; KUBES; DENISET, 2017). O estímulo de monócitos após dano tecidual ou infecção tem como consequência a sua migração para o tecido afetado e diferenciação em macrófagos teciduais ou células dendríticas (YANG et al., 2014). No entanto, outras teorias encontraram evidências de que macrófagos residentes em tecidos podem surgir independentemente de monócitos (SCHULZ et al., 2012).

De acordo com estímulos específicos de um tecido, os monócitos podem se diferenciar fenotipicamente e funcionalmente em macrófagos com funções específicas, como as células de Kupffer no fígado, células micróglia no cérebro e células de Langerhans na pele. Apesar dessa diferenciação, essas células ainda podem se modificar, pois mantêm sua plasticidade e sua capacidade proliferativa e auto-renovadora (ITALIANI; BORASCHI, 2015).

Os macrófagos possuem papéis-chave em praticamente todas as fases da resposta a uma lesão e agem através da ativação de células-tronco, fagocitose, limpeza de tecidos danificados, remodelação da matriz extracelular e promoção da angiogênese. Dessa forma, os macrófagos interligam os processos iniciais da inflamação com a posterior regeneração e reparação de tecidos, mas também estão inseridos nos processos de falha da resolução do processo inflamatório, como no caso da inflamação crônica e na cicatrização exacerbada (OISHI; MANABE, 2018). Na inflamação, os macrófagos agem na integração de sinais enviados por moléculas da matriz extracelular e células fagocitadas ou interagem diretamente com proteínas extracelulares, receptores de superfície em outras células imunes que foram recrutadas durante a inflamação e células residentes em tecidos (WATANABE et al., 2019).

A grande plasticidade atribuída aos macrófagos determina sua polarização, ou seja, diferentes formas de ativação podem ocorrer dependendo dos sinais oriundos de tecidos íntegros ou danificados. O que irá definir a polarização destas células são fatores extrínsecos, citocinas, elementos provenientes de patógenos e o próprio microambiente do tecido (MURRAY, 2017). Assim, os macrófagos podem ser polarizados em macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos ativados alternativamente (M2).

Os macrófagos M1 são pró-inflamatórios e polarizados por lipopolissacarídeo (LPS) derivado de bactérias isoladamente ou em associação com citocinas do perfil de resposta de células T auxiliar do tipo 1 (*T helper 1* – Th1), como IFN- γ , e produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α . Já os macrófagos do perfil M2 são anti-inflamatórios e imunorreguladores, sendo polarizados por citocinas do perfil de resposta de células T auxiliar do tipo 2 (*T helper 2*, Th2), como IL-4 e IL-13, e produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor beta*, TGF- β). Embora a fase M1 seja eficaz contra infecções, pode também provocar danos teciduais, o que torna os macrófagos M2 essenciais para reduzir a inflamação e atuar na reparação e remodelação dos tecidos (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

A resolução da inflamação é marcada pela mudança de estado inflamatório dos macrófagos de um perfil pró-inflamatório para um perfil anti-inflamatório e restaurador e é mandatória para que ocorra reparo tecidual. Nesse processo, os macrófagos agem através da promoção da eferocitose, a qual consiste na fagocitose de células mortas e detritos (CHAZAUD, 2020).

A dicotomia de macrófagos M1 ou M2 é mais nítida em modelo de experimentação com animais, não sendo tão clara em humanos, nos quais perante doenças infecciosas esses perfis vão se alternando e acontecendo muitas vezes simultaneamente (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018). A partir de fatores ativadores ou inibidores presentes, além da duração da exposição do macrófago a estes fatores, podem surgir uma variedade ampla de fenótipos com diversas características em comum, mas também com particularidades em suas funções, sendo, portanto, difícil categorizar macrófagos como estritamente M1 ou M2 (AUSTERMANN; ROTH; BARCZYK-KAHLERT, 2022).

Em humanos, um outro perfil de macrófagos já foi identificado e é conhecido como M3. Ao contrário dos subtipos M1 e M2, que funcionam através de mecanismos de feedback positivo, o subtipo M3, ao ser estimulado por citocinas anti-inflamatórias, responde com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, o que o permite ter ação antitumoral mesmo em um microambiente que não estimule essa resposta (KALISH et al., 2017). Em microambientes tumorais, os macrófagos também podem ser conhecidos como macrófagos associados ao tumor (TAMs), os quais influenciam na supressão ou crescimento tumoral (HOURANI et al., 2021).

O uso de terapias direcionadas a subpopulações específicas de macrófagos poderá promover uma resolução mais eficiente de processos patológicos, já que esse tipo celular possui papéis específicos em diversas doenças (WATANABE et al., 2019) e são células consideradas fundamentais durante a inflamação crônica (NETEA et al., 2017), a qual está associada a progressão de inúmeras doenças, dentre elas o câncer (YEUNG et al., 2018).

A relação entre inflamação e câncer é complexa e possui como um dos pontos-chave o dano ao ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, DNA). Durante o processo inflamatório são produzidas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), moléculas usadas durante o processo de fagocitose para combater patógenos e estimular o reparo e a regeneração de tecidos. Mas as EROns também podem danificar o DNA e provocar mutações que iniciam e promovem o câncer e, embora as vias de reparo do DNA possam evitar que esses danos ocorram, as EROns podem reduzir a eficiência desse reparo. Além

disso, as respostas celulares a danos no DNA, como sinalização de danos e citotoxicidade, podem promover a inflamação, criando um ciclo de feedback positivo (KAY et al., 2019).

Uma compreensão mais profunda sobre o vínculo entre a inflamação e o câncer pode abrir caminhos para novas alternativas terapêuticas, por isso pesquisas relacionadas ao tema são incentivadas (KHANDIA; MUNJAL, 2020).

2.2 CÂNCER: CONCEITO E ASPECTOS GERAIS

A neoplasia maligna ou popularmente chamada de câncer pode ser definida como uma doença multifatorial em que células anormais se dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos por meio do sangue e sistemas linfáticos (ZAID et al., 2017). É considerada a segunda principal causa de morte em todo o mundo, com aproximadamente 8,97 milhões de mortes no mundo por ano e risco geral de 20,2 % de desenvolvimento da doença em humanos de até 74 anos (MATTIUZZI; LIPPI, 2019). Por isso, é um grande alvo em pesquisa e prática biomédica no mundo (YIN et al., 2021).

A referência mais antiga dessa doença é de 1.600 a.C. no papiro de Edwin Smith. Mas foi Hipócrates que determinou o nome da doença de *karkinos*, que significa caranguejo em grego, o que se refere a característica das veias grossas ao redor do tumor que se assemelhavam a patas de caranguejo. O termo câncer foi atribuído por Galeno, que a definiu “como um caranguejo tem pernas espalhadas pelo corpo, à semelhança dos vasos que irrigam a massa neoplásica” (MCGARTY, 2019).

A etiologia do câncer é ampla e pode se relacionar a causas ambientais, infecções, exposição química e herança genética. Em humanos, causas não genéticas e principalmente as ambientais podem corresponder a aproximadamente 90% dos casos e estão associadas principalmente a comportamentos humanos como exposição à radiação ultravioleta, dieta, tabagismo (KLAUNIG, 2018) e consumo excessivo de álcool (LEWANDOWSKA et al, 2019).

O surgimento do câncer envolve mecanismos de genotoxicidade, ou seja, elementos físicos, químicos ou internos que tendem a modificar moléculas de DNA genômico ou mitocondrial. Embora muitas vezes as células consigam não ser afetadas por esses elementos, falhas na maquinaria de reparo de DNA promovem o surgimento de lesões e mutações que culminam com a doença (KIWERSKA; SZYFTER, 2019).

A perda do controle sobre o crescimento celular, devido a mutações acumuladas, leva a proliferação descontrolada das células. Isso geralmente envolve a alteração de oncogenes, genes supressores de tumor e genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA. Subsequentemente, mutações adicionais resultam na seleção clonal de fenótipos mais agressivos (TYSNES; BJERKVIG, 2007). O mal funcionamento de proteínas como ciclinas e quinases, além da superexpressão de fatores de crescimento ou a falta de proteínas supressoras de tumor, também estão envolvidos na divisão celular rápida e descontrolada (MERCADANTE; KASSI, 2021).

A multiplicação celular faz parte do funcionamento normal dos organismos, no entanto, a cada divisão celular, ocorre exposição a carcinógenos presentes no ambiente, por isso, o controle sobre o ciclo celular é essencial para impedir o surgimento do câncer. Considerando a frequência de multiplicações celulares que ocorrem diariamente no organismo, o surgimento e desenvolvimento de células tumorais pode ser considerado relativamente raro (WARD, 2002).

Em células não tumorais, os proto-oncogenes são genes que controlam o ciclo e crescimento celular, atuando na transdução de sinais entre células e como fatores de transcrição nuclear (KONTOMANOLIS et al., 2020). Entretanto, a alteração genética de proto-oncogenes através de mecanismos de mutação, amplificação gênica e/ou rearranjos cromossômicos leva a sua transformação em oncogenes, os quais são genes que promovem a multiplicação celular (PIEROTTI; SOZZI; CROCE, 2003).

Oncogenes codificam proteínas que agem como fatores de crescimento, receptoras de fatores de crescimento e sinalizadoras. Essas proteínas estão diretamente associadas a indução da proliferação celular e a inibição da morte celular programada, conhecida como apoptose, em células tumorais. A supressão da apoptose em células cancerígenas é considerada um dos pontos críticos para a ocorrência de tumores (COOPER, 2000).

A apoptose pode ser induzida pela via intrínseca, também conhecida como mitocondrial, a qual é delimitada pela família de proteínas do linfoma de células B 2 (*B-cell lymphoma 2*, BCL-2). Essa família abrange proteínas que induzem a apoptose como proteína X associada a BCL-2 (*BCL-2-associated X protein*, BAX), antagonista de BCL-2/matador-1 (*BCL-2 antagonist killer 1*, BAK) e BCL2 associada a proteína assassina ovariana (*BCL-2 related ovarian killer*, BOK), além de proteínas que inibem a apoptose e conseqüentemente promovem a sobrevivência da célula, como BCL-2 e gene relacionado a BCL-2 isoforma longa (*B-cell lymphoma-extra large*, BCL-X_L) (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019). A carcinogênese influencia nos mecanismos de controle de vias apoptóticas e atua na expressão de proteínas antiapoptóticas, além de regular negativamente ou induzir mutações em proteínas pró-apoptóticas como BAX (HASSAN et al., 2014).

A metástase é considerada um dos maiores desafios clínicos para o tratamento do câncer (CHEN; YAN, 2021), pois através dela as células tumorais podem migrar do tumor primário para vasos sanguíneos ou linfáticos e então sair da circulação e colonizar locais mais distantes (VAN ZIJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011). Epigenética e mecanismos como transição epitelial-mesenquimal determinam características agressivas para o microambiente do tumor, o que determinará a ocorrência de metástase (PARK et al., 2022).

A transição epitelial-mesenquimal envolve a mudança entre esses fenótipos, com alterações na expressão de marcadores que resultam em maior capacidade de mobilidade e migração nessas células. Ao contrário da transição que ocorre naturalmente durante o desenvolvimento embrionário, a transição epitelial-mesenquimal associada ao câncer é desregulada e torna tumores sólidos mais malignos (RIBATTI; TAMMA; ANNESE, 2020). A epigenética também pode atuar na regulação da metástase através de mecanismos como metilação do DNA, modificações nas histonas e alterações na estrutura da cromatina (CHEN; YAN, 2021).

O diagnóstico e tratamento mais precoces do câncer estão diretamente associados a uma maior chance de cura para essa doença. Os métodos de diagnóstico baseiam-se principalmente em exames que avaliam a morfologia celular, a histologia do tecido e a detecção de marcadores de fluidos corporais. No entanto, essas metodologias muitas vezes não conseguem detectar precocemente a doença por falta de sensibilidade e/ou especificidade (DERMIME, 2013).

Existem diversos tratamentos utilizados para o tratamento do câncer, dentre eles os principais são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia. O tratamento por quimioterapia usa agentes que interferem principalmente na síntese de DNA ou ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, RNA) como forma de inibir a multiplicação das células tumorais, e consequente do tumor, evitando assim, a metástase (AMJAD; CHIDHARLA; KASI, 2023). Os agentes quimioterápicos podem ser divididos em várias classes dependendo do mecanismo de ação, como, por exemplo, agentes alquilantes, inibidores do fuso mitótico, antimetabólitos, inibidores da topoisomerase, dentre outros (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020). Devido à baixa seletividade e ao efeito dos agentes quimioterápicos em células não tumorais, diversos efeitos colaterais podem ocorrer em decorrência do seu uso, como vômito, dor de cabeça, diarreia, fadiga, fraqueza, perda de cabelo, náusea, cólicas abdominais, feridas na boca, boca seca, perda de memória e dormência (ASLAM et al., 2014).

Além dos efeitos colaterais, a resistência a múltiplas drogas ocasiona 90% das mortes em pacientes com câncer que recebem quimioterapia, e está associada a um maior efluxo dos quimioterápicos usados, fatores genéticos como mutações e alterações epigenéticas e aumento da capacidade de reparação do DNA (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020).

A quimioterapia convencional é considerada um dos tratamentos mais importantes para o câncer, no entanto os efeitos colaterais decorrentes deste tratamento estão associados

a diversas falhas. Assim, o desenvolvimento de métodos e compostos mais eficientes para a quimioterapia é um problema urgente (WEI et al., 2021).

A radioterapia é uma outra forma de tratamento que usa radiação ionizante, como raios X, para induzir a morte em células cancerígenas (SANTOS-FILHO et al., 2008). Os problemas associados a radioterapia abrangem a sua interferência no microambiente do tumor pela danificação de vasos sanguíneos, ativação de vias imunossupressoras e inibição de linfócitos T CD8+. Além disso, ocasiona o surgimento de células resistentes à radioterapia como células T reguladoras e macrófagos associados a tumores, e induz ao aumento da região de hipóxia tumoral, o que reduz os efeitos da radioterapia. Pode ocorrer também a indução de angiogênese, o que aumenta a recidiva do câncer após o tratamento (JAROSZ-BIEJ et al., 2019).

A imunoterapia é uma forma de tratamento que reduz a imunossupressão provocada por tumores (O'DONNELL; TENG; SMYTH, 2019) ao manipular o sistema imunológico para realizar o reconhecimento e combate de células tumorais. Dessa forma, ao contrário da quimioterapia e radioterapia que agem de forma direta em células tumorais, a imunoterapia age de forma indireta, ao aumentar a resposta imunológica com viés antitumoral. O uso de protocolos de terapia celular ou inibidores de *checkpoint* como anticorpos anti-proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, CTLA-4) e anti-proteína de morte celular programada 1 (*programmed cell death protein 1*, PD-1) (SEIDEL; OTSUKA; KABASHIMA, 2018) fazem parte da imunoterapia. No entanto, essa forma de tratamento produz efeitos adversos relacionados a sua toxicidade (KENNEDY; SALAMA, 2020), indução de inflamação inespecífica e autoimunidade (RILEY et al., 2019), além dos pacientes poderem se tornar resistentes a esse tratamento (O'DONNELL; TENG; SMYTH, 2019).

2.3 CÂNCER E INFLAMAÇÃO

A relação entre câncer e inflamação está bem documentada na literatura, abrangendo desde o estabelecimento inicial do tumor até a metástase. No microambiente tumoral, células neoplásicas se associam às células inflamatórias e provocam produção desordenada de citocinas, prostaglandinas e leucotrienos, os quais são usados para comunicação e proliferação das células (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Diversas drogas anti-inflamatórias, como diclofenaco, ibuprofeno e aspirina, já estão sendo usadas contra o câncer, indicando a interação entre esses mecanismos (KHANDIA; MUNJAL, 2020).

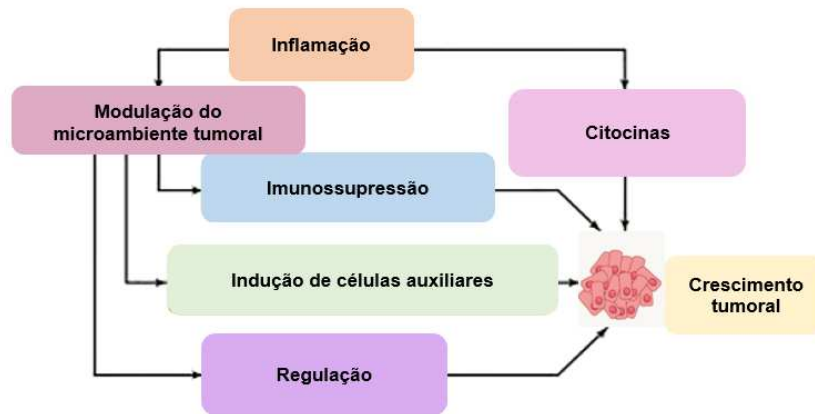
A relação entre sistema imunológico e células tumorais é ambígua, pois pode tanto promover o desenvolvimento tumoral como em outros casos colaborar para sua eliminação. Este potencial bilateral é fortemente influenciado pelos diferentes tipos de células imunes que são recrutadas para o local do tumor (PETTY; YANG, 2017).

Os macrófagos fazem parte da maquinaria celular que liga o processo inflamatório ao câncer. A presença de infiltrado com grandes populações de macrófagos está associada a menor sobrevida na maioria dos cânceres, pois promovem angiogênese e metástase (POH; ERNST, 2018).

Células neoplásicas são resistentes a resposta de defesa inflamatória e conseguem bloquear a apoptose por superexpressão de proteínas antiapoptóticas (ZAID et al., 2017). Em consequência disso, há proteção das células neoplásicas da destruição celular e proliferação nos tecidos, o que acarreta crescimento do tumor. Dessa forma, com o auxílio da inflamação, as células tumorais se infiltram mais facilmente em tecidos vizinhos, penetram no fluxo sanguíneo e linfático e dão origem às metástases (BARRETO et al., 2011) (Figura 1).

A inflamação é uma peça fundamental do microambiente tumoral, pois participa da comunicação e sinalização que definem esse ambiente. Através da inflamação, células neoplásicas, células do estroma e células circulantes recrutadas vão determinar os caminhos para o crescimento tumoral através da produção de fatores de crescimento, citocinas e remodeladores da matriz extracelular. Embora exista uma multiplicidade de estímulos e caminhos, a maior parte evolui para a proliferação das células tumorais e migração das células para novos locais por meio da metástase (FIGUEIREDO, 2019).

FIGURA 1. Influência da inflamação na progressão, metástase e crescimento do câncer.



Adaptado de Greten e Grivennikov et al., (2019).

Células do sistema imunológico produzem citocinas e fatores de crescimento no microambiente tumoral que podem agir diretamente nas células pré-malignas e tumorais e aumentar sua proliferação e resistência à morte celular, o que promove diretamente o crescimento tumoral. Agentes imunossupressores como células T reguladoras modulam o microambiente tumoral para induzir imunossupressão e aumentar o recrutamento e proliferação de outras células auxiliares pró-tumorigênicas dentro do microambiente tumoral (como fibroblastos e células endoteliais); e alterar as funções mecânicas e metabólicas. Em conjunto, essas alterações causadas pela inflamação contribuem significativamente para o crescimento e progressão do tumor.

A interação no microambiente tumoral definirá a via predominante, ou seja, a via promotora ou antitumoral. A inflamação pró-tumoral é a via dominante em tumores estabelecidos (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010), já a resolução do processo inflamatório pode auxiliar na prevenção da carcinogênese por ação de macrófagos na remoção de restos celulares e da inibição de citocinas pró-inflamatórias (FISHBEIN et al., 2021).

No microambiente tumoral, células inflamatórias promovem a ativação de vias inflamatórias associadas ao fator nuclear kappa B (*factor nuclear kappa B*, NF- κ B) e ao transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3). NF- κ B está envolvido diretamente na inflamação e regulação da expressão de genes associados à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. A mutação de oncogenes pode resultar na ativação de NF- κ B (GIULIANI; BUCCI; NAPOLITANO, 2018). STAT3 também regula a expressão de genes envolvidos no crescimento e morte celular e a sua ativação e interação com NF- κ B desempenha papéis vitais no controle da comunicação entre células cancerígenas e células inflamatórias (FAN; MAO; YANG, 2013), o que promove angiogênese tumoral e transição epitélio-mesenquimal nas células (ZHANG et al., 2021).

A inflamação pode estar associada à tumores de forma intrínseca ou extrínseca, com ambas criando um microambiente favorável ao desenvolvimento do câncer através da

imunossupressão. A associação intrínseca é causada por mutações que iniciam o câncer e através da ativação e atração de mais células inflamatórias contribui para sua propagação. A associação de forma extrínseca está associada a fatores de risco externos que estimulam a progressão do câncer como obesidade, consumo excessivo de álcool, infecções virais ou bacterianas, tabagismo e exposição a amianto (SINGH et al., 2019).

Doenças inflamatórias crônicas estão relacionadas ao aumento na incidência de câncer, assim, células e moléculas inflamatórias estão presentes no microambiente tumoral. Além disso, o uso a longo prazo de anti-inflamatórios reduz o risco de mortalidade causada pelo câncer, o que ressalta ainda mais a conexão entre esses dois processos. O uso de anti-inflamatórios tem sido associado a vários efeitos colaterais, incluindo úlceras gastrointestinais, danos hepáticos e renais e aumento do risco de infecções. Por isso, a busca por novos agentes anti-inflamatórios e antitumorais ganhou destaque nos últimos anos (TODORIC; ANTONUCCI; KARIN, 2016).

2.4 CÂNCER E FITOTERAPIA

As modalidades tradicionais e mais utilizadas no tratamento do câncer como radioterapia, cirurgia, quimioterapia e imunoterapia têm efeitos adversos que impactam negativamente na qualidade de vida dos pacientes (MUN et al., 2017). Além disso, quimioterápicos e radiação possuem ação com baixa seletividade em células que se dividem rapidamente e induzem resistência ao tratamento (ZAID et al., 2017). Por isso, o uso de medicina complementar e alternativa contra o câncer vêm atraindo pacientes, pesquisadores e profissionais da área da saúde (SPADACIO; BARROS, 2008). Dentre as terapêuticas mais usadas estão a musicoterapia, acupuntura, yoga, auriculoterapia e fitoterapia (GUERRA-MARTÍN, TEJEDOR-BUENO; CORREA-CASADO, 2021).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu a fitoterapia como o ramo da medicina que permite o uso adequado de plantas medicinais e seus derivados para fins profiláticos ou terapêuticos através dos efeitos farmacológicos de seus compostos (CHOI, 2008). A fitoterapia é uma fonte de compostos com perspectivas promissoras para vencer a complexa biologia do câncer, já que a partir de plantas novos compostos antitumorais com ação multiagente e efeito sinérgico podem ser obtidos (SALEHI et al., 2018).

Diferentes mecanismos já foram atribuídos às plantas para explicar os seus efeitos antitumorais, assim, estas podem agir de forma direta, induzindo a morte celular em células tumorais, e/ou de forma indireta, através de efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios (SAEEDIFAR et al., 2021) e/ou antioxidantes, que beneficiem o tratamento de diferentes tipos de câncer. Podem possuir também efeito quimiopreventivo, ao promover a inibição ou prevenção das etapas da carcinogênese (EL-HARAKEH; AL-GHADBAN; SAFI, 2021) e atuar na inibição de efeitos colaterais associados ao tratamento quimioterápico, como constipação (TOYGAR et al., 2020), ansiedade, depressão (YEUNG et al., 2018), insônia, náusea (REIS; JONES, 2017), mucosite oral, toxicidade gastrointestinal e hepatotoxicidade (OKEM et al., 2023).

Mecanismos envolvidos na interferência do ciclo celular de células tumorais parecem ser um ponto-chave do efeito terapêutico de plantas. Essa interferência ocorre através da indução do aumento de inibidores do ciclo celular, o que impede a multiplicação das células tumorais. Dentre esses inibidores, destacam-se as caspases, enzimas proteases que regulam o processo de morte celular por apoptose. Dessa forma, plantas podem estimular a ação da caspase-3, caspase-7, caspase-8 e caspase-9, inibir oncogenes como BCL-xL, BCL-2 e inibir ciclina A, ciclina D1 e ciclina E, os quais funcionam como fatores antiapoptóticos responsáveis pela promoção da sobrevivência celular no câncer (ISLAM et al., 2022).

Além dos efeitos associados a indução de apoptose (WONG et al., 2018), da parada do ciclo celular e da ativação da autofagia em células do câncer, fitoquímicos podem também inibir a angiogênese e metástase (KHAN et al., 2022), agir na eliminação de radicais livres, na inibição da quinase do fuso mitótico e topoisomerase, e agir no controle da invasão, migração e proliferação do câncer (VARGHESE; DALVI, 2021).

Compostos bioativos derivados de plantas são um dos tratamentos alternativos mais populares contra o câncer, principalmente por melhorar a resposta imunológica do hospedeiro e reduzir os efeitos nocivos da quimioterapia. Nas últimas décadas, pesquisas clínicas e experimentos laboratoriais confirmaram que fitoquímicos podem diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia da quimioterapia, prolongar a sobrevida em pacientes com câncer avançado e contribuir para a prevenção e tratamento do câncer metastático (LIU et al., 2015).

Os compostos responsáveis pelos efeitos terapêuticos de plantas são os metabólitos secundários. Esses compostos participam do mecanismo de interação entre a planta e o ambiente e da adaptação das plantas ao ambiente e ao estresse, sendo influenciados por fatores ambientais como umidade, temperatura e disponibilidade de água (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Esses metabólitos podem ser classificados em quatro classes principais: compostos fenólicos, alcalóides, terpenóides e compostos contendo enxofre (GUERRIERO et al., 2018).

Dentre os compostos secundários responsáveis pelos efeitos antitumorais das plantas destacam-se: flavonóides, terpenóides, ácidos fenólicos, alcalóides (KHAN et al., 2022), triterpenóides, catequinas, saponinas, alcalóides, polissacarídeos e glicosídeos, e componentes de polifenóis como ácido cafeico, catequinas e glicosídeos de luteolina (ISLAM et al., 2022). Flavonoides fazem parte do grupo de compostos fenólicos e estão presentes em todas as plantas, normalmente em suas flores, folhas e sementes e atuam na proteção das plantas contra bactérias, fungos e herbívoros, além de definirem a coloração de frutas e flores para atrair animais (SHEN et al., 2022).

Os flavonoides possuem atividades anticancerígenas por diferentes vias, como diminuição da atividade da enzima nucleosídeo difosfato quinase-B, fator associado à progressão do câncer em cânceres de cólon, pulmão e bexiga. Flavonoides também podem induzir apoptose em células do câncer de mama, próstata e colorretal (HAZAFI et al., 2020).

Além disso, flavonoides induzem a supressão de um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento do câncer, o NF- κ B (HAZAFI et al., 2020). Esse fator está associado a ativação de genes pró-proliferativos e anti-apoptóticos, promovendo o aumento

da ocorrência e a sobrevivência das células cancerígenas, alterações genéticas e epigenéticas, alterações metabólicas celulares, aquisição de propriedades de células-tronco cancerígenas, transição epitelial para mesenquimal, invasão, angiogênese, metástase, resistência à terapia e resistência à imunidade antitumoral (TANIGUCHI; KARIN, 2018).

Diversos metabólicos secundários já foram isolados de plantas e geraram importantes fármacos anticâncer como vincristina, isolada de *Catharanthus roseus*, camptotecina, isolada de *Camptotheca acuminata*, docetaxol, extraído de *Taxus baccata*, e paclitaxel, isolado da casca de *Taxus brevifolia* (CHU; RUBIN, 2018). Esses resultados sinalizam que na pesquisa com fitoterapia podem ser descobertos quimioterápicos importantes para a luta contra o câncer (ZAID et al., 2017).

Para preencher a grande demanda por novos agentes anticâncer, o uso de biotecnologia vegetal através do cultivo molecular de plantas pode acelerar esse processo ao produzir alterações genéticas que levem ao acúmulo de compostos farmacologicamente ativos já presentes nas plantas (BUYEL, 2018). Porém, assim como as demais alternativas terapêuticas, o uso de fitoterápicos requer cuidados quanto aos possíveis efeitos tóxicos e colaterais, sendo necessária uma administração consciente para que seu uso seja feito de forma segura e benéfica ao paciente (ALLEGRA et al., 2023).

Diversas plantas medicinais têm sido estudadas para investigar seus potenciais efeitos antitumorais, dentre elas um grupo de plantas conhecidos como ervas-de-passarinho ou visco. As ervas-de-passarinho são comumente utilizadas na medicina complementar para tratar o câncer, especialmente na Europa, e atuam através de ações imunomoduladoras e inibidoras do crescimento de células cancerígenas em cânceres como de pulmão, próstata e mama (KIENLE; KIENE, 2010). No entanto, é importante ressaltar que a pesquisa sobre o uso das ervas-de-passarinho contra o câncer ainda é limitada e que mais estudos são necessários para confirmar seus efeitos.

2.5 ERVAS-DE PASSARINHO

São conhecidas popularmente como erva-de-passarinho ou visco, espécies botânicas das famílias Loranthaceae, Viscaceae e Cucurbitaceae, entre outras (MARTINS et al., 2006). Os indígenas brasileiros a conheciam como *guirarepoti*, que em língua tupi significa “excremento de aves” e o seu nome popular erva-de-passarinho está associado exatamente a essa dependência das aves para a dispersão de suas sementes. Após as aves se alimentarem dos frutos elas liberam as sementes pela regurgitação ou defecação e estas se aderem através de uma camada mucilaginosa às plantas hospedeiras (LEAL; BUJOKAS; BIONDI, 2006).

As ervas- de-passarinho são consideradas hemiparasitas porque fornecem à planta produtos oriundos de sua fotossíntese e ao mesmo tempo obtêm água e sais minerais das espécies parasitadas através da fixação por haustórios, um tipo de raiz modificada (MELO; DA SILVA, 2012). Geralmente parasitam árvores de grande porte como as da família Bignoniaceae (ipê), Meliaceae (cinamomo), Anacardiaceae (mangueira), Rubiaceae (cafeeiro) e Asteraceae (assa-peixe), dentre outras (MARTINS et al., 2006).

As famílias Santalaceae e Loranthaceae formam o maior grupo de plantas hemiparasitas da flora mundial (DER; NICKRENT, 2008). As plantas pertencentes à família Loranthaceae são reconhecidas há muitos anos pelas suas propriedades terapêuticas e essa família possui 40 gêneros e 1500 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (VENTURELLI, 1981).

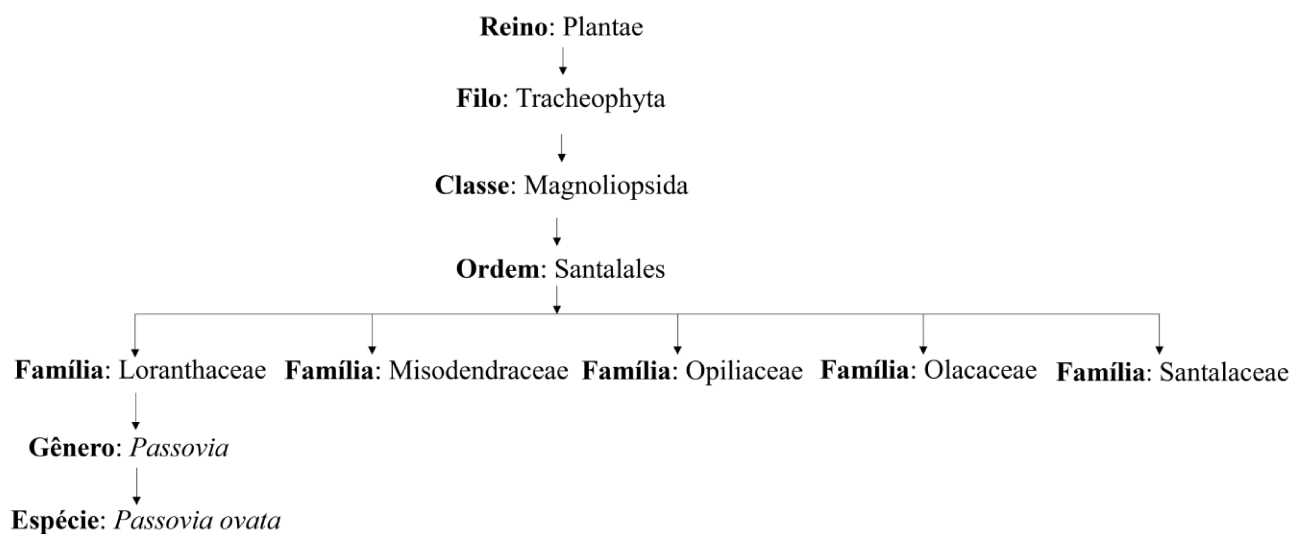
Phthirusa, *Psittacanthus* Mart. e *Struthanthus* Mart. são os gêneros mais diversificados de erva-de-passarinho encontrados na flora brasileira quando comparados àqueles de outros países da América do Sul (ARRUDA et al., 2012). No Brasil pode-se encontrar cerca de 10% das espécies de erva-de-passarinho do mundo (ARRUDA et al. 2009). Em levantamento no Estado do Rio de Janeiro, foram encontradas 17 espécies de *Struthanthus*, cinco espécies de *Psittacanthus* e três espécies de *Phthirusa* (REIF; ANDREATA, 2011).

Struthanthus flexicaulis é uma das espécies do gênero *Struthanthus* spp. mais comuns no Brasil, sendo amplamente distribuída em áreas de cerrado (RIZZINI, 1980). Além disso, essa espécie parasita cerca de 44 espécies pertencentes a 19 famílias (MOURÃO et al., 2006). Na cidade de Caxias no estado Maranhão, Brasil, foram encontradas espécies dos gêneros *Phoradendron*, família Santalaceae, e *Struthanthus* e *Psittacanthus*, ambas da família Loranthaceae (DA CONCEIÇÃO et al., 2010).

O gênero *Passovia* ocorre do México à Bolívia e Brasil, incluindo a Jamaica. *Passovia* inclui ervas de passarinho neotropicais caracterizados por inflorescências compostas de tríades bracteoladas, pequenas flores tetra-hexâmeras e filamentos escavados lateralmente com anteras basifixadas. Vinte e quatro espécies foram reconhecidas, incluindo *Passovia ovata* (CAIRES et al., 2021), a qual é de comum ocorrência no cerrado (SCALON, 2010).

Por muitos anos o gênero *Passovia* foi conhecido como *Phtirusa*. A última mudança aconteceu em 2011, com a renomeação de *Passovia* e sua separação do gênero *Phtirusa*. Apenas as espécies *Phtirusa macrophylla*, *Phtirusa exilis*, *Phtirusa rhynchophylla* e *Phtirusa hutchisonii* foram mantidas neste gênero, as outras, incluindo *Phtirusa ovata*, passaram a integrar o gênero *Passovia* (KUIJT, 2011). A classificação científica de *P. ovata* pode ser vista na Figura 2.

FIGURA 2. Classificação científica da espécie *Passovia ovata*.



Adaptado de Grupo de Filogenia de Angiospermas (APG II, 2003) e Flora do Brasil (BFG, 2021).

Não está bem definida a influência que os componentes químicos da planta hospedeira tem nos princípios ativos da planta parasita, mas o solo e as circunstâncias do meio climático modificam o vigor da planta parasita, o qual acompanha parcialmente o vigor da planta hospedeira. Estudos com ervas-de-passarinho parasitas de Leguminosae, Apocynaceae e Bignoniaceae não revelaram mudanças na existência de substâncias específicas e exclusivas dos hospedeiros (DA CONCEIÇÃO et al., 2010). Porém a planta hospedeira pode influenciar não só o padrão de crescimento da erva-de-passarinho, como

também na sua produção de compostos químicos (AJITHKUMAR; THOMAS; MATHEW, 2021).

Os estudos fitoquímicos são importantes para determinar as composições químicas das espécies vegetais e avaliar sua ocorrência nelas, e assim identificar grupos de metabólitos secundários significativos (SIMÕES et al., 2004). A definição dos compostos majoritários da planta também é importante, pois esses podem ser os responsáveis por sua atividade biológica. Compostos majoritários de diferentes ervas-de-passarinho podem ser analisados na Tabela 1.

TABELA 1. Compostos majoritários de diferentes espécies de ervas de passarinho da família Loranthaceae

Espécie	Parte da planta	Apresentação	Compostos majoritários	Referência
<i>Phthirusa adunca Meyer</i>	Folha	Óleo essencial	Beta-felandreno, germacreno D e beta-pineno	Mora et al., 2011
<i>Struthanthus vulgaris</i>	Folha	Extrato etanólico	Ácido clorogênico, ácido rosmarínico e quercetina	Marques et al., 2017
<i>Struthanthus marginatus</i>	Folha	Extrato aquoso	Ácido 3-trans-cafeoilquínico (3-trans-CGA), quercetina e kaempferol	Freire et al., 2018
<i>Psittacanthus calyculatus</i>	Planta seca	Fração metanólica	Ácido gálico, flavonol-3-biosídeo e N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina.	Moustapha et al., 2011
<i>Tripodanthus acutifolius</i>	Folha	Extrato diclorometânico	6,2', 4'-trimetoxiflavona, 5,3', 4'-trihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona, 5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona e (E)-2' e 4'-dihidroxi-6'-metoxi-chalcona	Apaza Ticona et al., 2019
<i>Loranthus Acaciae</i>	Folha	Extrato metanólico	Quercetina, catequina, epicatequina 3-ogalato, linamarina e lupinina	Abbas; Al-najjar; Jaffal, 2021
<i>Helicanthes elasticus</i>	Acessos parasitas	Extrato metanólico	1,2,3-benzenotriol (pirogalol) e metil-3,4,5-trihidroxibenzoato (metilgalato)	Ajithkumar; Thomas; Mathew, 2021
<i>Struthanthus marginatus</i> Desr. Blume	Folhas	Extrato alcoólico	β-D-glicopiranosose e os ácidos etanodiólico, butanodiólico, propanóico, tetrônico e D-glicurônico	Alves et al., 2011

As pesquisas com ervas-de-passarinho foram impulsionadas pelo uso popular de suas folhas no tratamento de inflamações, doenças uterinas, gonorreia, limpeza da pele, espinhas, gastrite, úlceras, tumores, câncer, sarnas, afecções da pele, diabetes, pneumonia

(DA CONCEIÇÃO et al., 2010), infecções respiratórias, regulação da glicemia e como ansiolítico (MELO; DA SILVA, 2012). Em zonas rurais de lugares subdesenvolvidos é usada por suas propriedades medicinais como remédio para diversas doenças humanas e como alimento para animais. Por ser uma fonte barata de proteína e facilmente encontrada, é especialmente importante para a alimentação de ruminantes em locais quem enfrentam dificuldades com alimentação em períodos de seca (SALEH et al., 2015).

Os viscos apresentam atividades farmacológicas em diferentes vias biológicas, como receptores de membrana, enzimas, canais iônicos, proteínas transportadoras e alvos transcricionais (SZURPNICKA; KOWALCZUK; SZTERK, 2020). Ervas-de-passarinho possuem potencial de interferir na resposta imunológica, através de efeitos anti-inflamatórios por inibição de ciclooxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) e de prostaglandina-E2 (PGE2) (HEGDE et al., 2011). Podem ainda reduzir citocinas inflamatórias séricas em indivíduos submetidos a exercícios de alta resistência (HA et al., 2021).

Extratos de ervas-de-passarinho podem ter proeminente ação antioxidante, já demonstrada em modelo murino com diabetes induzida por estreptozotocina (ORHAN et al., 2005). A capacidade antioxidante dos extratos dessas plantas, geralmente produzido a partir de folhas e caules, são influenciados por fatores ambientais, como estação do ano, clima e temperatura, devido a mudanças no acúmulo de compostos com ação antioxidante no tecido vegetal (VICAS; RUGINA; SOCACIU, 2012).

O conteúdo fenólico dos extratos, responsável por parte de seu potencial antioxidante, pode ser influenciado pela digestão gastrointestinal, o que encoraja o desenvolvimento de metodologias de encapsulamento para proteger esses metabólitos e preservar seus potenciais antioxidantes e hipolipidêmicos (GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2022). O potencial antioxidante de viscos pode ser determinado não apenas por fenóis, mas por uma sinergia complexa de moléculas ativas (VISCAS, RUGINA, SOCACIU, 2012).

O extrato hidroetanólico a 70% de *Struthanthus vulgaris* demonstrou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (VIEIRA et al., 2005) como *Staphylococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*, além de possuir atividade antioxidante, com estímulo a proliferação e migração de fibroblastos (VITTORAZZI et al., 2016). Esse extrato também foi eficaz no tratamento de feridas cutâneas em ratos Wistar, com ação imunomodulatória ao interferir nas citocinas IL-1 α , IL-10, TNF- α e TGF- β , além de induzir a redução da produção de óxido nítrico (*nitric oxide* – NO). O tratamento com pomada com *S. vulgaris* em sua composição também acelerou a epitelização da ferida com

aumento na deposição e organização das fibras de colágeno, e melhora na qualidade do tecido cicatricial (GRAMMA et al., 2016).

O extrato etanólico de folha de *S. vulgaris* apresentou efeitos anti-inflamatórios com redução na produção de NO e TNF- α em macrófagos. *In vivo*, na resposta inflamatória induzida pela carragenina em camundongos, o extrato etanólico de folha de *S. vulgaris* suprimiu significativamente o influxo de leucócitos, principalmente neutrófilos, a exsudação de proteínas e a produção de NO, TNF- α e IL-1 (MARQUES et al., 2017). *Struthanthus marginatus* demonstrou atividade gastroprotetora e anti-úlceras por meio da redução na secreção ácida, aumento do muco gástrico e possível atividade antioxidante (FREIRE et al., 2011). A população acredita que a melhor planta para inflamação é a de “folha pequena”, a qual corresponde a espécie *Struthanthus flexicaulis*, de preferência as que parasitam mangueiras, *Mangifera indica*, e laranjeiras, *Citrus sinensis* (DA CONCEIÇÃO et al., 2010).

O óleo essencial de *Phthirusa adunca* demonstrou ação bactericida contra *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (MORA et al., 2011).

Há crescentes evidências sobre o uso de ervas-de-passarinho como terapia complementar no tratamento do câncer e efeitos colaterais decorrentes da terapêutica tradicional. Pacientes com câncer de mama ou pancreático podem se beneficiar com o tratamento oral com extrato de ervas-de-passarinho para melhorar a sua qualidade de vida e sobrevida (THRONICKE et al., 2022). Iscador(®)Qu é um dos medicamentos mais populares produzidos a partir da erva-de-passarinho europeia *V. album* e é considerado o primeiro candidato a ser incluído como tratamento de suporte em protocolos de quimioterapia ou radioterapia para pacientes com câncer colorretal, promovendo melhora em sintomas de fadiga relacionada ao câncer (BOCK et al., 2014).

Diversos efeitos antitumorais *in vitro* de ervas-de-passarinho já foram relatados. Dessa forma, essas plantas conseguem inibir a proliferação de células tumorais de diversas linhagens como de câncer de mama, cólon, pulmão, próstata e estômago. As vias de atuação nestas células são amplas e envolvem mecanismos de indução de apoptose e interferência em mecanismos de proliferação tumoral através de proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*-MAPK) (PARK et al. 2012) e fosfatidilinositol 3-quinase / proteína quinase B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B - PI3K / AKT) (FAN et al. 2019).

Em terapias oncológicas, ervas-de-passarinho são usadas como coadjuvantes, devido aos seus efeitos imunomoduladores e na melhoria da qualidade de vida dos pacientes. As

propriedades antitumorais destas plantas estão associadas também às suas propriedades antioxidantes, as quais também participam do vínculo entre câncer e inflamação. A unicidade do metabolismo das ervas-de-passarinho, decorrente em parte de seu hemiparasitismo, é um fator chave para explicar suas propriedades biológicas e orientar seus usos terapêuticos (NICOLETTI, 2023).

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório e antineoplásico do extrato hidroetanólico de *P. ovata* (POH) e de suas frações hexânica, acetato de etila e aquosa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição fitoquímica de POH e frações;
- Avaliar a atividade citotóxica de POH e frações em células RAW 264.7;
- Quantificar os níveis de nitrito e citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α , em sobrenadantes de cultura de macrófagos RAW 264.7 tratados com POH;
- Avaliar o efeito do tratamento com POH no edema de pata induzida por λ -carragenina em camundongos BALB/c;
- Avaliar o efeito do tratamento com POH na peritonite induzida por λ -carragenina em camundongos BALB/c;
- Determinar a capacidade antioxidante de POH e frações;
- Avaliar a citotoxicidade de POH e frações em linhagens de fibroblasto CCD-1072Sk;
- Avaliar atividade antitumoral de POH e frações nas linhagens celulares tumorais MCF-7 e MDA-MB 231.

REFERÊNCIAS

ABBAS, M. A.; AL-NAJJAR, B. O.; JAFFAL, S. M. A multifaceted review journal in the field of pharmacy systematic reviews in pharmacy analgesic property of *Loranthus Acaciae* studied by molecular docking and biological assays. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 12, n. 3, p. 712-719, 2021.

ABDULKHALEQ, L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; HEZMEE, M. N. M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Vet World**, v.11, n.5, p. 627-635, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2018>>.

AJITHKUMAR, T. G.; THOMAS, S.; Mathew, L. Influence of hosts on the production of bioactive compounds in the hemiparasitic plant *Helicanthes elasticus*. **Environmental and Experimental Biology**, v. 19, p. 161-171, 2021.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, p. 783-801, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>>.

ALLEGRA, S.; DE FRANCIA, S.; TURCO, F.; BERTAGGIA, I.; CHIARA, F.; ARMANDO, T.; STORTO, S.; MUSSA, M.V. Phytotherapy and Drugs: Can Their Interactions Increase Side Effects in Cancer Patients? **Journal of Xenobiotics**, v. 13, n. 1, p. 75-89, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/jox13010007>>.

ALVES, E. M.; MARINS, A. K.; QUEIROZ, V. T.; PINHEIRO, P. F.; COSTA, A. V.; FAGUNDES, L. L. Estudo fitoquímico da erva-de-passarinho (*Struthanthus marginatus* Desr. Blume) parasitando laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osbeck). In: XV ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XI ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA Univap, 2011, São José dos Campos.

AMJAD, M. T.; CHIDHARLA, A.; KASI, A. **Cancer Chemotherapy**. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

APAZA TICONA, L.; SERBAN, A-M; CABANILLAS, A.; VILLACAMPA, A.; RUMBERO, A. Flavonoids of *Tripodanthus acutifolius* inhibit TNF- α production in LPS-activated THP-1 and B16-F10 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 242, p. 112036, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2019.112036>>.

APG II. ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II. An update of the angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 4, p. 399-436, 2003.

ARRUDA, R.; FADINI, R. F.; MOURÃO, F. A.; JACOBI, C. M.; TEODORO, G. S. **Natural history and ecology of neotropical mistletoes**. In: Tropical Biology and Conservation Management: Natural history of tropical plants. Oxford, 2009, p. 133-154.

ARRUDA, R.; FADINI, R. F.; CARVALHO, L. N.; DEL-CLARO, K.; MOURÃO, F. A.; JACOBI, C. M.; TEODORO, G. S.; BERG, E.V.D.; CAIRES, C. S.; DETTKE, G. A. Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian

ecosystems. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p. 264-274, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062012000200003>>.

ASLAM, M. S.; NAVEED, S.; AHMED, A.; ABBAS, Z.; GULL, I.; ATHAR, M. A. side effects of chemotherapy in cancer patients and evaluation of patients opinion about starvation based differential. **Chemotherapy Journal of Cancer Therapy**, v. 5, p. 817-822, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/110.4236/jct.2014.58089>>.

ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061801>>.

AUSTERMANN, J.; ROTH, J.; BARCZYK-KAHLERT, K. The good and the bad: monocytes' and macrophages' diverse functions in inflammation. **Cells**, v. 11, n. 12, p. 1979, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/cells11121979>>.

BARRETO, R. C.; PEREIRA, G. A. S.; COSTA, L. J.; CAVALCANTI, H. R. B. B. O duplo papel da inflamação no surgimento das lesões cancerígenas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 107-114, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4034/RBCS.2010.14.04.15>>.

BFG. THE BRAZILIAN FLORA GROUP. **Flora of Brazil 2020**, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.47871/jbrj2021001>>.

BOCK, P. R.; HANISCH, J.; MATTHES, H.; ZÄNKER, K. S. Targeting inflammation in cancer-related-fatigue: a rationale for mistletoe therapy as supportive care in colorectal cancer patients. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 13, n. 2, p.105-111, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/1871528113666140428103332>>.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms21093233>>.

BUNGSU, I.; KIFLI, N.; AHMAD, S. R.; GHANI, H.; CUNNINGHAM, A. C. Herbal plants: the role of AhR in mediating immunomodulation. **Frontiers in Immunology**, v.24, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.697663>>.

BUYEL, J. F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 506-520, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.002>>.

CAIRES, C. S.; GOMES-BEZERRA, K. M.; MACHADO, A. F. P.; DETTKE, G. A. Nomenclatural novelties and synopsis of *Passovia* (Loranthaceae): new synonyms, new combinations and reinstated species. **Rodriguésia**, v. 72, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202172092>>.

CHAZAUD, B. Inflammation and skeletal muscle regeneration: leave it to the macrophages! **Trends in Immunology**, v. 41, n. 6, p. 481-492, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2020.04.006>>.

CHEN, J. F.; YAN, Q. The roles of epigenetics in cancer progression and metastasis. **Biochemical Journal**, v. 478, n. 17, p. 3373-3393, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1042/BCJ20210084>>.

CHOI, S. H. WHO traditional medicine strategy and activities. Standardization with evidence-based approaches. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 1, p. 153-154, 2008.

CHU, C. S.; RUBIN, S. C. Princípios básicos da quimioterapia. In: DI SAIA, P. J.; CREASMAN, W. T.; MANNEL, R. S.; MCMEEKIN, D. S.; MUTCH, D. G.; (Ed. 9) *Oncologia ginecológica clínica* Filadélfia, PA: Elsevier, 2018. p. 449-469.

COOPER, G. M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Oncogenes.

DA CONCEIÇÃO, G. M.; RUGGIERI, A. C.; BARBOSA, F. C.; ARAUJO, M. F. V.; DA CONCEIÇÃO, T. T. M. M.; CONCEIÇÃO, M. A. M. M.D.A. Erva-de-Passarinho: substratos vegetais, uso e aplicações na medicina popular, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 6, 2010.

DER, J. P.; NICKRENT, D. L. A Molecular phylogeny of Santalaceae (Santalales). **Systematic Botany**, v. 33, n. 1, p. 107-116, 2008.

DERMIME, S. Cancer diagnosis, treatment and therapy. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. 2, n. 14, p. 1-2, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2157-2518.S14-007>>.

EFFERTH, T.; SAEED, M. E. M.; MIRGHANI, E.; ALIM, A.; YASSIN, Z.; SAEED, E.; KHALID, H. E.; DAAK, S. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 50284-50304, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.17466>>.

EL-HARAKEH, M.; AL-GHADBAN, S.; SAFI, R. Medicinal plants towards modeling skin cancer. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 2, p. 148-161, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18632/10.2174/1389450121666201005103521>>.

FAN, Y.; MAO, R.; YANG, J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. **Protein & Cell**, v. 4., n. 3, p. 176-185, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13238-013-2084-3>>.

FAN, J.; WU, M.; WANG, J.; REN, D.; ZHAO, J.; YANG, G. 1,7-Bis(4-hydroxyphenyl)-1,4-heptadien-3-one induces lung cancer cell apoptosis via the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 6336-6349, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27364>>.

FIGUEIREDO, C. R. L. V. The unusual paradox of cancer-associated inflammation: an update / O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 3, p. 321-332, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20190029>>.

FISHBEIN, A.; HAMMOCK, B. D.; SERHAN, C. N.; PANIGRAHY, D. Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 218, p. 107670, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107670>>.

FOSS, C. A.; SANCHEZ-BAUTISTA, J.; JAIN, S. K. Imaging macrophage-associated inflammation. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 48, n. 3, p. 242-245, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2017.12.002>>.

FREIRE, S. M. F.; ANDRADE, K. N. S.; ARAGÃO, J. R. G. A.; NORONHA, E.P.; SILVA, S. N.; CARTÁGENES, M. S. S.; BORGES, M. O. R.; RIBEIRO, M. N. S.; TORRES, L. M. B.; BORGES, A. C. R. Antiulcerogenic activity of the extracts of *Struthanthus marginatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 6, p. 1089-1095, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000150>>.

FREIRE, S. M. F.; SILVA, R. V.; MORAIS, T. M. F.; BORGES, A. C. R. Protective effect of *Struthanthus marginatus* on ethanol-induced gastric damage in mice. **Pharmacognosy Research**, v. 10, n. 2, p. 143-150, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/10.4103/pr.pr_76_17>.

FURMAN, D.; CAMPISI, J.; VERDIN, E; CARRERA-BASTO, P.; TARG, S.; FRANCESCHI, C.; FERRUCCI, L.; GILROY, D. W.; FASANO, A.; MILLER, G. W.; MILLER, A. H.; MANTOVANI, A.; WEYAND, C. M.; BARZILAI, N.; GORONZY, J. J.; RANDO, T. A.; EFFROS, R. B.; LUCIA, A.; KLEINSTREUER, N.; SLAVICH, G. M. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v. 25, p. 1822-1832, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>>.

GERMOLEC, D.R.; SHIPKOWSKI, K.A.; FRAWLEY, R.P.; EVANS, E. Markers of Inflammation. **Methods in Molecular Biology**, p. 57-79, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5>.

GIULIANI, C.; BUCCI, I.; NAPOLITANO, G. The role of the transcription factor nuclear factor-kappa B in thyroid autoimmunity and cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 471, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2018.00471>>.

GRAMMA, L. S. S.; MARQUES, F. M.; VITTORAZZI, C.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R.; FRONZA, M. *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 190, p. 319-327, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.050>>.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, v. 51, n.1, p. 27-41, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>>.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>>.

GUERRA-MARTÍN, M. D.; TEJEDOR-BUENO, M. S.; CORREA-CASADO, M. Effectiveness of complementary therapies in cancer patients: a systematic review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 1017, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijerph18031017>>.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P.; ZAMUDIO-SOSA, V. E.; CONTRERAS-ÂNGULO, L. A.; LEYVA-LÓPEZ, N.; HEREDIA, J. B. Bioaccessibility of phenolic compounds from mistletoe infusions and effect of in vitro digestion on its antioxidant and pancreatic lipase

inhibitory activity. **Foods**, v. 11, n. 21, p. 3319, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/foods11213319>>.

GUERRIERO, G.; BERNI, R.; MUÑOZ-SANCHEZ, J. A.; APONE, F.; ABDEL-SALAM, E. M.; QAHTAN, A. A.; ALATAR, A. A.; CANTINI, C.; CAI, G.; HAUSMAN, J. F.; SIDDIQUI, K. S.; HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S. M. T.; FAISAL, M. Production of plant secondary metabolites: examples, tips and suggestions for biotechnologists. **Genes (Basel)**, v. 9, n. 6, p. 309, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/genes9060309>>.

HA, S.; KIM, J.; KIM, J.; KIM, D.; HA, M. The potential role of Korean mistletoe extract as an anti-inflammatory supplementation. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, p. 10, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2021/2183427>>.

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, p. 150845, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/150845>>.

HAWIGER, J.; ZIENKIEWICZ, J. Decoding inflammation, its causes, genomic responses, and emerging countermeasures. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 90, n. 6, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/sji.12812>. 2019>.

HAZAFI, A.; REHMAN, K. U.; JAHAN, N.; JABEEN, Z. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 72, n. 3, p. 386-397, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2019.1637006>>.

HEGDE, P.; MADDUR, M. S.; FRIBOULET, A.; BAYRY, J.; KAVERI, S. V. *Viscum album* exerts anti-inflammatory effect by selectively inhibiting cytokine-induced expression of cyclooxygenase-2. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26312, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026312>>.

HOURANI, T.; HOLDEN, J.A.; LI, W.; LENZO, J.C.; HADJIGOL, S.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M. Tumor associated macrophages: origin, recruitment, phenotypic diversity, and targeting. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 788365, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.788365>>.

ISLAM, M. R.; AKASH, S.; RAHMAN, M. M.; NOWRIN, F. T.; AKTER, T.; SHOHAG, S.; RAUF, A.; ALJOHANI, A. S. M.; SIMAL-GANDARA, J. Colon cancer and colorectal cancer: prevention and treatment by potential natural products. **Chemico-Biological Interactions**, v. 368, p. 110170, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110170>>.

ISLAM, M. R.; AKASH, S.; RAHMAN, M. M.; NOWRIN, F. T.; AKTER, T.; SHOHAG, S.; RAUF, A.; ABDULLAH, S. M.; ALJOHANI, D.; SIMAL-GANDARA, J. Colon cancer and colorectal cancer: prevention and treatment by potential natural products. **Chemico-Biological Interactions**, v. 368, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110170>>.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. New insights into tissue macrophages: from their origin to the development of memory. **Immune network**, v. 15, n. 4, p. 167-176, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4110/in.2015.15.4.167>>.

JAROSZ-BIEJ, M.; SMOLARCZYK, R.; CICHÓN, T.; KUŁACH, N. Tumor microenvironment as a "game changer" in cancer radiotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3212, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms20133212>>.

KALISH, S.; LYAMINA, S.; MANUKHINA, E.; MALYSHEV, Y.; RAETSKAYA, A.; MALYSHEV, I. M3 Macrophages stop division of tumor cells in vitro and extend survival of mice with Ehrlich ascites carcinoma. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 23, p. 8-19, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.12659/msmbr.902285>>.

KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **BBA**, p. 253-262, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.017>>.

KAY, J.; THADHANI, E.; SAMSON, L.; ENGELWARD, B. Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. **DNA Repair (Amst)**, v. 83, p. 102673, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102673>>.

KENNEDY, L. B.; SALAMA, A. K. S. A review of cancer immunotherapy toxicity. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 2, p. 86-104, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3322/caac.21596>>.

KIENLE, G. S.; KIENE, H. Review article: influence of *Viscum album L* (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. **Integrative Cancer Therapies**, v. 9, n. 2, p. 142-57, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1534735410369673>>.

KHAN, M. I.; BOUYAHYA, A.; HACHLAFI, N. E. L.; MENYIY, N. E.; AKRAM, M.; SULTANA, S.; ZENGIN, G.; PONOMAREVA, L.; SHARIATI, M.A.; OJO, O. A.; DALL'ACQUA, S.; ELEBIYO, T. C. Anticancer properties of medicinal plants and their bioactive compounds against breast cancer: a review on recent investigations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 17, p. 24411-24444, 2022.

KHANDIA, R.; MUNJAL, A. Interplay between inflammation and cancer. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 119, p. 199-245, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.09.004>>.

KIWERSKA, K.; SZYFTER, K. DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy—a double-edged sword. **Journal of Applied Genetics**, v.60, p. 329-334, 2019.

KLAUNIG, J. E. Oxidative Stress and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 40, p. 4771-4778, 2018.

KLOC, M.; SUBUDDHI, A.; UOSEF, A.; KUBIAK, J. Z.; GHOBRIAL, R. M. Monocyte-macrophage lineage cell fusion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6553, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms23126553>>.

KONTOMANOLIS, E. M.; KOUTRAS, A.; SYLLAIOS, A.; SCHIZAS, D.; MASTORAKI, A; GARMPIIS, N.; DIAKOSAVVAS, M.; ANGELOU, K.; TSATSARIS, G.; PAGKALOS, A.; NTOUNIS, T.; FASOULAKIS, Z. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. **Anticancer Research**, v. 40, p. 6009-6015, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21873/anticancer.14622>>.

KRATOFIL, R. M.; KUBES, P.; DENISET, J. F. Monocyte conversion during inflammation and injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 37, n. 1, p. 35-42, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308198>>.

KUIJT, J. Pulling the skeleton out of the closet: resurrection of *Phthirusa sensu* Martius and consequent revival of *Passovia* (Loranthaceae). **Plant Diversity and Evolution**, v. 129, p. 159-211, 2011.

LEAL, L.; BUJOKAS, W. M.; BIONDI, D. Análise da infestação de erva-de-passarinho na arborização de ruas de Curitiba PR. **Floresta**, v. 36, n. 3, 2006.

LEWANDOWSKA, A. M.; RUDZKI, M.; RUDZKI, S.; LEWANDOWSKI, T.; LASKOWSKA, B. Environmental risk factors for cancer - review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.26444/aaem/94299>>.

LIU, J.; WANG, S., ZHANG, Y., FAN, H. T.; LIN, H. S. Traditional chinese medicine and cancer: history, present situation, and development. **Thoracic Cancer**, v. 6, n. 5, p. 561-569, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1759-7714.12270>>.

MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, R. C. Medicamentos fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruo murundeuva* Allemão). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 283-289, 2014.

MARQUES, F. M.; COSTA, M. R.; VITTORAZZI, C.; GRAMMA, L. S. S.; BARTH, T.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R.; FRONZA, M. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of *Struthanthus vulgaris*. **Planta Medica**, v. 83, n. 9, p. 770-777, 2017.

MARTINS, L. G. S.; VALE, L. S.; LAINETTI, R.; PEREIRA, N. A. Um estudo sobre a toxicidade da erva-de-passarinho (*Struthanthus marginatus*, Lorantaceae), parasitando trombeteira (*Datura suaveolens*, Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 87, n. 2, p. 63-64, 2006.

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current Cancer Epidemiology. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 4, p. 217-222, 2019.

MCGARTY, T. What is Meant by Cancer? Technical Report, n. 124, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.15143.09120>>.

MELO, C. A.; DA SILVA, C. M. Avaliação da atividade antioxidante in vitro através do método de DPPH de cinco extratos de *Tripodanthus acutifolius* (ruiz e pavón) van tieghem e de seus hospedeiros. Anais do IX Salão de Ensino e Extensão. Universidade de Santa Cruz do Sul, 2012.

MERCADANTE, A. A.; KASI, A. Genetics, Cancer Cell Cycle Phases. In: StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.

MICHELS DA SILVA, D.; LANGER, H.; GRAF, T. inflammatory and molecular pathways in heart failure-ischemia, HFpEF and transthyretin cardiac amyloidosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.

MORA, F. D.; RÍOS, N.; ROJAS, L. B.; DÍAZ, T.; VELASCO, J.; CARMONA, J. A.; SILVA, B. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Phthirusa adunca* from Venezuelan Andes. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 1051-1053, 2011.

MOURÃO, F. A.; DO CARMO, F. F.; RATTON, P., JACOBI, C. M. Hospedeiras da hemiparásita *Struthanthus flexicaulis* (Mart.) Mart. (Loranthaceae) em campos rupestres ferruginosos, Quadrilátero Ferrífero, MG. **Lundiana**, v. 7, n. 2, p. 103-110, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.35699/2675-5327.2006.23066>>.

MOUSTAPHA, B.; MARINA, G.A.; RAÚL, F.O.; RAQUEL, C.M.; MAHINDA, M. Chemical constituents of the mexican mistletoe (*Psittacanthus calyculatus*). **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9397-9403, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/molecules16119397>>.

MUN, E. J.; BABIKER, H. M.; WEINBERG, U.; KIRSON, E. D.; VON HOFF, D. D. Tumor-treating fields: a fourth modality in cancer treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 2, p. 266-275, 2017. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1117>>.

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. **Annual Review of Physiology**, v. 79, p. 541-566, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>>.

NETEA, M. G.; BALKWILL, F.; CHONCHOL, M.; COMINELLI, F. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826-831, 2017.

NEVES, J.; SOUSA-VICTOR, P. Regulation of inflammation as an anti-aging intervention. **FEBS Journal**, v. 287, n. 1, p. 43-52, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/febs.15061>>.

NICOLETTI, M. The anti-inflammatory activity of *Viscum album*. **Plants**, v. 12, n. 7, p. 1460, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/plants12071460>>.

O'DONNELL, J. S.; TENG, M. W. L.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 3, p. 151-167, 2019.

OISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **International Immunopharmacology**, v. 30, n. 11, p. 511-528, 2018.

OKEM, A.; HENSTRA, C.; LAMBERT, M.; HAYESHI, R. A review of the pharmacodynamic effect of chemo-herbal drug combinations therapy for cancer treatment. **Medicine in Drug Discovery**, v. 17, 2023.

ORHAN, D. D.; ASLAN, M.; SENDOGDU, N.; ERGUN, F.; YESILADA, E. Evaluation of the hypoglycemic effect and antioxidant activity of three *Viscum album* subspecies (European mistletoe) in streptozotocin-diabetic rats. **The Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1, p. 95-102, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.033>>.

PARK, Y. K.; DO, Y. R.; JANG, B. C. Apoptosis of K562 leukemia cells by Abnobaviscum F®, a european mistletoe extract. **Oncology Reports**, v. 28, p. 2227-2232, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3892/or.2012.2026>>.

PARK, M.; KIM, D.; KO, S.; KIM, A.; MO, K.; YOON, H. Breast cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6806, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms23126806>>.

PETTY, A. J.; YANG, Y. Tumor-associated macrophages: Implications in cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 9, n. 3, p. 289-302, 2017.

PIAO, B. K.; WANG, Y. X.; XIE, G. R.; MANSMANN, U.; MATTHES, H.; BEUTH, J.; LIN, H. S. Impact of complementary mistletoe extract treatment on quality of life in breast, ovarian and non-small cell lung cancer patients. A prospective randomized controlled clinical trial. **Anticancer Research**, v. 24, n. 1, p. 303-309, 2004.

PIEROTTI, M. A.; SOZZI, G.; CROCE, C. M. **Mechanisms of oncogene activation**. In: KUFER, D.W.; POLLOCK, R.E.; WEICHSELBAUM, R.R. (Ed.). *Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker, 2003.

POH, A. R.; ERNST M. Targeting macrophages in cancer: from bench to bedside. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 2018.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

REIF, C.; ANDREATA, R. H. P. Contribuição à taxonomia de Loranthaceae no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Pesquisas Botânicas**, v. 62, p. 71-115, 2011.

REIS, D.; JONES, T. Aromatherapy: Using Essential Oils as a Supportive Therapy. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 21, n. 1, p. 16-19, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1188/17.CJON.16-19>>.

RIBATTI, D.; TAMMA, R.; ANNESE, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. **Translational Oncology**, v. 13, n. 6, p. 100773, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773>>.

RILEY, R. S.; JUNE, C. H.; LANGER, R.; MITCHELL, M. J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 3, p. 175-196, 2019.

RIZZINI, C. T. Loranthaceae of central Brazil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, n. 24, p.19-50, 1980.

SAEEDIFAR, A. M.; MOSAYEBI, G.; GHAZAVI, A.; BUSHEHRI, R. H.; GANJI, A. Macrophage polarization by phytotherapy in the tumor microenvironment. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 7, p. 3632-3648, 2021.

SALEH, I.; MAIGANDI, S. A.; HUDU, M. I.; ABUBAKAR, M. I.; SHEHU, A. U. Uses and chemical composition of mistletoe (*Viscum album*) obtained from different species of trees. **Dutse Journal of Agriculture and Food Security**, v. 2, n. 1, p. 8, 2015.

SALEHI, B.; ZUCCA, P.; SHARIFI-RAD, M.; PEZZANI, R.; RAJABI, S.; SETZER, W. N.; VARONI, E. M.; IRITI, M.; KOBARDARD, F.; SHARIFI-RAD, J. Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 1425-1449, 2018.

SANTOS-FILHO, S. D.; PRESTA, G. A.; PAOLI, S.; MISSAILIDS, S.; FONSECA, A. S.; BERNARDO-FILHO, M. Radiotherapy, cancer and some anatomical structures related with the pelvic floor: an evaluation of the scientific literature. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 45-50, 2008.

SCALON, M. C. 2010. Plantas hemiparasitas do Cerrado e sua relação com hospedeiras acumuladoras e não-acumuladoras de Alumínio. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasil.

SCHULZ, C.; GOMEZ, P. E.; CHORRO, L.; SZABO-ROGERS, H.; CAGNARD, N.; KIERDORF, K.; PRINZ, M.; WU, B.; JACOBSEN, S. E.; POLLARD, J. W.; FRAMPTON, J.; LIU, K. J.; GEISSMANN, F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. **Science**, v. 336, p. 86-90, 2012.

SEIDEL, J. A.; OTSUKA, A.; KABASHIMA, K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 86, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2018.00086>>.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S. A.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J. T.; SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.26429>>.

SHEN, N.; WANG, T.; GAN, Q.; LIU, S.; WANG, L.; JIN, B. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 383, p. 132531, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>>.

SIMÕES, C. M. O.; SCBENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. M.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis (Ed. 5), 2004. p 1102.

SINGH, N.; BABY, D.; RAJGURU, J. P.; PATIL, P. B.; THAKKANNAVAR, S. S.; PUJARI, V. B. Inflammation and cancer. **Annals of African Medicine**, v. 18, n. 3, p.121-126, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4103/aam.aam5618>>.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 175-193, 2019.

SPADACIO, C.; BARROS, N. F. Uso de medicinas alternativas e complementares por pacientes com câncer: revisão sistemática. **Revista Saúde Pública**, v. 42, n. 1, p. 158-64, 2008.

SZURPNICKA, A.; KOWALCZUK, A.; SZTERK, A. Biological activity of mistletoe: in vitro and in vivo studies and mechanisms of action. **Archives of Pharmacal Research**, v. 43, n. 6, p. 593-629, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12272-020-01247-w>>.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, p. 805-820, 2010.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, p. 309-324, 2018.

THEOHARIDES, T. C.; ALYSANDRATOS, K. D.; ANGELIDOU, A.; DELIVANIS, D. A.; SISMANOPOULOS, N.; ZHANG, B.; ASADI, S.; VASIADI, M.; WENG, Z.; MINIATI, A.; KALOGEROMITROS, D. Mast cells and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 1, p. 21-33, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.014>>.

THRONICKE, A.; SCHAD, F.; DEBUS, M.; GRABOWSKI, J.; SOLDNER, G. *Viscum album* L. therapy in oncology: an update on current evidence. **Complementary Medicine Research**, v. 29, n. 4, p. 362-368, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1159/000524184>>.

TODORIC, J.; ANTONUCCI, L.; KARIN, M. Targeting inflammation in cancer prevention and therapy. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 12, p. 895-905, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0209>>.

TOYGAR, İ.; YEŞILBALKAN, Ö. U.; KÜRKÜTLÜ, M.; ASLAN, A. Complementary and alternative medicines used by cancer patients to cope with chemotherapy-induced constipation. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 39, p. 101108, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctcp.2020.101108>>.

TYSNES, B. B.; BJERKVIG, R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1775, p. 283-97, 2007.

VAN ZIJL, F.; KRUPITZA, G.; MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. **Mutation Research**, v. 728, p. 23-34, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.002>>.

VARELA, M. L.; MOGILDEA, M.; MORENO, I.; LOPES, A. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115-1127, 2018.

VARGHESE, R.; DALVI, Y. B. Natural Products as Anticancer Agents. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 11, p. 1272-1287, 2021.

VENTURELLI, M. Estudos sobre *Struthanthus vulgaris* Mart.: anatomia do fruto e semente e aspecto de germinação, crescimento e desenvolvimento. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 131-147, 1981.

VICAS, S. I.; RUGINA, D.; SOCACIU, C. Antioxidant Activity of european mistletoe (*Viscum album*). In: Phytochemicals as Nutraceuticals – Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health. Dr Venketeshwer Rao (Ed.), 2012, p. 115-134.

VIEIRA, O. M. C.; SANTOS, M. H.; SILVA, G. A.; SIQUEIRA, A. M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 149-154, 2005.

VITTORAZZI, C.; ENDRINGER, D. C.; ANDRADE, T. U., SCHERER, R.; FRONZA M. Antioxidant, antimicrobial and wound healing properties of *Struthanthus vulgaris*.

Pharmaceutical Biology, v. 54, n. 2, 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1040515>>.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, 2002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302002000400006> >.

WATANABE, S.; ALEXANDER, M.; MISHARIN, A. V.; BUDINGER, G. R. S. The role of macrophages in the resolution of inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 7, p. 2619-2628, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1172/JCI124615>>.

WEI, G.; WANG, Y.; YANG, G.; WANG, Y.; JU, R. Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy. **Theranostics**, v. 11, n. 13, p. 6370-6392, 2021. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7150/thno.57828>>.

WEIMERSHAUS, M.; CARVALHO, C.; RIGNAULT, R.; WAECKEL-ENEE, E.; DUSSIOT, M.; ENDERT, P. V.; MACIEL, T. T.; HERMINE, O. Mast cell-mediated inflammation relies on insulin-regulated aminopeptidase controlling cytokine export from the Golgi. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 6749, n. 23, p. 90-98, 2023. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2023.01.014>>.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 478-94, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri3690> >.

WONG, J. H.; SZE, S. C. W.; NG, T. B.; CHEUNG, R. C. F.; TAM, C.; ZHANG, K. Y.; DAN, X.; CHAN, Y. S.; CHO, W. C.; NG, C. C. W.; WAYE, M. M. Y.; LIANG, W.; ZHANG, J.; YANG, J.; YE, X.; LIN, J.; YE, X.; WANG, H.; LIU, F.; CHAN, D. W.; NGAN, H. Y. S.; SHA, O.; LI, G.; TSE, R.; TSE, T. F.; CHAN, H. Apoptosis and anti-cancer drug discovery: the power of medicinal fungi and plants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 40, p. 5613-5630, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/0929867324666170720165005>>.

YANG, J.; ZHANG, L.; YU, C.; YANG, X. F.; WANG, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n. 1, p. 1, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>>.

YEUNG, Y. T.; AZIZ, F.; GUERRERO-CASTILLA, A.; ARGUELLES, S. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 14, p. 1449-1484, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/1381612824666180327165604>>.

YEUNG, K. S.; HERNANDEZ, M.; MAO, J. J.; HAVILAND, I.; GUBILI, J. Herbal medicine for depression and anxiety: A systematic review with assessment of potential psycho-oncologic relevance. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 5, p. 865-891, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6033>>.

YIN, W.; WANG, J.; JIANG, L.; JAMES KANG, Y. Cancer and stem cells. **Experimental Biology Medicine (Maywood)**, v. 246, n. 16, p. 1791-1801, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/15353702211005390>>.

ZAID, H.; SILBERMANN, M.; AMASH, A.; GINCEL, D.; ABDEL-SATTAR, E.; SARIKAHYA, N. B. Medicinal plants and natural active compounds for cancer chemoprevention / chemotherapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2017/7952417>>.




ZHANG, T.; MA, C.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; HU, H. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **MedComm**, v. 2, n. 4, p. 618-653, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/mco2.104>>.

ZHAO, H.; WU, L.; YAN, G.; CHEN, Y.; ZHOU, M.; WU, Y.; LI, Y. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 263, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>>.

CAPÍTULO 2 - Efeitos da erva-de-passarinho *Passovia ovata* em marcadores pró-inflamatórios *in vitro* e *in vivo*

Article

Effects of *Passovia ovata* Mistletoe on Pro-Inflammatory Markers In Vitro and In Vivo

Isadora de Fátima Braga Magalhães ¹, Ana Letícia Marinho Figueirêdo ², Elizeu Mendes da Silva ², Adryan Adam Batalha de Miranda ², Cláudia Quintino da Rocha ³ , Katia da Silva Calabrese ^{4,*}, Fernando Almeida-Souza ^{1,4,*,†}  and Ana Lúcia Abreu-Silva ^{1,2,†} 

¹ Postgraduate Program in Animal Science, State University of Maranhão, Sao Luis 65055-310, Brazil; isadoradefatimamagalhaes@gmail.com (I.d.F.B.M.); abreusilva.ana@gmail.com (A.L.A.-S.)

² Veterinary Medicine Graduation School, State University of Maranhão, Sao Luis 65055-310, Brazil

³ Postgraduate Programs in Chemistry, Federal University of Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil

⁴ Laboratory of Immunomodulation and Protozoology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21041-250, Brazil

* Correspondence: calabrese@ioc.fiocruz.br (K.d.S.C.); fernandoalsouza@gmail.com (F.A.-S.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: New agents that can suppress inflammatory responses are being sought, since chronic inflammation is associated with several pathologies. This work aims to elucidate phytochemicals from the hydroethanolic extract of mistletoe *Passovia ovata* (POH) and its anti-inflammatory potential. POH is submitted to HPLC-UV, qualitative analysis of chemical constituents, and flavonoid quantification. Cytotoxicity is evaluated in RAW 264.7 macrophages by MTT. LPS-stimulated RAW 264.7 cells are treated with POH and, after 48 h, the nitrite and cytokine levels are quantified. BALB/c mice are treated by gavage with POH and stimulated with λ -carrageenan to induce paw oedema or peritonitis. POH yield is 25% with anthraquinones, tannins, anthocyanins, anthocyanidins, flavonols, catechins and flavanones present and flavonoid content of 4.44 ± 0.157 mg QE/g dry weight. POH exhibits low cytotoxicity and significantly reduced ($p < 0.01$) nitrite, IL-1 β , IL-6, and TNF- α quantification at 500 μ g/mL. POH at 500 mg/kg prevents paw edema increase and also reduces inflammatory infiltrate and mast cells in the footpad. In the peritonitis model, POH does not influence cytokines levels or cell counts. Overall, POH demonstrates a high concentration of flavonoids and prominent effects in the reduction in pro-inflammatory markers in vitro and in the inhibition of paw oedema.

Keywords: mistletoe; inflammation; macrophage; cytokine; mast cell



Citation: de Fátima Braga Magalhães, I.; Figueirêdo, A.L.M.; da Silva, E.M.; de Miranda, A.A.B.; da Rocha, C.Q.; da Silva Calabrese, K.; Almeida-Souza, F.; Abreu-Silva, A.L. Effects of *Passovia ovata* Mistletoe on Pro-Inflammatory Markers In Vitro and In Vivo. *Plants* **2023**, *12*, 1814. <https://doi.org/10.3390/plants12091814>

Academic Editors: Antonella Fais and Benedetta Era

Received: 17 February 2023

Revised: 13 March 2023

Accepted: 22 March 2023

Published: 28 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Inflammation is a response to a harmful stimulus created by an internal or external agent of microbial, autoimmune, allergic, metabolic, and/or physical origin [1]. This response can range from being local and delimited to being a systemic inflammation, with a broad and complex sequence of events [2].

The inflammatory response involves leukocyte cells such as macrophages, neutrophils, and lymphocytes. These cells release pro-inflammatory cytokines, vasoactive amines, peptides, and acute phase proteins, which orchestrate inflammation. This process also demands a balance between neutralization of an agent and control to heal and restore the damaged area [3].

Chronic inflammation can be involved in several pathologies such as cardiovascular diseases, autoimmune and neurodegenerative diseases, and cancer [4], as pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6, and TNF- α , are involved in the increase in platelet activity, interference of endothelial cells functions, activation of plasma coagulation cascade, reduction in fibrinolytic action, increase in platelet reactivity, and reduction in physiological anticoagulants [5].

Several problems have been associated with current anti-inflammatory therapy such as adverse effects and drug resistance. Therefore, new ways of controlling the inflammatory process are sought. In this context, medicinal plants emerge as a therapeutic alternative, and although popular use may suggest potentially important species, research is essential to prove their pharmacological effect [6].

Loranthaceae and Santalaceae form two of the largest families of mistletoes [7], a group of hemiparasitic plants that through roots named haustorium obtain water and minerals from the host plant [8]. The genus *Passovia* represents neotropical mistletoes from the Loranthaceae family [9], a group that has been recognized for many years for its therapeutic properties [10]. *Passovia ovata* is a species with ovate leaves, apex usually acute or attenuated, and little-branched terminals [9]. It can be considered a generalist species, as it tends to have a wider geographic distribution. This species is a facultative aluminum accumulator plant; therefore, regardless of whether the host plant accumulates aluminum or not, *P. ovata* will not show symptoms of deficiency or toxicity [11].

To our knowledge, no previous study has been reported on the anti-inflammatory activity of *P. ovata*. Therefore, we investigated the phytochemical and immunomodulatory properties of the hydroethanolic extract from leaves of *P. ovata* using cultured RAW 264.7 cells and murine in vivo models.

2. Results

2.1. Yield and Physicochemical Properties

The extraction yield of POH was 25%. POH was submitted for analysis by high-performance liquid chromatography photodiode array detection method (HPLC-UV) (Figure 1).

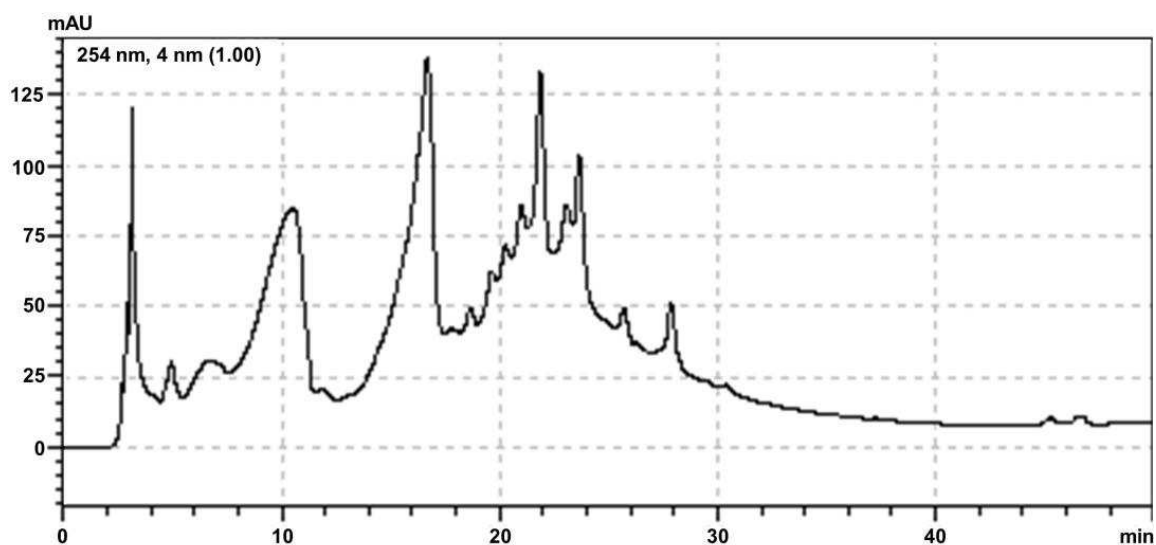


Figure 1. HPLC-UV chromatogram of hydroethanolic extract from *Passovia ovata* leaves at 254 nm.

HPLC-UV chromatogram revealed a significant presence in the content of major constituents phenolics with absorbance in 254 nm and the phytochemical screening results of POH (Table 1) reveal the presence of anthraquinones, tannins, anthocyanins, anthocyanidins, flavonols, catechins, and flavanones. The total flavonoid content in POH was 4.44 ± 0.157 mg QE/g dry weight.

Table 1. Classes of secondary metabolites and the respective chemical reagents used for their identification in *Passovia ovata* hydroethanolic extract. (–) absence; (+) poor; (++) moderate; (+++) abundant.

Classes of Secondary Metabolites	Chemical Reagents	Result
Anthraquinones	NaOH	+++
Saponins	Foam index	–
Tannins	Gelatin	+++
Coumarins	KOH	–
Anthocyanins and anthocyanidins	NaOH	–
Flavone, flavanols and xanthenes	NaOH	–
Chalcones and Aurones	NaOH	–
Leukoanthocyanidins	HCl	–
Catechins	HCl	+++
Flavanols and flavanones	NaOH	+++

Abbreviations: sodium hydroxide (NaOH); potassium hydroxide (KOH); hydrochloric acid (HCl).

2.2. Effects of the Hydroethanolic Extract of *P. ovata* on Macrophages RAW 264.7

The effect of POH on the viability of RAW 264.7 macrophages (Figure 2).

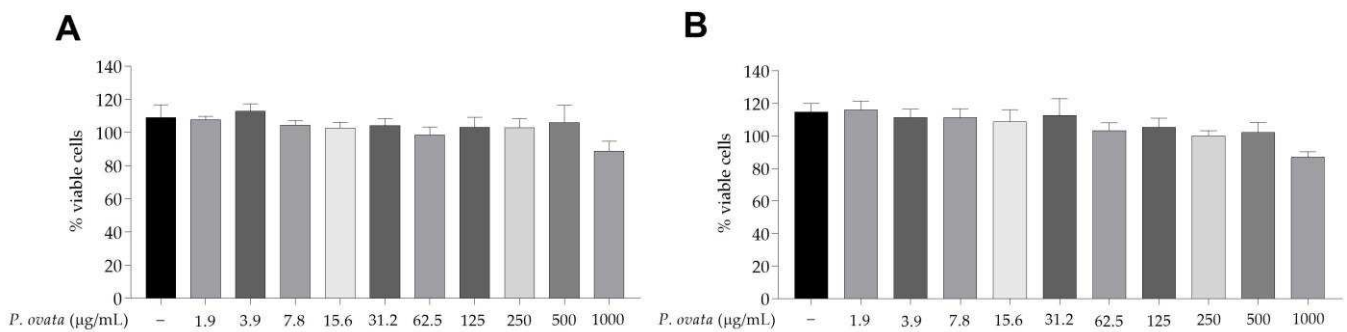


Figure 2. *Passovia ovata* hydroethanolic extract in vitro toxicity in RAW 264.7 macrophages. Cell viability percentages obtained by the MTT assay after 24 h (A) and 48 h (B) from treatment with concentrations from 1000 to 1.9 µg/mL of the extract. Control group received only RPMI 1640 medium. Data represent the mean ± standard for three different experiments performed in triplicate. Abbreviation: microgram per milliliter (µg/mL).

After testing by MTT, POH demonstrated low cytotoxicity as it did not reduce cell viability in macrophages RAW 264.7 submitted to the same treatment (125, 250, and 500 µg/mL) used in the other in vitro assays. Cytotoxicity also did not increase with increasing treatment time. In LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, POH concentration of 500 µg/mL significantly ($p < 0.01$) reduced nitrite (Figure 3A), IL-1 β (Figure 3B), IL-6 (Figure 3C), and TNF- α (Figure 3D). The same was observed in cells treated with dexamethasone at 5 µg/mL. The quantification of nitrite and cytokines in the group stimulated with LPS was significantly ($p < 0.05$) higher when compared to the control group (unstimulated and untreated).

2.3. In Vivo Anti-Inflammatory Effect of POH

2.3.1. Paw Edema

Edema thickness was used to evaluate the effect of POH treatment. Edema thickness was lower than the PBS group after two, three, and four hours of treatment with dexamethasone, and after two and four hours of treatment with POH at 250 mg/kg and 500 mg/kg doses (Figure 4). Table 2 also shows the effect of POH or standard drug dexamethasone in the reduction in paw edema in stimulated BALB/c mice after one, two, three, and four hours of treatment. The subcutaneous administration of λ -carrageenan caused an increase in footpad thickness and some treatments significantly prevented the edema: POH

administered at a dose of 500 mg/kg ($p < 0.01$ and $p < 0.05$) or 250 mg/kg ($p < 0.05$) and dexamethasone at 5 mg/kg dose ($p < 0.0001$).

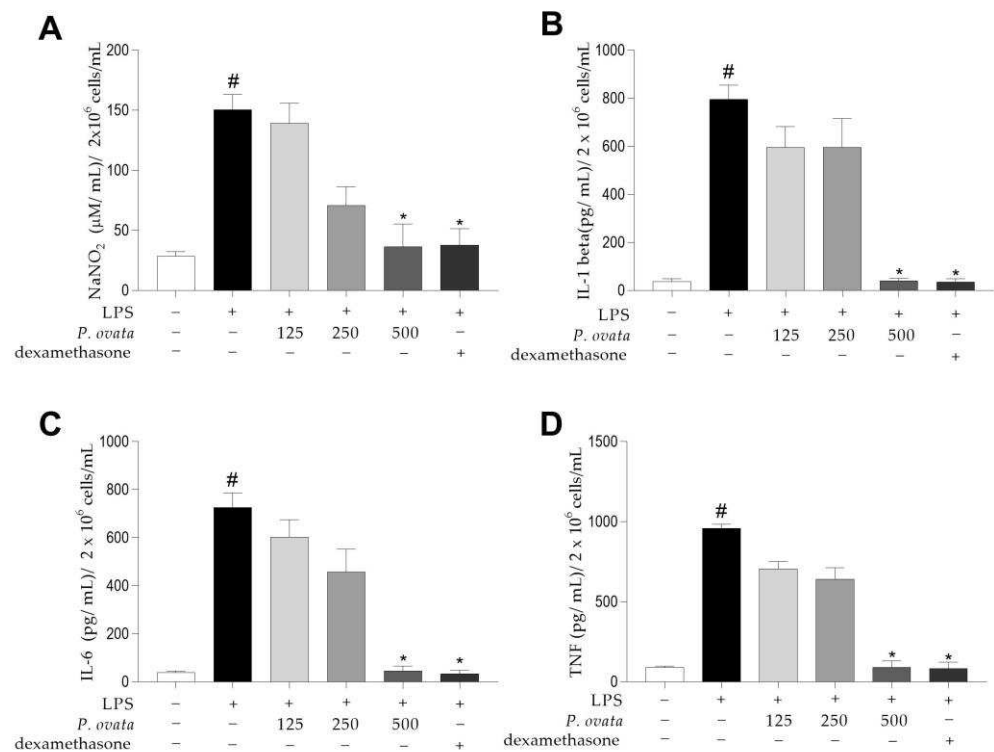


Figure 3. Quantification of nitrite and cytokines in culture supernatant of RAW 264.7 cells treated with 125, 250, and 500 mg/kg concentrations of hydroethanolic extract of *Passovia ovata* leaves or dexamethasone (5 µg/mL) and stimulated by LPS (10 µg/mL) for 48 h. (A) Nitrite, (B) IL-1 β, (C) IL-6, and (D) TNF-α levels. Results are expressed as the mean ± SD of three different experiments performed in triplicate. # $p < 0.01$ comparing the untreated and unstimulated group; * $p < 0.05$, when compared with the group stimulated with LPS, after Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison analysis. Abbreviations: lipopolysaccharide (LPS); sodium nitrite (NaNO₂); interleukin-6 (IL-6); interleukin-1 beta (IL-1β); tumor necrosis factor alpha (TNF-α); micromole per milliliter (µM/mL); cells/mL (number of cells per milliliter); pg/mL (picograms per milliliter).

Table 2. Thickness in millimeters and percentage inhibition of paw edema induced by 1% λ-carrageenan in BALB/c mice treated with hydroethanolic extract of *Passovia ovata* or dexamethasone.

Group	λ-Carrageenan	Dose (mg/kg)	Administration Time (% Inhibition of Edema)			
			1 h	2 h	3 h	4 h
Normal	PBS	PBS	0.014 ± 0.03	0.014 ± 0.03	0.014 ± 0.03	0.014 ± 0.03
Control	+	PBS	0.28 ± 0.045	0.46 ± 0.054	0.54 ± 0.089	0.64 ± 0.089
		125	0.32 ± 0.109	0.44 ± 0.054	0.58 ± 0.109	0.58 ± 0.083
		250	0.22 ± 0.044	0.3 ± 0.1 (34.78) *	0.44 ± 0.054	0.48 ± 0.044 (25.0) *
POH	+	500	0.24 ± 0.089	0.28 ± 0.13 (39.13) **	0.52 ± 0.083	0.5 ± 0.122 (21.87) *
		Dexa	+	5	0.18 ± 0.044	0.02 ± 0.0 (56.52) ****

Data represent mean ± standard deviation of three different experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$, after analysis of variance (two-way ANOVA) and Bonferroni’s multiple comparisons test when compared with the control group induced with λ-carrageenan and treated with PBS. Abbreviations: *P. ovata* hydroethanolic extract (POH); dexamethasone (dexa); phosphate-buffered saline (PBS); +: inoculation of lambda carrageenan (λ-carrageenan); milligrams per kilogram (mg/kg).

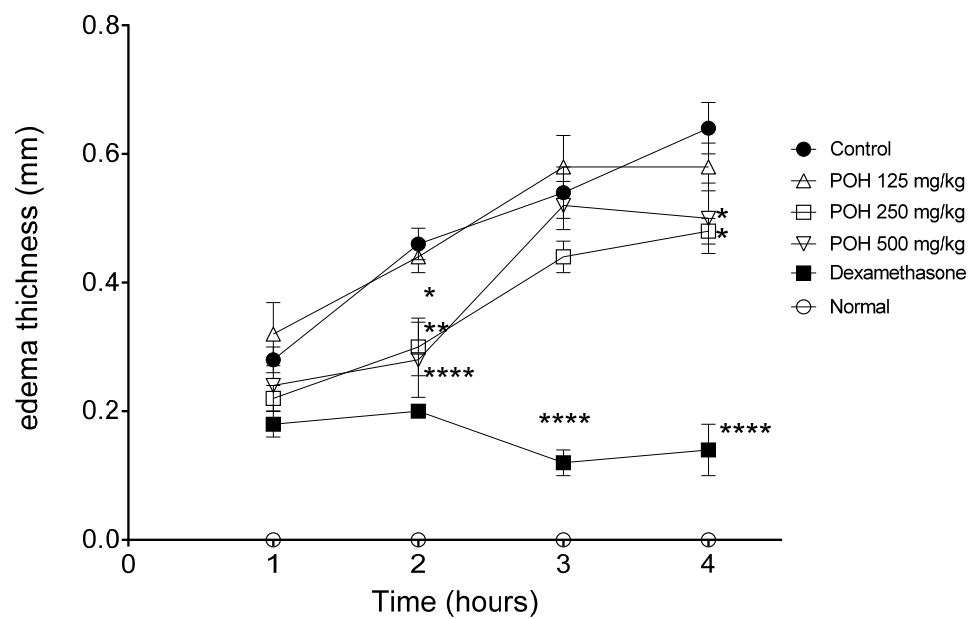


Figure 4. Kinetic of edema thickness in millimeters of paw edema induced by 1% λ -carrageenan in BALB/c mice treated with hydroethanolic extract of *Passovia ovata* at 125, 250, or 500 mg/kg or dexamethasone at 5 mg/kg. Normal group is representative of untreated and unstimulated group and control is representative of the group induced with λ -carrageenan and treated with PBS. Data represent mean \pm standard deviation of experiment of three different experiments performed in quintuplicate * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$, after analysis of variance (two-way ANOVA) and Bonferroni's multiple comparisons test when compared with the control group induced with λ -carrageenan and treated with PBS. Abbreviations: *P. ovata* hydroethanolic extract (POH); dexamethasone (dexa), PBS (phosphate-buffered saline).

Footpad histological images of tissue fragments stained with hematoxylin and eosin demonstrated a greater tissue preservation in the non-stimulated group (Figure 5A) and in groups treated with 500 mg/kg of POH (Figure 5E) and dexamethasone (Figure 5F) than in the untreated and non-stimulated group. A higher inflammatory infiltrate was observed in the stimulated and PBS-treated group (Figure 5B) and in the group treated with the lowest dose (125 mg/kg) of POH (Figure 5C).

After histological microscopic analysis of footpad tissue, it was observed that inflammatory infiltrate was present in all groups of animals used in the experiment, being discreet (+) in unstimulated and untreated group, intense (+++) in group stimulated and treated with PBS, and intense (+++), moderate (++) and discrete (+) in groups treated with 125, 250, and 500 mg/kg of POH and 5 mg/kg of dexamethasone, respectively (Table 3).

Table 3. Qualitative classification of inflammatory infiltrate after histological analysis from sections of paw edema induced by 1% λ -carrageenan in BALB/c mice, after 4 h from treatment with hydroethanolic extract of *Passovia ovata* or dexamethasone.

Group	λ -Carrageenan	Dose (mg/kg)	Classification of Inflammatory Infiltrate
Normal	PBS	PBS	Discreet
Control	+	PBS	Intense
POH	+	125	Intense
	+	250	Intense
	+	500	Moderate
Dexa	+	5	Discreet

Abbreviations: *P. ovata* hydroethanolic extract (POH); dexamethasone (dexa); phosphate-buffered saline (PBS); lambda carrageenan (λ -carrageenan); milligrams per kilogram (mg/kg).

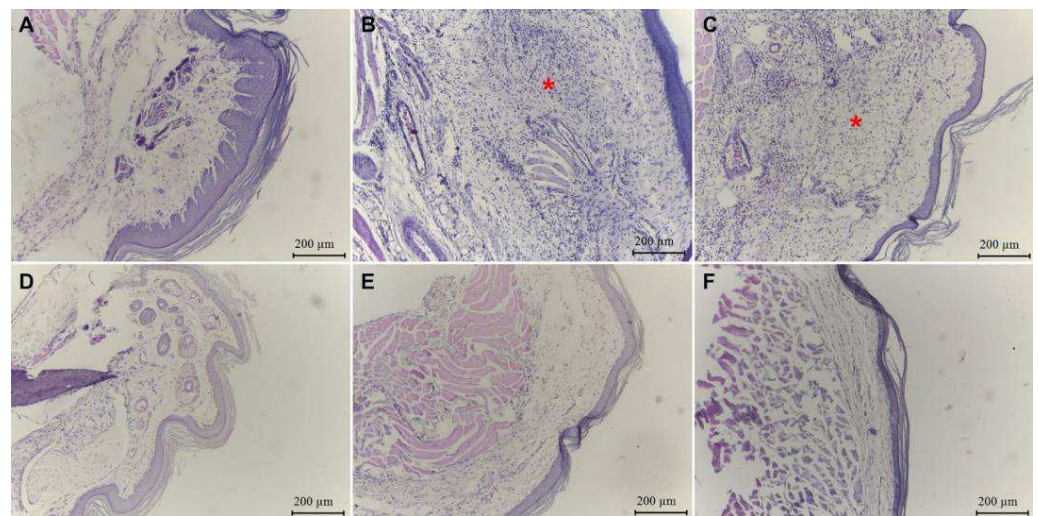


Figure 5. Histological analysis by staining with hematoxylin and eosin of paw edema from BALB/c mice inoculated with λ -carrageenan and treated with *Passovia ovata* hydroethanolic extract (POH). (A) Unstimulated and untreated group; (B) group inoculated with λ -carrageenan and treated with PBS solution; (C) group treated with 125 mg/kg of POH and inoculated with λ -carrageenan; (D) group treated with 250 mg/kg of POH and inoculated with λ -carrageenan; (E) group treated with 500 mg/kg of POH and inoculated with λ -carrageenan; (F) treated with dexamethasone (5 mg/kg) and inoculated with λ -carrageenan. Images are representative of three independent experiments carried out in quintuplicate. Red asterisk: inflammatory infiltrate.

In mast cells from histological footpad slides stained with toluidine blue (Figure 6), the stimulated and PBS-treated group showed a significant increase ($p < 0.001$) in the number of mast cells when compared to the non-stimulated and untreated group. The groups treated with 500 mg/kg of POH, or dexamethasone (5 mg/kg) had a significant reduction, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively, in mast cells, when compared to the stimulated and PBS-treated control (Figure 6G).

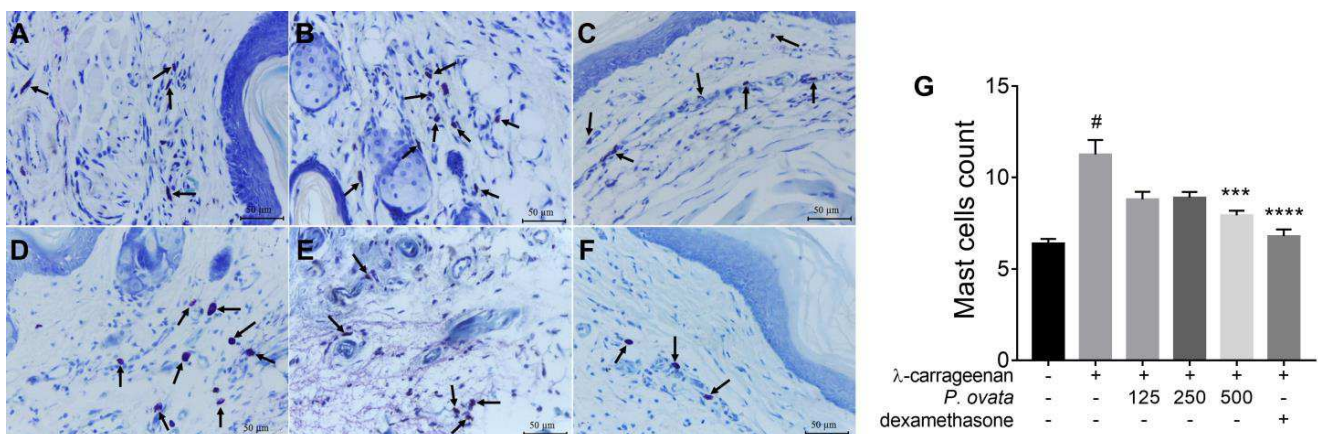


Figure 6. Paw edema of BALB/c mice inoculated with λ -carrageenan and treated with *Passovia ovata* hydroethanolic extract (POH). Histological analysis by staining with toluidine blue in group (A) unstimulated and untreated group; (B) inoculated with λ -carrageenan and treated with PBS solution; (C) treated with 125 mg/kg of POH and inoculated with λ -carrageenan; (D) treated with 250 mg/kg of POH and inoculated with λ -carrageenan; (E) treated with 500 mg/kg of POH and inoculated with λ -carrageenan; (F) treated with dexamethasone (5 mg/kg) and inoculated with λ -carrageenan. (G) Quantification of mast cells in these groups. Arrows shows mast cells. Data are

expressed as mean \pm standard deviation and images are representative of three independent experiments carried out in quintuplicate. # $p < 0.001$ compared with control group; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared with PBS group, after analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Kruskal–Wallis followed by Dunn’s multiple. Abbreviations: lambda carrageenan (λ -carrageenan). The sign + or – represents group submitted or not to λ -carrageenan inoculation.

2.3.2. λ -Carrageenan-Induced Peritonitis

As shown in Figure 7A, the induction of peritonitis by carrageenan stimulated a significant ($p < 0.01$) increase in cell migration to the peritoneal cavity when compared to the untreated group (0.957×10^7 cells/mL vs. 3.504×10^6 cells/mL). The only group that showed a significant reduction in cell count (Figure 7A, $p < 0.01$), IL-1 β (Figure 7B, $p < 0.05$), and IL-6 (Figure 7C, $p < 0.01$) quantification in serum was the one treated with dexamethasone (5 mg/kg) (0.594×10^7 cells/mL). The hematological evaluation consisted of red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), leukocyte counts (WBC), and platelet counts (PLT). No statistical alterations were observed between the groups, as seen in Table 4.

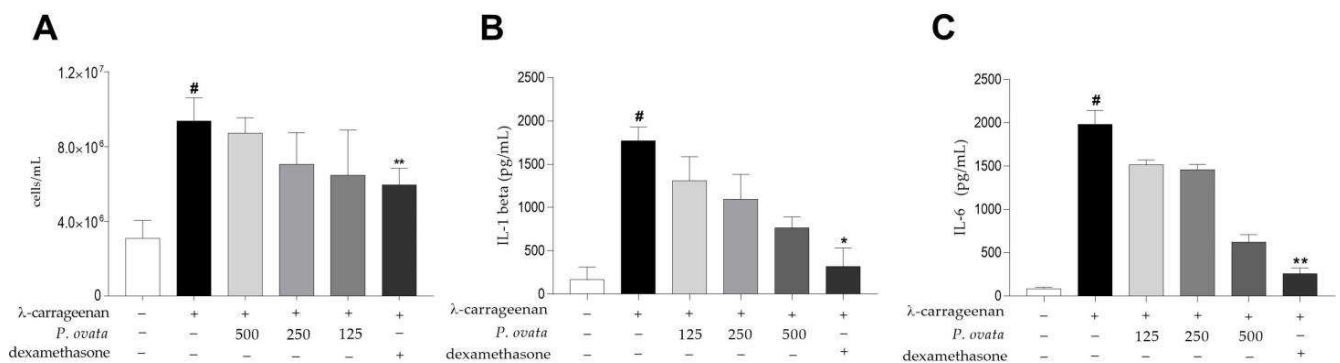


Figure 7. Peritonitis induced by λ -carrageenan in BALB/c mice treated with hydroethanolic extract of *Passovia ovata*. Total count of cells in intraperitoneal lavage as cells/mL (A), and cytokine IL-1 β (B) and IL-6 (C) quantification in sera as pg/mL of BALB/c mice after four hours of peritonitis induced by λ -carrageenan 1% orally treated with 500, 250, and 125 mg/kg of *P. ovata* hydroalcoholic extract or dexamethasone at 5 mg/kg. The data are expressed as mean \pm standard deviation and are representative of three experiments performed in quintuplicate. # $p < 0.001$ compared with unstimulated group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the group stimulated with λ -carrageenan only after Kruskal–Wallis analysis followed by Dunn’s multiple comparisons test. Abbreviations: number of cells per milliliter (cells/mL); picograms per milliliter (pg/mL); interleukin-1 beta (IL-1 β); interleukin-6 (IL-6); lambda carrageenan (λ -carrageenan).

Table 4. Hematological parameters of BALB/c mice after 4 h of peritonitis induced by λ -carrageenan 1% administered by gavage with 500 or 250 or 125 mg/kg of *Passovia ovata* hydroalcoholic extract or dexamethasone at 5 mg/kg.

Group	λ -Carrageenan	Dose (mg/kg)	RBC (Million/mm ³)	HGB (g/dL)	Hct (%)	MCV (fm ³)	MHC (pg)	MCHC (g/dL)	WBC (mil/mm ³)	Platelet Count (mil/mm ³)
Normal	PBS	PBS	9.27 \pm 0.17	16.1 \pm 0.31	37.46 \pm 0.5	40.4 \pm 1.15	17.26 \pm 0.15	42.83 \pm 1.15	9.91 \pm 1.45	259 \pm 14.1
Control	+	PBS	9.78 \pm 0.13	17.6 \pm 0.21	40.25 \pm 1.02	41.17 \pm 1.17	18.0 \pm 0.33	43.77 \pm 0.57	7.68 \pm 0.97	122.25 \pm 6.8
POH	+	125	9.49 \pm 0.19	16.4 \pm 0.52	37.86 \pm 0.51	39.9 \pm 0.3	17.26 \pm 0.2	43.36 \pm 0.77	10.76 \pm 4.04	155.66 \pm 7.6
	+	250	9.69 \pm 0.19	16.92 \pm 0.71	38.66 \pm 1.29	39.86 \pm 0.55	17.44 \pm 0.4	43.74 \pm 0.43	10.06 \pm 1.78	158.2 \pm 6.1
	+	500	9.42 \pm 0.37	16.20 \pm 0.86	37.74 \pm 1.75	40.06 \pm 0.57	17.18 \pm 0.34	42.9 \pm 0.72	10.39 \pm 2.69	141 \pm 25.8
Dexa	+	5	9.64 \pm 0.31	17.03 \pm 0.89	39.03 \pm 1.5	40.46 \pm 0.25	17.63 \pm 0.37	43.56 \pm 0.77	11.32 \pm 4.51	158.3 \pm 36.01

Data represent mean \pm standard deviation of experiment performed at least in triplicate. Abbreviations: *P. ovata* hydroalcoholic extract (POH); dexamethasone (dexa); red blood cell count (RBC); hemoglobin (HGB); hematocrit (Hct); mean corpuscular volume (MCV); mean corpuscular hemoglobin (MCH); mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); white blood cell count (WBC). The sign + represents group submitted to λ -carrageenan inoculation.

3. Discussion

P. ovata is a neotropical mistletoe that has not been explored for its pharmacological potential, but studies reporting the promising effects of other mistletoes led us to explore its chemical compounds and immunomodulatory effect.

To better evaluate the composition, POH analysis was performed through HPLC, a widely used tool to evaluate plant origin extracts sensitively and accurately as a prerequisite for its standardization [12].

The compounds found in the hydroethanolic extract (anthraquinones, tannins, flavonols, and catechins) have proven antitumor, laxative, antimicrobial [13–15], antiviral, antioxidant, and anti-inflammatory action [16,17], which may be directly related to the therapeutic potential of *P. ovata*.

The total flavonoids content in POH was higher than the ones found in other mistletoes in similar assays such as the alcoholic extract from leaves of *Phthirusa* sp, (10.51 ± 1.81 mg QE/g) [18] and methanolic extract from *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq. (4.25 ± 21.21 mg EQ/g) [19]. Flavonoids are produced in plants to help fight oxidative stress and act as growth regulators. Many flavonoids isolated from plant extracts have shown anti-inflammatory effect, being, therefore, an important parameter for the elaboration of new drugs against inflammatory disorders [20].

In the *in vitro* assay, POH showed low cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages after 24 and 48 h treatment, encouraging their possible future application. To evaluate the potential anti-inflammatory effect of POH, macrophages were stimulated with LPS, and cytokines and nitrite were quantified.

Macrophages form a heterogeneous cell population that can be considered classically activated by LPS and/or Th1 cytokines, which generates a pro-inflammatory profile named M1. Macrophages M1 trigger a high production of cytokines such as TNF- α , IL-12, IL-6, and IL-1 β and higher amounts of nitric oxide (NO). Alternative activation is stimulated by Th2 cytokines such as IL-13 and IL-4 and defines a population with immunoregulatory and anti-inflammatory functions marked by the production of cytokines such as TGF- β and IL-10. While the M1 profile encourages the elimination of the stimulus, the M2 profile seeks to limit inflammation and promote tissue recovery and remodeling [21].

In the evaluation of potentially therapeutic compounds in macrophages, the measurement of nitrite is an important parameter as it represents an indirect way of measuring NO, a gas with signaling, regulatory, and microbicidal functions. It is produced by macrophages under circumstances that stimulate inflammation and induce them to a M1 profile [22]. After 48 h treatment with POH at 500 μ g/mL, there was observed a nitrite quantification reduction in LPS-stimulated macrophages. Previous studies indicated that hydroethanolic extract from *S. vulgaris* mistletoe at 80 and 160 μ g/mL concentrations significantly reduced the production of NO in the J774 macrophages strain [23], and the methanolic fraction from leaves of *Phragmanthera capitata* at 25 μ g/mL concentration also reduced nitrite levels [24].

Macrophages are among the main sources of cytokines when exposed to factors that stimulate the immune response [25]. LPS is an endotoxin that induces macrophage activation, formation of self-amplifying loops, and cytokine production [26] through Toll-like receptors (TLR) [27].

In the evaluation of plant-derived compounds, IL1- β , IL-6, and TNF- α are among the main mediators used as parameters for evaluating possibly anti-inflammatory cellular responses [28]. Here, the same concentration of POH (500 μ g/mL) that inhibited NO production also reduced the quantification of IL-1 β , IL-6, and TNF- α . These cytokines are considered pro-inflammatory and are liberated when a stimulus, such as LPS from Gram-negative bacteria, activates TLR4 [29]. Macrophages isolated from BALB/c mice when treated with *Viscum album coloratum*, known as Korean mistletoe, also showed reduction on the quantification of these cytokines [30].

In the paw edema test, parameters related to the reduction in edema induced by the phlogogen agent and through the histological analysis of the inflammatory infiltrate and mast cell count of footpad tissue were evaluated. Mast cells are modulator cells of

the immune system that act in acute inflammatory responses, such as those that occur in allergic reactions and in the elimination of pathogens [31]. They are among the first cells to act against antigens and initiate local inflammation mechanisms [32]. The model of inflammation induced by carrageenan involves an early phase in which mast cells release histamine and a later phase in which there is neutrophil migration and increased production and release of cytokines and prostaglandin [33].

In our work, the concentration of 500 mg/kg of POH induced the bigger reduction in paw edema, as well as a reduction in mast cells, events that may be related with the activation and release of granules and with mediators such as histamine that increase the permeability of the vessels and consequently cause the release of liquid into the extracellular environment, promoting local edema [34]. In a trial with another mistletoe, also of the Loranthaceae family, *S. vulgaris*, the ethanol leaf extract reduced edema at 50 and 100 mg/kg doses [23].

Despite the results in the paw edema test, in the peritonitis model in BALB/c mice, treatment with POH did not demonstrate a reduction in the cell count of the intraperitoneal lavage and in cytokines IL-6 and IL-1 β , although a visible trend in the reduction in cytokines is perceptible as the treatment dose increases. In these assays, only the standard drug dexamethasone showed a reduction effect in cell count and in cytokines IL-6 and IL-1 β quantification.

The inflammatory process is highly complex and involves several cell types and at least 15 types of cytokines, adrenocorticotrophic hormones, and acute phase proteins, which manifest as features of redness, edema, heat, and pain [35]. Therefore, our work is a preliminary trial on the effect of this mistletoe on pro-inflammatory markers, but further elucidation of the effects of derived compounds from *P. ovata* on the immune system will be better determined in future trials.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material and Hydroethanolic Extract Preparation

The leaves and stems of *P. ovata* (Pohle x DC.) Tiegh. were collected in July 2019 at the Farm School of the State University of Maranhão–UEMA, located in the city of São Luís, Brazil, where the plant was parasitizing a mango tree (*Mangifera indica*). A voucher specimen was deposited with the number 5516 and identified by the Herbarium Rosa Mochel, UEMA. The genetic heritage material access was granted by the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado–SisGen) with reference record AFC60DB. *P. ovata* hydroethanolic extract (POH) was obtained by maceration (20% *w/v*) during a period of 12 days, with solvent (ethanol 70%, Êxodo Científica, Hortolândia, Brazil) changes every three days. The final extract was concentrated in a rotary evaporator (Fisatom 802, São Paulo, Brazil) and lyophilized at -70 °C (Terroni Enterprise, São Carlos, Brazil). The yield of the POH was calculated according to the following formula [36]:

$$\text{Total yield (\%)} = \frac{\text{mass of the extract in grams}}{\text{mass of the dried plant material in grams}} \times 100$$

4.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV)

POH was analyzed using the high-performance liquid chromatography photodiode array detection method (HPLC-UV) using a 254 nm wavelength (Shimadzu, Kyoto, Japan). Thus, 10 mg of POH were added to 800 μ L of methanol (Êxodo Científica, Hortolândia, BRA) HPLC and 200 μ L of distilled water for homogenization in a sonicator (Unique, São Paulo, Brazil). The gradient exploratory consisted of 5–100% methanol (Êxodo Científica, Hortolândia, Brazil) in 40 min and 100–100% from 40 to 50 min on photo-diode-array detection (PDA) (Shimadzu, Kyoto, Japan). Then, 20 μ L of POH was injected into the HPCL, and the peaks were shown on a chromatogram.

4.3. Phytochemical Screening by Qualitative Analysis

To identify the main classes of secondary metabolites, a qualitative phytochemical analysis was performed. The tests were based on color change, precipitate formation, or foam after the addition of reagents, and resulted in the analysis of the presence of anthraquinones, saponins, tannins, anthocyanidins, chalcones, leucoanthocyanidin, catechins, flavanones, flavones, flavanols, xanthenes, auronos, flavonols, and coumarins [37,38].

4.3.1. Anthraquinones

In a 96-well plate (Jet Biofil, Guangzhou, China), 150 μ L of POH at 20 mg/mL in methanol (Êxodo Científica, Hortolândia, Brazil) was added to 50 μ L of 0.5 M sodium hydroxide (NaOH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The appearance of a red color indicates the presence of anthraquinones.

4.3.2. Saponins

POH at 20 mg/mL in methanol (Êxodo Científica, Hortolândia, Brazil) was added to 2 mL of distilled water in a test tube. The tube was then shaken vigorously for 30 s and allowed to stand for 10 min. The presence of foam with a height greater than 1 cm indicates the presence of saponins.

4.3.3. Tannins

POH (20 mg/mL) was placed in a test tube and 2.5% gelatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added dropwise. The formation of a white precipitate indicates the presence of tannins.

4.3.4. Coumarins

The determination of coumarin was performed with the addition of approximately 1.5 cm in diameter of POH on a piece of filter paper (Merck, Rio de Janeiro, Brazil). After drying, a drop of aqueous potassium hydroxide (KOH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution was added to each point and the filter paper was placed under ultraviolet (UV) light using a Spectroline UV (Spectronic Corporation, Westburg, NY, USA) for three minutes. The observation of a strong and clearly visible bluish fluorescence in the sample is indicative of a coumarin presence.

4.3.5. Anthocyanins, Anthocyanidins, Flavone, Flavanols, Xanthenes, Chalcones, Auronos, Leucoanthocyanidins, Catechins, Flavonols, and Flavanones

POH (20 mg/mL) was added to test tubes. In tube 1, 0.5 M hydrochloric acid (HCl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added until reaching a pH of 3.0. In the second and third tubes, 0.5 M NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added until reaching pH of 8.0 and 11.0, respectively. The appearance of specific colors indicates the presence of these compounds. The red, lilac, and blue-purple colors in tubes 1, 2, and 3, respectively, indicate the presence of anthocyanins and anthocyanidins. The yellow color in tube 3 indicates the presence of flavone, flavanols, and xanthenes. The red and red-purple colors in tubes 1 and 3, respectively, indicate the presence of chalcones and auronos. The presence of the red color in tube 1 indicates the presence of leucoanthocyanidins. The presence of a yellowish-brown color indicates the presence of catechins. In addition, the presence of the red-orange color in tube 3 indicates the presence of flavonols and flavanones.

4.4. Flavonoid Quantification

The quantification of the flavonoid content was performed in a 96-well microplate (Jet Biofil, Guangzhou, China). In each well, 200 μ L of POH (1 mg/mL) and 100 μ L of 2% aluminum chloride (AlCl_3) (Êxodo Científica, Hortolândia, Brazil) in methanol (Êxodo Científica, Hortolândia, Brazil) were added. After incubation in the dark for 30 min, the reading was performed in a spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridgeshire, UK) at 420 nm, and the obtained absorbances were interpolated from the quercetin (Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, USA) calibration curve. All tested solutions were made in triplicate and the experiment was repeated twice. Blank samples were made with 300 μ L of POH. Results were expressed in QE (quercetin equivalents) in mg per g of plant sample [39].

4.5. RAW 264.7 Macrophages Cell Culture

The cells were kept in culture flasks at 37 °C and 5% CO₂. The medium used was Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), L-glutamine (20 mM) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), and antibiotic solution containing penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were monitored daily under an inverted microscope, and at 80–90% confluence, the passages were performed.

4.6. Cytotoxicity of the Hydroethanolic Extract of *P. ovata* on RAW 264.7 Macrophages

The evaluation of cytotoxicity was performed according to the adaptation of the viability assay using 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) [40]. Cells were added at 2×10^6 /mL in 100 μ L of RPMI 1640 medium (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), supplemented with 10% FBS and incubated overnight at 37 °C with 5% CO₂. After this period, the medium was removed, and cells were treated with concentrations of 1000 to 1.9 μ g/mL of POH diluted in RPMI medium (Gibco, Gaithersburg, MD, USA). Two and a half hours before completing each treatment time (24 or 48 h), 10 μ L of 5 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added with further incubation until completion of treatment. Subsequently, the cell medium was aspirated, and 100 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO at 99.5%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added. The negative control consisted of medium-only wells, and the positive control consisted of cells and 1% DMSO. The absorbance values were acquired in a spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) with a wavelength of 570 nm, and a dose response curve was made to determinate the concentration that inhibits 50% of the cells (IC₅₀).

4.7. Anti-Inflammatory Effect of the Hydroethanolic Extract of *P. ovata* in Lipopolysaccharide-Induced RAW 264.7 Macrophages

RAW 264.7 cells were plated on 24-well plates (Jet Biofil, Guangzhou, China) at a density of 2×10^6 cells/mL per well overnight. After that, they were treated with POH, and after 1 h, stimulated groups were treated with lipopolysaccharide (LPS) (10 μ g/mL) from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). This assay consisted of six different groups: (1) negative control: non-LPS induced cells; (2) positive control: non-treated and LPS-stimulated cells; (3) drug reference group: treated with dexamethasone (5 μ g/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and LPS stimulated; (4) group treated with 500 μ g/mL of POH and LPS stimulated; (5) group treated with 250 μ g/mL of POH and LPS stimulated; and (6) group treated with 125 μ g/mL of POH and LPS stimulated. After the total incubation period of 48 h, the supernatant was collected for nitrite and IL-1 β , IL-6, and TNF- α cytokines quantification.

4.8. In Vivo Anti-Inflammatory Activity of Hydroethanolic Extract of *P. ovata*

4.8.1. Animals

Four-week-old male BALB/c mice weighing 20–22 g were obtained from the Institute of Science and Technology in Biomodels, Fiocruz, Rio de Janeiro-Brazil. The animals were kept in individually ventilated cages (IVC), five animals in each cage, and maintained in pathogen-free, temperature-controlled conditions, with a light cycle of 12 h light/dark cycle, at 25 ± 2 °C, and with relative humidity in a range of 55–65%. The animals were fed with a standard diet and water ad libitum. The experiments were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (CEUA-IOC)–Rio de Janeiro (CEUA L-53/2016-A3) and conducted in accordance with the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

4.8.2. Paw Edema Model

The evaluation of anti-inflammatory activity was performed on a model of paw edema induced by λ -carrageenan [33,41]. Mice were separated into six groups with five animals each: (1) negative control group: animals treated with PBS by gavage without stimulation; (2) positive control group: animals treated with PBS by gavage and stimulated with λ -carrageenan; (3) standard drug group: animals treated with dexamethasone (5 mg/kg) intramuscular and stimulated with λ -carrageenan; (4) animals treated with 500 mg/kg of POH by gavage and stimulated with λ -carrageenan; (5) animals treated with 250 mg/kg of POH by gavage and stimulated with λ -carrageenan; and (6) animals treated with 125 mg/kg of POH by gavage and stimulated with λ -carrageenan. One hour after treatment, the edema was induced with 25 μ L of 1% λ -carrageenan in phosphate-buffered saline (PBS) inoculated via sub-plantar tissue of the right hind paw, except for group 1, which received only 25 μ L of PBS in the right hind paw. After 1, 2, 3, and 4 h from stimulation, pad swelling at both paws was measured using a Schnelltaster dial gauge caliper (Kröplin GmbH, Hessen, Germany). The animals were euthanized with ketamine (100 mg/kg, Syntec, Barueri, Brazil) and xylazine (20 mg/kg, Syntec, Barueri, Brazil) in a 1:1 ratio intraperitoneally. The difference of thickness between the inoculated pad and the non-inoculated pad was determined and the inhibition of edema in percentage was calculated.

Paw edema tissue fragments were collected for histological analysis of the inflammatory tissue. Tissue fragments were fixed for 48 h in 10% formaldehyde (Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, Brazil) solution. Then they were dehydrated, embedded in pure paraffin (Solven[®], Hortolandia, Brazil), and sectioned at 5 μ m in microtome (LUPE MRP03, LupeTec, São Carlos, Brazil). Tissues were submitted to Hematoxylin (Alphatec, Rio de Janeiro, Brazil) and Eosin (Isofar, Rio de Janeiro, Brazil) staining for analysis of the inflammatory infiltrate under light microscopy (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) at 40 \times magnification. Representative areas were selected in five fields and a qualitative scale was used to classify the infiltrate: (+): discreet; (++) moderate; and (+++): intense. For the quantification of mast cells in the inflammatory infiltrate, toluidine blue (Alphatec, Rio de Janeiro, Brazil) staining was used. Representative areas were selected in five fields for counting under a light microscope with an approximate 40 \times magnification (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Purple-stained cells (interpreted as mast cells) were counted.

4.8.3. λ -Carrageenan-Induced Peritonitis

The inflammatory peritonitis model was also performed [42]. Stimulated groups were inoculated with 250 μ L of 1% λ -carrageenan intraperitoneally, or 250 μ L of PBS (negative control), 1 h after treatment. The experiment consisted of six groups with five animals each, divided the same way as the paw edema model. Four hours after λ -carrageenan stimulation, mice were euthanized with a 1:1 mixture of ketamine (100 mg/kg, Syntec, São Paulo, Brazil) and xylazine (20 mg/kg, Syntec, São Paulo, Brazil) administered intramuscularly. Blood was collected through intracardiac puncture for ELISA cytokines IL-1 β and IL-6 measurement from the serum. Intraperitoneal lavage with PBS was also performed for further total leukocyte count in the Neubauer chamber.

4.9. Nitrite and Cytokines Quantification

Nitric oxide (NO) evaluation was indirectly determined by nitrite concentration by the Griess colorimetric method [43]. Thus, 50 μ L of supernatant from each well was added to 50 μ L of Griess reagent (1:1 mixture of a 1% solution of sulfanilamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 2.5% orthophosphoric acid (H₃PO₄) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.1% solution of N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a 96-well microplate (Jet Biofil, Guangzhou, China). After 10 min, the optical density (absorbance) was spectrophotometrically (Biochrom, Cambridge, UK) evaluated by ELISA reader with length waveform of 570 nm. Results were expressed in μ M of sodium nitrate (NaNO₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), based on a standard

reference curve. Cytokines IL-1 β (Cat. No. 3259705), TNF- α (Cat. No. 9008894), and IL-6 (Cat. No. 7333548) were quantified by a BD OptEIA™ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

4.10. Statistical Analysis

Results were represented as mean \pm standard deviation and analyzed by a Kruskal–Wallis test with Dunn's post-test or by two-way ANOVA with Bonferroni comparisons in the Graph Pad 9.0 software package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Significant differences were considered as $p < 0.05$.

5. Conclusions

Mistletoes are well-known for their immunomodulatory potential mechanisms. Here, we developed an in vitro and in vivo study on a yet-unexplored species of neotropical mistletoe named *P. ovata*. The phytochemical profile showed a plant rich in secondary chemical compounds with high pharmacological potential, in addition to high quantification of flavonoids. The hydroethanolic extract from the leaves of *P. ovata* demonstrated low cytotoxicity and ability to reduce nitrite and cytokines considered pro-inflammatory at our highest tested dose (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In vivo assays with BALB/c mice showed that the oral treatment with a higher dose of the extract (500 mg/kg) reduced mast cell migration and paw-stimulated edema, but in another in vivo inflammatory model with peritonitis in BALB/c mice, treatment with the extract did not influence intraperitoneal lavage cell counts and serum cytokine concentrations.

In general, we conclude that the hydroethanolic extract of *P. ovata* leaves is rich in secondary chemical compounds with a high concentration of flavonoids, has immunomodulatory effect in vitro, and can inhibit the formation of paw edema and mast cell count in the paw tissue of mice. This is the first report on the therapeutic effects of *P. ovata*; therefore, we encourage that, in further studies, the pathways involved in the immunomodulatory effect, as well as the use of other inflammatory models and isolation of active compounds, are performed.

Author Contributions: Conceptualization, I.d.F.B.M., K.d.S.C., F.A.-S. and A.L.A.-S.; methodology, I.d.F.B.M., A.L.M.F., A.A.B.d.M., E.M.d.S., C.Q.d.R. and F.A.-S.; formal analysis, I.d.F.B.M., F.A.-S. and A.L.A.-S.; resources, K.d.S.C. and A.L.A.-S.; data curation, K.d.S.C., F.A.-S. and A.L.A.-S.; writing—original draft preparation, I.d.F.B.M., F.A.-S. and A.L.A.-S.; writing—review and editing, I.d.F.B.M., A.L.M.F., A.A.B.d.M., E.M.d.S., C.Q.d.R., K.d.S.C., F.A.-S. and A.L.A.-S.; visualization, I.d.F.B.M., A.L.M.F., A.A.B.d.M., E.M.d.S., C.Q.d.R., K.d.S.C., F.A.-S. and A.L.A.-S.; supervision, I.d.F.B.M., K.d.S.C., F.A.-S. and A.L.A.-S.; project administration, I.d.F.B.M., K.d.S.C., F.A.-S. and A.L.A.-S.; funding acquisition, K.d.S.C. and A.L.A.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brazil; CAPES), Finance Code 001. The APC (Fund for Conjoint Research Project) was funded by the Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ. F.A.-S. is a post-doctoral research fellow and scholarship holder of CAPES, grant number 88887.363006/2019-00. K.d.S.C. has a productivity scholarship PQ-2 (CNPq 315225/2021-1). A.L.A.-S. has a productivity scholarship PQ-2 (CNPq 313348/2021-9).

Institutional Review Board Statement: The genetic heritage material access was granted by the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado—SisGen) with reference record AFC60DB. The animal study protocols were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (CEUA-IOC)—Rio de Janeiro (CEUA L-53/2016-A3) and conducted in accordance with the National Council for the Control of Animal Ex-perimentation (CONCEA).

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hawiger, J.; Zienkiewicz, J. Decoding inflammation, its causes, genomic responses, and emerging countermeasures. *Scand. J. Immunol.* **2019**, *90*, e12812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Varela, M.L.; Mogildea, M.; Moreno, I.; Lopes, A. Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation* **2018**, *41*, 1115–1127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Abdulkhaleq, L.A.; Assi, M.A.; Abdullah, R.; Zamri-Saad, M.; Taufiq-Yap, Y.H.; Hezmee, M.N.M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet. World* **2018**, *11*, 627–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Furman, D.; Campisi, J.; Verdin, E.; Carrera-Bastos, P.; Targ, S.; Franceschi, C.; Ferrucci, L.; Gilroy, D.W.; Fasano, A.; Miller, G.W.; et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1822–1832. [[CrossRef](#)]
5. Margetic, S. Inflammation and haemostasis. *Biochem. Med.* **2012**, *22*, 49–62. [[CrossRef](#)]
6. Machado, A.C.; Oliveira, R.C. Medicamentos fitoterápicos na Odontologia: Evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-dosertão (*Myracrodruo murundeuva* Allemão). *Rev. Bras. Plantas Med.* **2014**, *16*, 283–289. [[CrossRef](#)]
7. Der, J.P.; Nickrent, D.L. A Molecular phylogeny of Santalaceae (Santalales). *Syst. Bot.* **2008**, *33*, 107–116. [[CrossRef](#)]
8. Muche, M.; Muasya, A.M.; Tsegay, B.A. Biology and resource acquisition of mistletoes, and the defense responses of host plants. *Ecol. Process.* **2022**, *11*, 24. [[CrossRef](#)]
9. Caires, C.S.; Gomes-Bezerra, K.M.; Machado, A.F.P.; Dettke, G.A. Nomenclatural novelties and synopsis of *Passovia* (Loranthaceae): New synonyms, new combinations and reinstated species. *Rodriguésia* **2021**, *72*, e01952019. [[CrossRef](#)]
10. Venturelli, M. Estudos sobre *Struthanthus vulgaris* Mart.: Anatomia do fruto e semente e aspecto de germinação, crescimento e desenvolvimento. *Rev. Bras. Bot.* **1981**, *4*, 131–147.
11. De Souza, M.C.; Scalon, M.C.; Poschenrieder, C.; Tolrà, R.; Venâncio, T.; Teixeira, S.P.; Da Costa, F.B. Aluminium detoxification in facultative (*Passovia ovata* (Pohl ex DC.) Kuijt and *Struthanthus polyanthus* Mart.—Loranthaceae) and dependent (*Psittacanthus robustus* (Mart.) Marloth—Loranthaceae) Al-accumulating mistletoe species from the Brazilian savanna. *Phytochemistry* **2018**, *153*, 58–63. [[CrossRef](#)]
12. Jain, M.; Kapadia, R.; Albert, S.; Mishra, S.H. Standardization of *Feronia limonia* L. leaves by HPLC, HPTLC, physicochemical and histological parameters. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromat.* **2011**, *10*, 525–535.
13. Xiang, H.; Cao, F.; Ming, D.; Zheng, Y.; Dong, X.; Zhong, X.; Mu, D.; Li, B.; Zhong, L.; Cao, J.; et al. Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development. *App. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 6671–6681. [[CrossRef](#)]
14. Wu, S.Y.; Lei, Y.; Kang, M.; Xiao, Y.L.; Chen, Z.X. Molecular characterisation of clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from Sichuan province China. *Mycoses* **2017**, *58*, 280–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Sun, Y.; Xin, X.; Zhang, K.; Cui, T.; Peng, Y.; Zheng, J. Cytochrome P450 mediated metabolic activation of chrysophanol. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *289*, 57–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Luiz, R.L.; Vila, T.V.; de Mello, J.C.; Nakamura, C.V.; Rozental, S.; Ishida, K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complement. Altern. Med.* **2015**, *15*, 68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Liu, J.B.; Ding, Y.S.; Zhang, Y.; Chen, J.B.; Cui, B.S.; Bai, J.Y.; Lin, M.B.; Hou, Q.; Zhang, P.C.; Li, S. Anti-inflammatory hydrolyzable tannins from *Myricaria bracteata*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1015–1025. [[CrossRef](#)]
18. Nazaré, C.A.N. Avaliação da Atividade Antioxidante de uma Espécie de Loranthaceae. I Simpósio Internacional em Investigações Químico-Farmacêuticas; Univali: Itajaí, Brasil, 2017.
19. Alharits, L.; Handayani, W.; Yasman, Y.; Hemelda, N.M. Phytochemical analysis and antioxidant activity of leaves and flowers extracts of mistletoe (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.), collected from UI Campus, Depok. *AIP Conf. Proc.* **2019**, *2168*, 020101.
20. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 162750. [[CrossRef](#)]
21. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 6425–6440. [[CrossRef](#)]
22. Palmieri, E.M.; McGinity, C.; Wink, D.A.; McVicar, D.W. Nitric Oxide in macrophage immunometabolism: Hiding in sight. *Metabolites* **2020**, *10*, 429. [[CrossRef](#)]
23. Marques, F.M.; da Costa, M.R.; Vittorazzi, C.; Gramma, L.S.D.S.; Barth, T.; de Andrade, T.U.; Endringer, D.C.; Scherer, R.; Fronza, M. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of *Struthanthus vulgaris*. *Planta Med.* **2017**, *83*, 770–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ohikhena, F.U.; Wintola, O.A.; Afolayan, A.J. quantitative phytochemical constituents and antioxidant activities of the mistletoe, *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle extracted with different solvents. *Pharmacogn. Res.* **2018**, *10*, 16–23.
25. Arango Duque, G.; Descoteaux, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 491–503. [[CrossRef](#)]
26. Cavaillon, J.M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon* **2018**, *149*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Fang, H.; Pengal, R.A.; Cao, X.; Ganesan, L.P.; Wewers, M.D.; Marsh, C.B.; Tridandapani, S. Lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 360–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kim, K.N.; Heo, S.J.; Yoon, W.J.; Kang, S.M.; Ahn, G.; Yi, T.H.; Jeon, Y.J. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *649*, 369–375. [[CrossRef](#)]

29. Song, M.J.; Kim, K.H.; Yoon, J.M.; Kim, J.B. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *346*, 739–745. [[CrossRef](#)]
30. Kim, J.B. Immunological activities of korean mistletoe Extract (*Viscum album coloratum*; KM—110). *Korean J. Immunol.* **1997**, *10*, 571–582.
31. Sobiepanek, A.; Kuryk, Ł.; Garofalo, M.; Kumar, S.; Baran, J.; Musolf, P.; Siebenhaar, F.; Fluhr, J.W.; Kobiela, T.; Plasenzotti, R.; et al. The multifaceted roles of mast cells in immune homeostasis, infections and cancers. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2249. [[CrossRef](#)]
32. Galli, S.J.; Grimaldeston, M.; Tsai, M. Immunomodulatory mast cells: Negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 478–486. [[CrossRef](#)]
33. Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1962**, *111*, 544–547. [[CrossRef](#)]
34. Hofmann, A.M.; Abraham, S.N. New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* **2009**, *21*, 678–686. [[CrossRef](#)]
35. Ansar, W.; Ghosh, S. Inflammation and inflammatory diseases, markers, and mediators: Role of CRP in some inflammatory diseases. In *Biology of C Reactive Protein in Health and Disease*; Springer: New Delhi, India, 2016.
36. Rodrigues, T.S.; Guimarães, S.F.; Rodrigues-Das-Dôres, R.G.; Gabriel, J.V. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Rev. Bras. Plantas Med.* **2011**, *13*, 587–590. [[CrossRef](#)]
37. Costa, A.F. *Farmacognosia*, 3rd ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, Portugal, 1994.
38. Matos, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*; Edições UFC: Fortaleza, Brasil, 1997; pp. 1–150.
39. Acácio, R.; Franco, S.P.B.; Costa Filho, W.S.; Costa, J.G.; Santos, A.F.; Santana, H.G. Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico de *Melochia tomentosa* LINAEUS (1735). *Divers. J.* **2018**, *3*, 412–428. [[CrossRef](#)]
40. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *56*, 55–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 597–652. [[PubMed](#)]
42. Guerra, A.S.; Malta, D.J.; Laranjeira, L.P.; Maia, M.B.; Colaço, N.C.; de Lima, M.C.; Galdino, S.L.; Pitta Ida, R.; Gonçalves-Silva, T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 1816–1822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CAPÍTULO 3 - Primeiro relato sobre o efeito antioxidante e antitumoral da erva-de-passarinho *Passovia ovata* (Pohl ex DC.)

TITLE: First report on mistletoe *Passovia ovata* (Pohl ex DC.) antioxidant and anticancer effect

ABSTRACT

Passovia ovata is a mistletoe that belongs to the Loranthaceae family, a group of plants known for their therapeutic potential. In the present study, the hydroethanolic extract (POH) and the hexane (FHE), ethyl-acetate (FEA), and water (FW) fractions from leaves of *P. ovata* were tested to investigate their yield, chemical composition, antioxidant and antitumoral potential. Total flavonoid content was determined by aluminum chloride colorimetric method. The antioxidant potential were assessed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The cytotoxicity was evaluated in fibroblast cell line CCD-1072Sk, and in breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231 by MTT. FEA and FHE were submitted to high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry conditions (HPLC-DAD-MS) and thin layer chromatography (TLC) analysis. The percentage yield after extraction was: 25% for POH, 0.31% for FHE, 3.98% for FEA, and 17.48% for FW. The flavonoid quantification was higher in FHE (36.04 ± 0.73 quercetin equivalents (QE)/g) and FEA (13.08 ± 0.60 QE/g). FEA was ranked as the fraction holding the highest antioxidant activity, with an average FRAP value of $3.488.24 \pm 10.49$ μ M of Trolox equivalent/ g of dry weight, and IC_{50} of 13.10 ± 0.18 and 50.98 ± 0.36 μ g/mL for DPPH and ABTS assays, respectively. POH and fractions demonstrated low cytotoxicity towards CCD-1072Sk cell line. POH showed inhibitory effect against MDA-MB-231 after 48 and 72 hours of treatment, with IC_{50} of 962 ± 1.09 μ g/mL and 550.1 ± 1.16 μ g/mL, respectively. FEA showed an inhibitory effect against MCF7 after 72 hours of exposure (IC_{50} of 941.0 ± 1.22 μ g/mL), and against MDA-MB-231 with IC_{50} of 709.4 ± 1.31 μ g/mL and 422.8 ± 1.13 μ g/mL after 48 and 72 hours from treatment, respectively. FHE demonstrated the higher inhibitory potential for MCF7 and MDA-MB-231, with IC_{50} of 22.46 ± 1.12 and 48.61 ± 1.09 , respectively, 72 hours after treatment. Phenolic compounds were detected by TLC and HPLC in FHE and FEA. *P. ovata* showed to be a plant rich in flavonoids and phenolic compounds, with strong antioxidant activity and antitumor effect against breast cancer cell lines. These findings suggested that *P. ovata* may

be a promising candidate for research that emphasizes oxidative stress-related diseases and breast cancer treatment.

Keywords: mistletoe; antioxidant; antitumoral; breast cancer

1. INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) play key roles in initiating, mediating, and regulating oxidative stress (ZARKOVIC, 2020), which is the imbalance between oxidation and antioxidation triggered by free radicals. Oxidative stress is associated with the aging process (QI; DONG, 2021) and diseases such as diabetes (LUC et al., 2019), atherosclerosis (KATTOOR et al., 2017), Alzheimer's (BAI et al., 2022), and cancer (ARFIN et al., 2021). The relationship between oxidative stress and cancer may occur through changes in cell phenotype, promotion of cell survival and proliferation, and stimulation of resistance to chemotherapy and radiotherapy (REUTER et al., 2010).

Breast cancer is considered the most common malignancy in the world and the main cause of cancer-related deaths (KATSURA, 2022). Resistance to current therapy can be considered the major obstacle to achieve an effective treatment in breast cancer (BARZAMAN et al., 2020). Several research seek to find new active compounds that may have antitumor potential, and in this search, plants stand out due to its endless diversity in chemical composition. In this context, *in vitro* assays with plant derivatives are helpful to understand their antitumor potential and collaborate in the discovery of new drugs (VALLEJO; SALAZAR; GRIJALVA, 2017).

Mistletoes are a group of hemiparasite plants, as they combine parasitism on tree species and their own photosynthetic activity. This group has over 1.300 species that occur worldwide (DEVKOTA, 2005). Some species have a long history as cancer treatment, as the european mistletoe, *Viscum album L.*, is the most prescribed medicinal plant in German-speaking countries for patients diagnosed with cancer (ROSTOCK, 2020). Loranthaceae is the largest mistletoe family with around 1.000 species (WILSON; CALVIN, 2006), among them *Passovia ovata* (Pohl ex DC.) Tiegh. The genus *Passovia*, formerly classified as *Phthirusa* (KUITJ, 2011), occurs in the region of Brazil, Mexico, Bolivia, and Jamaica, and is marked by characteristics such as small tetrahexamorous flowers and inflorescences formed by bracteolate triads (CAIRES et al., 2021).

P. ovata is a species that can cause physiological stress in its host, through the induction of changes in the concentrations of nutrients such as nitrogen, phosphorus, potassium, and calcium in the host plant, although there is a tendency to adaptation and

minimization of side effects over time (SCALON et al., 2021). Despite the occurrence of *P. ovata* in several regions, there are no studies that elucidate its potential therapeutic properties. In this research, we sought to elucidate the antioxidant and antitumor effect of the mistletoe *P. ovata*, which has not been previously reported.

2. METHODS AND MATERIALS

2.1. Plant material, hydroethanolic extract and fraction preparation

The samples of *P. ovata* leaves were collected from host mango tree (*Mangifera indica*) in Farm School at the State University of Maranhão – UEMA (coordinates 2°35'06.0"S 44°12'30.8"W) located in the city of São Luís – MA, Brazil, in July of 2019. A voucher specimen was identified by the Herbarium Rosa Mochel, UEMA, and deposited under 5516 number. The genetic heritage material access was granted by the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge with reference record AFC60DB. The hydroalcoholic extract of *P. ovata* leaves and its fractions were obtained through liquid-liquid partition at room temperature performed according to the methodology proposed by Vieira et al. (2005) at the Laboratory of Chemistry of Natural Products at the Federal University of Maranhão (UFMA). POH was extracted by maceration at room temperature, in the proportion of 20 g of dried material to 100 mL of solvent ethanol 70% for 12 days. Liquid-liquid partitions were carried out with solvents hexane and ethyl acetate from 100 g of the crude extract. The water fraction of the hydroethanolic extract was obtained by drying the aqueous phase at the end of the process in a rotary evaporator. The obtained fractions were concentrated and lyophilized at -70 °C temperature. A portion of the crude hydroalcoholic extract (200 g) was also dried and lyophilized. The samples obtained were then coded as POH (*P. ovata* hydroalcoholic extract), FHE (*P. ovata* hexane fraction), FEA (*P. ovata* ethyl acetate fraction), and FW (*P. ovata* water fraction).

The yield of POH was calculated according to the formula (TESFAYE et al., 2021):

$$\text{Total yield (\%)} = \frac{\text{Weight of the extract obtained}}{\text{Weight of powder used for extraction}} \times 100$$

The percentage yield of the fractions was calculated according to the formula (TESFAYE et al., 2021):

$$\text{Total yield (\%)} = \frac{\text{Weight of fractions obtained}}{\text{Weight of crude extract used}} \times 100$$

2.2 Determination of total flavonoid content

The flavonoid content of the POH and its fractions was determined by a modified method described previously by Acácio et al. (2008). This method is based on the complex of aluminum ion (Al^{3+}) and hydroxyl groups from flavonoids which results in a yellow compound (AL-FARSI et al., 2018). The plant extract or fractions (200 μ L, 1 mg/mL in methanol) was mixed with 100 μ L of $AlCl_3$ (2%) in a 96-well microplate. The microplate was kept in a dark place at room temperature for 30 min. The absorbance was measured at 405 nm using a Biochrom EZ Read 400 spectrophotometer (Biochrom, Cambridge, UK). A standard curve of quercetin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was drawn within a concentration range from 330 μ g/mL to 0.014 μ g/mL and obtained absorbances were interpolated with this calibration curve. Experiments were performed in triplicate and repeated three times. Results were expressed as mean \pm standard deviation of milligram of quercetin equivalents (QEs) per gram of extract (mgQE/g).

2.3 Analysis by thin layer chromatography (TLC)

The FHE and FEA were preliminarily analyzed by thin layer chromatography (TLC) using silica gel 60 F254 on an aluminum chromatographic plate (20 cm \times 20 cm \times 0.15 mm; Merck, Darmstadt, Germany) previously activated in oven at 105 $^{\circ}$ C for 2 hours. As a mobile phase, methanol and chloroform in a ratio of 1:9 (v/v) was used. After elution, the chromatograms were evaluated under white and ultraviolet light at wavelengths of 254 and 365 nm and sprayed with natural product/polyethylene glycol (NP/PEG).

2.4 High-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry conditions (HPLC-DAD-MS)

The FHE and FEA were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Shimadzu Nexera UFLC chromatograph equipped with a Bruker Daltonics Amazon SL mass detector (MS) and a SPDM20 diode array detector (DAD) equipped with CBM20A Controller, DGU20A degasser, LC20AD binary pump, CTO20A furnace, and SILA20A automatic injector. Analysis was performed at room temperature and chromatographic column was ACQUITY HSS T3 C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m, Waters, USA). The mobile phase consisted of (A) 2.5% acetic acid in water and (B) HPLC grade acetonitrile. The analysis conditions were: 10%B for 1.2 min, 20%B for 1.0 min, 30%B for 1.0 min, 35%B for 1 min, 40%B for 1 min, 45%B for 1 min, 50%B for 2 min, 55%B for 2

min, 60%B for 3 min, 65%B for 3 min, 70%B for 3 min, 75%B for 3 min, 80%B for 2 min, 85%B for 1 min, and the return to 10%B to rebalance the column. The flow rate was kept at 0.3 mL/min and the ion spray voltage was set to -4500 V in negative mode.

2.5 Antioxidant activity by DPPH assay

The 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) assay is based on the interaction of an antioxidant that scavenges free radicals and the DPPH radical, forming DPPHH, which is marked by a change in color from purple to yellow (BALIYAN et al., 2022). The determination of antioxidant activity was evaluated through the consumption of DPPH, adapted from the procedure of Acácio et al. (2018). POH and fractions were diluted in methanol at concentrations from 1.000 µg/mL to 7.81 µg/mL, and a standard curve was obtained with Trolox at concentrations from 50 µM to 0.39 µM. Then, 100 µL of the sample was added to 40 µL of 0.3 mM DPPH solution. The samples were kept in the dark for 30 minutes, at room temperature. After that, reading was performed at 492 nm absorbance on an ultraviolet-visible spectrophotometer. The antioxidant activity percentage was calculated following the formula:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = \frac{\text{Control absorbance} - \text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}} \times 100$$

DPPH results were expressed as concentration of extract necessary to decrease the initial concentration of DPPH by 50% (IC₅₀), expressed as mean ± standard deviation. The experiment was carried out in triplicate and performed three times.

2.6 Antioxidant activity by radical ABTS reduction

The assay was performed according to Re et al. (1999) and Meera et al. (2019) with adaptations. The 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) solution was obtained by adding 1 mL of ultrapure water in 3.84 mg of ABTS for a final concentration of 7 mM. To obtain ABTS^{•+} cationic radical, for every 1 mL of ABTS solution, 17.6 µL of potassium persulfate solution at 140 mM was added, and the solution was kept in the dark for 16 hours at room temperature. After this period, ABTS^{•+} was diluted in methanol at a ratio of 1:30 to obtain an absorbance value between 0.8 – 1 at 734 nm. Then, 20 µL of each sample at concentrations from 1.000 µg/mL to 7.81 µg/mL was added to 280 µL of ABTS^{•+} radical solution. After that, the microplate was kept in the dark for 20 minutes, and absorbance was obtained in a plate reader spectrophotometer at 734 nm. Standard curve with

Trolox for this assay had concentrations from 1.000 to 25 μM . Absorbance analyzes were normalized according to the formula:

$$\text{ABTS} \bullet + \text{scavenging effect (\%)} = \frac{\text{Control absorbance} - \text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}} \times 100$$

The results were expressed as IC_{50} , concentration of extract necessary to decrease the initial concentration of ABTS by 50%, expressed as mean \pm standard deviation. The experiment was executed in triplicate and performed three times.

2.7 Ferric Reducing Antioxidant Power

The antioxidant capacity of POH and its fractions was estimated spectrophotometrically by adaptations from Rufino et al. (2006), and Proestos and Komaitis (2009). The method is based on the reduction of Fe^{3+} -tripirydyltriazine (TPTZ) complex to a blue colored complex, Fe^{2+} -TPTZ, through the donation of electrons from antioxidants at low pH (IRSHAD et al., 2012). The ferric reducing antioxidant power (FRAP) reagent was prepared by addition of 0.3 M acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ in 40 mM HCl and 20 mM FeCl_3 in 10:1:1 proportion. FRAP reagent was then left at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes, and then 300 μL of FRAP reagent was added to 10 μL of the sample at 1 mg/mL in methanol and 30 μL of deionized water. Samples were incubated for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, and the absorbance was measured at 595 nm. Data was normalized according to calibration curve with Trolox (1.000 to 0.48 μmol in methanol), and results were expressed as μmol Trolox equivalent (TE) per gram of extract ($\mu\text{mol TE/g}$). The experiment was made in triplicate and performed three times.

2.8 Cell culture

Human skin fibroblast cell line CCD-1072Sk (ATCC CRL-2088TM) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and is deposited in Bank of Cells of Rio de Janeiro (BCRJ 0062) by Dr. Katia Calabrese. Human breast carcinoma cell line MCF7 (ATCC HTB-22TM) and human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 (ATCC HTB-26TM) were kindly donated by the Monoclonal Antibody Technology Laboratory, Biomanguinhos, Fiocruz-RJ. The Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was used to maintain CCD-1072Sk cell line, and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was used to maintain MCF7 and MDA-MB 231 cell lines. All mediums were supplemented with 10% of inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), L-glutamine

(20mM) (Gibco, Gainthersburg, MD. USA) and antibiotic solution containing penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator and monitored daily under an inverted microscope. Passages were performed at 80-90% confluence.

2.9 Cytotoxicity in cell lines

Cytotoxicity assay on CCD-1072Sk, MCF7, and MDA-MB-231 cells were determined by 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (MOSMANN, 1983). Cells (5×10^5 /well) were plated in 100 µL per well in 96-well plates and incubated overnight at 37 °C in a CO₂ incubator. Supernatant was then removed and POH and its fractions were added to the wells. DMSO was used to obtain a concentration of 100 mg/ml of POH and fractions, than this solution was diluted in Iscove's medium, for CCD-1072Sk, or DMEM medium, for MCF7 and MDA-MB-231 cell lines, to obtain the concentrations range of 1.9–1.000 µg/mL. Two and a half hours before incubation period of 24, 48 or 72 hours, 10 µL of MTT (5 mg/mL) was added into each well and the cells were incubated until incubation time was completed. Supernatant was then removed and 100 µL of DMSO was added. The control group consisted of cells treated with 1% DMSO, and well with only medium was used as a blank control. The absorbance was read at 550 nm on a spectrophotometer. Results were expressed as IC₅₀. Doxorubicin (Rubidox, Bergamo®, Taboão da Serra, SP, Brazil) was used as a standard drug in MCF7 and MDA-MB 231 assay. The experiment was carried out in triplicate and performed three times.

2.10 Statistical analysis

Results were expressed as means of three independent trials with standard error (SD) (mean value ± SD). Data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) using Graph Pad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and $p < 0.05$ was accepted as significance.

3.RESULTS

3.1 Yield and total flavonoid content of POH and its fractions

After the collection of samples from *P. ovata* (Figure 1), POH and its fractions were extracted. The percentage yield after extraction was: 25% for POH, 6.74% for FW, 2.87%, for FEA, and 1.26% for FHE.



Figure 1. (A) *Passovia ovata* in mango tree (*Mangifera indica*) in São Luís-MA, Brazil. (B) Plant sample collected (C) *P. ovata* leaf used to prepare the hydroethanolic extract and its fractions.

The content of total flavonoid in POH and its fractions was quantified spectrophotometrically by using aluminum chloride colorimetric assay (Table 1). In this study, the total flavonoid content ranged from 3.9 to 36.044 mg QE/g. The results showed a high quantification of flavonoids in order: FHE> FEA> POH>FW.

Table 1. Flavonoids quantification of hydroethanolic extract, and hexane, ethyl acetate, and aqueous fractions isolated from leaves of *Passovia ovata*

<i>Passovia ovata</i>	Flavonoids quantification (mgQE/g)
Hydroethanolic extract (POH)	4.440 ± 0.157
Hexane fraction (FHE)	36.044 ± 0.733
Ethyl acetate fraction (FEA)	13.086 ± 0.606
Aqueous fraction (FW)	3.925 ± 0.189

Values are expressed as mean ± SD from triplicates and three times repetition. mgQE/g: mg quercetin equivalents (QE) per gram of the compound.

3.2 Phytochemical characterization of extracts

The extracts that showed the most promising results for antioxidant and antitumor activity were subjected to chemical characterization. FHE and FAE were analyzed by TLC and HPLC-DAD-MS and the obtained results were complementary. Figure 2 shows the chromatograms obtained by HPLC-DAD-MS at 254nm, considered a general wavelength for natural products, where the largest number of substances can be detected.

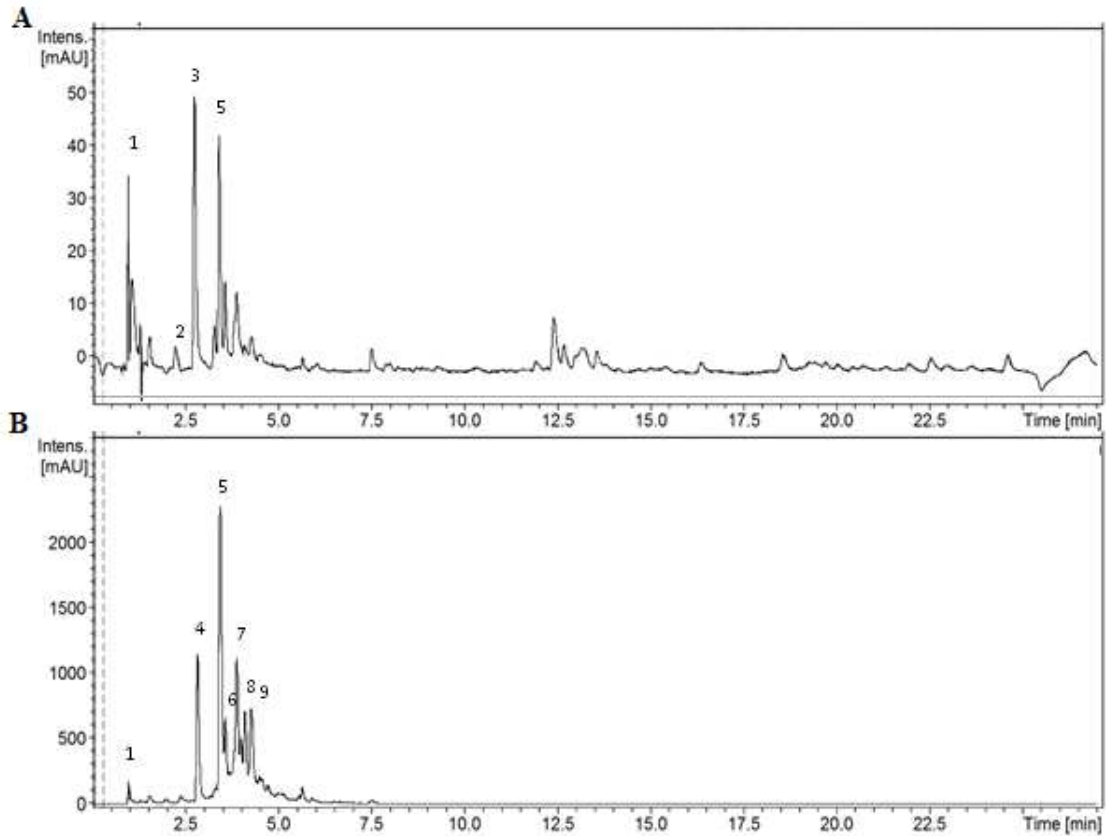


Figure 2. High-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry conditions (HPLC-DAD-MS) chromatograms obtained with UV reader at 254nm indicating the presence of 9 substances in hexane (FHE) (A) and ethyl acetate (FEA) (B) fractions of *Passovia ovata*.

Nine substances were identified in both extracts, whose identifications were suggested according to this analysis (Table 2).

Table 2. Identification of substances or classes of substances present in hexane and ethyl acetate fractions of *Passovia ovata* by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry conditions (HPLC-DAD-MS). (-) absence; (+) presence.

	Retention time (min)	m/z exp	<i>P. ovata</i> extracts		Tentative identification
			Hexane	Ethyl acetate	
1	1.0	191.0376	+	+	Quinic acid
2	2.3	163.0739	+	-	Coumaric acid
3	2.8	163.0382	+	-	Coumaric acid
4	2.9	291.0838	-	+	Catechin/epicatechin
5	3.5	163.0379	+	+	Coumaric acid
6	3.7	597.1414	-	+	Flavonoid glucoside
7	3.9	581.1446	-	+	Flavonoid glucoside
8	4.1	163.0380	-	+	Coumaric acid
9	4.3	453.1139	-	+	Catechin-glucoside

The TLC analyzes (Figure 3) were important to confirm the presence of p-coumaric acid (c) and catechin/epicatechin isomers (d) in the FEA of *P. ovata*, from observation under ultraviolet light at 254nm, by comparison with authentic commercial samples (standards). It was also possible to verify the probable presence of a non-glycosylated flavonoid in the FHE of *P. ovata*, demonstrated by the yellow stain (a) after development with NP-PEG under visible light. In the same TLC, it is possible to suggest the presence of glycosylated flavonoids (b), also showing yellow, in the FEA. When observed under UV light at 365nm, it is possible to verify the presence of substances from the class of cinnamic derivatives (e) with a bluish color and a probable medium polarity flavonoid (f) present in the FEA.

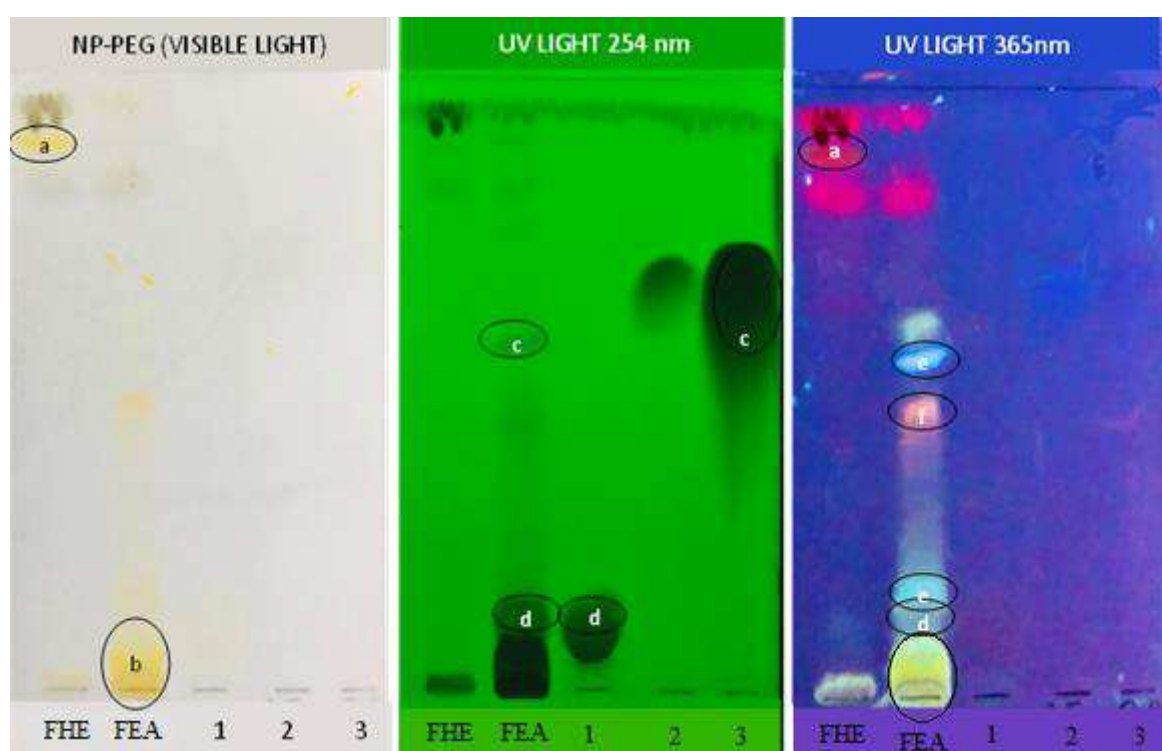


Figure 3. Thin layer chromatography of *P. ovata* hexane (FHE) and ethyl acetate (FEA) fractions and comparison with catechin/epicatechin (1) ferulic acid (2) and p-coumaric acid (3) standards.

3.3 Antioxidant activity of POH and its fractions

Antioxidant potential of *P. ovata* was analyzed by DPPH, ABTS, and FRAP assays (Table 3). The antioxidant activity of POH and fractions were concentration dependent. Regarding the FRAP results, POH, FEA and FW can be considered very high (>400 $\mu\text{mol/g}$) FRAP, and FHE can be considered high (100-400 $\mu\text{mol/g}$) FRAP (FERNANDES et al., 2016). FEA showed the highest antioxidant potential in all assays performed.

Table 3. Antioxidant effect of hydroethanolic extract of *Passovia ovata* and its fractions by DPPH, ABTS, and FRAP methods

<i>Passovia ovata</i>	DDPH assay	ABTS assay	FRAP assay
Hydroethanolic extract (POH)	15.38±0.19	62.72 ±1.05	3488.24±10.49
Hexane fraction (FHE)	282.56±0.49	852.95±1.34	367.75±5.84
Ethyl acetate fraction (FEA)	13.10±0.18	50.98±0.36	2692.90±1.57
Aqueous fraction (FW)	71.47±8.96	76.36±0.66	2109.57±3.44

Values are expressed as mean ± SD from triplicates and three times repetition. Results were expressed as IC₅₀ (µg/mL) for DPPH and ABTS and as µM Trolox per gram of sample for FRAP. IC₅₀: amount of antioxidant required to decay the initial concentration of the DPPH or ABTS radical by 50%. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); FRAP: ferric reducing antioxidant power.

3.4 Antitumoral activity of POH and its fractions

In MTT assay, IC₅₀ for CCD-1072SK human skin fibroblast was higher than 1.000 µg/mL after treatment with POH and its fractions for 24, 48 and 72 hours. The cytotoxicity of POH and the isolated fractions were evaluated using MTT assay in MCF7 and MDA-MB-231 cells after 24, 48 and 72 hours from incubation (Table 4).

Table 4- Hydroethanolic extract and fractions isolated from leaves of *Passovia ovata*, and chemotherapy drug doxorubicin cytotoxicity against human breast cancer cells after 24, 48 and 72 hours of treatment

Compound	MCF7			MDA-MB-231		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
POH	>1000	>1000	>1000	>1000	962 ± 1.09	550.1 ± 1.16
FHE	171.0 ± 1.18	31.3 ± 1.08	22.46 ± 1.12	89.89 ± 1.13	47.41 ± 1.18	48.61 ± 1.09
FEA	>1000	>1000	941.0 ± 1.22	>1000	709.4 ± 1.31	422.8 ± 1.13
FW	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Doxorubicin	132.4± 1.14	7.2± 1.22	4.3± 1.24	271 ± 1.17	101.5 ±1.26	54.9± 1.23

Values are expressed as mean ± SD of triplicates and three times repetition. Results were expressed as IC₅₀ (µg/mL): amount of compound required to decay the initial cell concentration by 50%. Hydroethanolic extract of *P. ovata* (POH); hexane fraction from *P. ovata* (FHE), acetyl acetate fraction from *P. ovata* (FEA), and water fraction from *P. ovata* (FW).

Cell viability significantly decreased in MCF7 after treatment with FHE, FEA, and doxorubicin, and in MDA-MB-231 after treatment with POH, FHE, FEA and doxorubicin, exhibiting a time and concentration dependent inhibition of cell proliferation (Figure 4). POH and FEA were more cytotoxic to estrogen receptor (ER) negative breast cancer cell MDA-MB-231 than ER positive breast cancer cell MCF7, as their cytotoxicity began 48 hours after treatment on MDA-MB-231. FHE showed greater inhibitory potential for both

breast cancer cell lines at all times evaluated, however the aqueous fraction did not demonstrate an inhibitory effect for any of the tumor cell lines. Treatment with the standard drug doxorubicin demonstrated cytotoxic effect for MCF7 and MDA-MB-231 at all times analyzed.

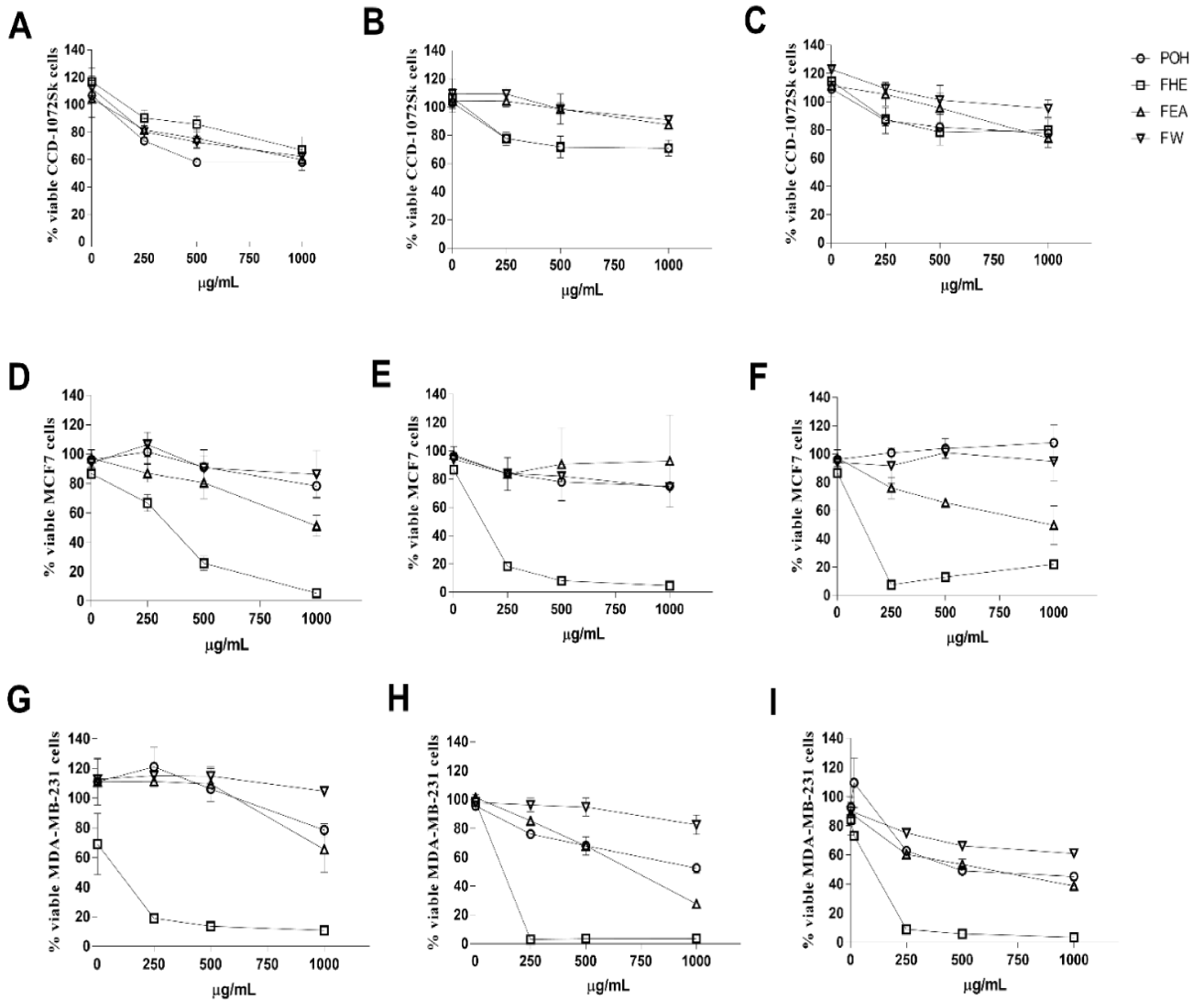


Figure 4. Dose-response curves showing the cytotoxic activities of the hydroethanolic extract (POH) and the hexane (FHE), ethyl-acetate (FEA), and water (FW) fractions from leaves of *P. ovata* performed by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and normalized in GraphPad Prism 9.0. Percent of CCD-1072Sk cells viability after treatment with POH, FHE, FEA, and FW at concentrations of 1.9, 250, 500, and 1000 $\mu\text{g/mL}$ after 24 hours (A), 48 hours (B) and 72 hours (C) from treatment. Percent of MCF7 cells viability after treatment with POH, FHE, FEA, and FW at concentrations of 1.9, 250, 500, and 1000 $\mu\text{g/mL}$ after 24 hours (D), 48 hours (E) and 72 hours (F) from treatment. Percent of MDA-MB 231 cells viability after treatment with POH, FHE, FEA, and FW at concentrations of 1.9, 250, 500, and 1000 $\mu\text{g/mL}$ after 24 hours (G), 48 hours (H) and 72 hours (I) from treatment.

4. DISCUSSION

Plants are an immeasurable source of new bioactive compounds that can be the key for new adjuvant treatments against multiple diseases. Mistletoes are a group of hemiparasite plants with several therapeutic properties, which already led to new complementary

therapies for cancer patients. Our work aimed to provide a first report on the antioxidant and antitumor effects of the hydroethanolic extract and hexane, ethyl acetate, and water fractions from leaves of *Passovia ovata* mistletoe. For this, we carried out extractions that generated different yields of dry weight plant material.

The yield of an extract or fraction can be significantly altered according to the solvent used for its extraction, as well as the extraction technique (HAYOUNI; ABEDRABBA; BOUIX, 2007). In our assay, POH showed a higher yield than the hydroalcoholic extract of *Phthirusa paniculata* leaves (6.99%) (CARTAGENES et al., 2017). For the pharmaceutical industry, optimizing the extraction of a drug must minimize production costs, avoid material waste, and increase yield (HE et al., 2016). When using medicinal plants, is also necessary to guarantee the sustainability and conservation of this resource (CHEN et al., 2016). When comparing *P. ovata* fractions with other mistletoes such as *Phthirusa* sp., a genus that *P. ovata* used to belong, the fractions with the highest yields were ethyl acetate (31.0%) and hexane (37.8%) (CASTRO et al., 2019), which in our assay had the smallest yields, which demonstrates the variation of yield between mistletoes.

The choice of solvents for extraction can be based on solutes polarity, as a similar polarity between the solute and the solvent will increase the dissolution of biomolecules. For a more effective extraction within the desired yield, various solvents can be used sequentially (ALTEMIMI et al., 2017). Among the solvents used in our work, the order from the most polar to the least polar is: water > ethanol > ethylacetate > hexane (NAWAZ et al., 2020).

As a phytochemical evaluation parameter, quantification of flavonoids was performed. In our assay, POH and fractions demonstrated a significant quantification of this compound. POH showed a higher quantification of flavonoids than ethanol extract from *S. vulgaris* branches (1.9 ± 0.2 mg QE/g) (VITTORAZZI et al., 2016). The high quantification of flavonoids in POH can be explained by the solvent ethanol used for its extraction, which is a polar solvent that manages to extract phenolic compounds, such as flavonoids, directly from plant cells more efficiently than nonpolar solvents (REZAIE et al., 2015).

Flavonoids are a class of phenolic compounds originated from the secondary metabolism of plants. They are considered essential in the pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic industry due to their anti-inflammatory, antimutagenic, antitumor, and antioxidant effects, among others (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). In mistletoes, flavonoids seem to be responsible for their effects as immunomodulators of pro-inflammatory cytokines (APAZA et al., 2019), as enhancers of melanin biosynthesis (JUNG et al., 2019), and as anticancer (GADE et al., 2022) and anti-oxidative agents (KIM et al., 2016).

Appropriate methods must be used when screening antioxidant properties of plants and their isolated compounds (GULCIN, 2020). *In vitro* methods such as evaluation through lipid peroxidation and the ability to scavenge free radicals can measure the antioxidant potential of plant extracts (MORALES; PAREDES, 2014). While the ABTS and DPPH tests can be considered mixed tests as they measure the transfer of an electron and a hydrogen atom, the FRAP test measures only the transfer of an electron (MUNTEANU; APETREI, 2021).

In methodologies that focus on the compound ability to reduce an oxidizing radical, the lower IC₅₀ value indicates a lower concentration required to reduce the DPPH or ABTS radical, therefore a greater antioxidant action (XUAN et al., 2018). *P. ovata* showed a higher antioxidant effect, with smaller IC₅₀, than other mistletoes such as *S. vulgaris* (Vell.) Mart. (VITTORAZZI et al., 2016), *Taxillus liquidambaricola* (Hayata) Hosok (DENG et al., 2011), and *P. capitata* (OHIKHENA; WINTOLA; AFOLAYAN, 2018).

In accordance with findings from the DPPH and ABTS methods, POH and its fractions demonstrated a similar antioxidant activity by FRAP method. The extracts with the lowest IC₅₀ in DPPH and ABTS assays showed the highest quantification in FRAP assay of Trolox equivalent, a vitamin E-analog with a high capacity to scavenge free radicals such as peroxy and alkoxy (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

In our test, the extract and fractions extracted by solvents with higher polarity (POH, FAE, and FW) had greater antioxidant effect than FHE, extracted with the nonpolar solvent hexane, which can be explained by the tendency of highly polar solvents to have higher antioxidant effect (ALTEMIMI et al., 2017).

The generation of ROS and oxidative stress can be directly associated with cancer, as cancer cells have high levels of ROS. Therefore, antioxidants can act as chemo preventive agents and adjuvants in breast cancer treatment (GRÑAN-LISON et al., 2021). Research relating mistletoe and cancer have a long history, with effects on breast cancer treatment in human patients by promoting increase on their quality of life when used as adjuvant with other drugs (TRÖGER et al., 2009).

In vitro models are fundamental for the study of new alternatives for cancer treatment acting as screening platforms for the validation of new therapeutic alternatives (ANTUNES et al., 2022). Other mistletoes have demonstrated inhibitory potentials against MCF7 cell line such as *V. album* (VLAD et al., 2016), *Dendrophthoe falcata*, (DASHORA et al., 2011), and *Macrosolen parasiticus* (L.) Danser (SODDE et al., 2015).

A low IC_{50} value against breast cancer cells, such as the one obtained with FHE, means that a compound is effective at low concentrations and, therefore, has less chances to induce systemic toxicity (BERROUET et al., 2020). In addition, the low cytotoxicity of FHE in fibroblasts, non-tumor cells, is an indication of a more selective action towards breast cancer cells.

Phenolic compounds were found in FHE after analysis by thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography. Phenolic compounds are a group represented by flavonoids, such as non-glycosylated flavonoids found in FHE, and phenolic acids, such quinic acid (CLIFFORD, 1999) and coumaric acid (BRAVO, 1998) found in FHE. These compounds can be associated with FHE antitumoral effect, as quinic acid can induce apoptosis in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines via B-cell lymphoma 2 (BCL-2) associated X protein (BAX), BCL2 associated agonist of cell death (BAX) and caspase 9 signaling pathway (ZHOU et al., 2020). Coumaric acid can also induce cytotoxicity in MDA-MB-231 cells through mechanisms involving mitochondrial membrane potential, apoptosis, damages in cell nucleus and regulation of ROS (MARIADOSS et al., 2021).

The greatest inhibitory power of FHE in breast cancer cell lines may be related to its higher content of flavonoids, as flavonoids present in mistletoe are largely responsible for their biological effects, including antitumor activity, and solvents that increase their extraction from these plants are preferable (MENKE et al., 2021).

The antioxidant action of FEA can be attributed to phenolic compounds found in the sample, such as phenolic acids (quinic acid, p-coumaric acid, and cinnamic derivatives) and flavonoids (flavonoid glucoside, pcatechin/epicatechin, and catechin-glucoside). The antioxidant effects of phenolic compounds involve electron transfer, hydrogen atom transfer or electron transfer by loss of several protons in sequence or through transition metal chelation (ZEB, 2020).

Flavonoids are considered excellent antioxidants, due to the hydroxyl groups present in their structure and the carbon and hydrogen bonds (VO et al., 2019), as these effects are associated with hydrogen donation mechanisms and promotion of radical changes or through electron transfer (GIL; COUTO, 2013), which were involved in our performed assays by DPPH, ABTS and FRAP.

5.CONCLUSIONS

Medicinal plants are a great source of new compounds than can lead to new paths in scientific research. Mistletoe is a group of plants used in traditional medicine for a long time, therefore, they are an important target in the search for new drugs. Our research on the mistletoe *Passovia ovata* provides new data on the therapeutic properties of this species that had not yet been explored. Our experiments and data analysis demonstrated that the leaf part of *P. ovata* has marked antioxidant action, low cytotoxicity for human fibroblasts and high inhibitory potential against human breast cancer cell lines. Thus, the antioxidant activity exhibited by *P. ovata*, associated with the significant flavonoid and phenolic compounds content, suggests a correlation with the cytotoxic effect on tumor cells. These findings introduce *P. ovata* as a potentially useful anti-cancer and antioxidant agent.

REFERENCES

ACÁCIO, R. D. S.; FRANCO, S. P. B.; COSTA FILHO, W. S.; COSTA, J. G.; SANTOS, A. F. DOS; SANTANA, H. G. Evaluation of the antioxidant activity of the ethanol extract of *Melochia tomentosa* Linnaeus (1735). **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 412-428, 2018.

AL-FARSI, M.; AL-AMRI, A.; AL-HADHRAMI, A.; AL-BELUSHI, S. Color, flavonoids, phenolics and antioxidants of Omani honey. **Heliyon**, v. 4, n. 10, p. e00874, 2018.

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D. G.; LIGHTFOOT, D.A. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 42, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants6040042>>.

ANTUNES, N.; KUNDU, B.; KUNDU, S. C.; REIS, R. L.; CORRELO, V. *In vitro* cancer models: a closer look at limitations on translation. **Bioengineering (Basel)**, v. 9, n. 4, p. 166, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/bioengineering9040166>>.

APAZA, T. L.; SERBAN, A. M.; CABANILLAS, A. H.; VILLACAMPA, A.; RUMBERO, A. Flavonoids of *Tripodanthus acutifolius* inhibit TNF- α production in LPS-activated THP-1 and B16-F10 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 242, p. 112036, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112036>>.

ARFIN, S.; JHA, N. K.; JHA, S. K.; KESARI, K. K.; RUOKOLAINEN, J.; ROYCHOUDHURY, S.; RATHI, B.; KUMAR, D. Oxidative stress in cancer cell metabolism. **Antioxidants**, v. 10, p. 642, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox10050642>>.

BAI, R.; GUO, J.; YE, X. Y.; XIE, Y.; XIE, T. Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 77, p. 101619, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101619>>.

BALIYAN, S.; MUKHERJEE, R.; PRIYADARSHINI, A.; VIBHUTI, A.; GUPTA, A.; PANDEY, R. P.; CHANG, C. M. Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1326, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules27041326>>.

BARZAMAN, K.; KARAMI, J.; ZAREI, Z.; HOSSEINZADEH, A.; KAZEMI, M. H.; MORADI-KALBOLANDI, S.; SAFARI, E.; FARAHMAND, L. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 106535, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>>.

BERROUET, C.; DORILAS, N.; REJNIAK, K. A.; TUNCER, N. Comparison of drug inhibitory effects in monolayer and spheroid cultures. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 82, n. 6, p. 68, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11538-020-00746-7>>.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CAIRES, C. S.; GOMES-BEZERRA, K. M.; MACHADO, A. F. P.; DETTKE, G. A. Nomenclatural novelties and synopsis of *Passovia* (Loranthaceae): new synonyms, new combinations and reinstated species. **Rodriguésia**, v. 72, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202172092>>.

CARTAGENES, M. S. S.; OLIVEIRA, M. A.; AMARAL, F. M. M.; RODRIGUES, M. S.; FREIRE, S. M. F.; LIMA, F. V. M.; SOUSA, A. A. S.; FRANCA, L. G. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcolólico das folhas de *Phthirusa paniculata* (Loranthaceae). **Revista Brasileira De Plantas Mediciniais**, v. 19, n. 2, p. 229-235, 2017.

CASTRO, A. O. Perfil químico e avaliação inibitória das enzimas α -amilase e α -glicosidase dos extratos de espécies de *Pthirusa* sp. parasita de *Syzygium cumini* (jambolão) e *Citrus* sp (limoeiro) - UFAM, 2019. Trabalho de conclusão de curso, 54 p.

CHEN, S. L.; YU, H.; LUO, H. M.; WU, Q.; LI, C.; STEINMETZ, A. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. **Chinese Medicine**, v. 11, p. 37, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13020-016-0108-7>>.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362- 372, 1999.

DASHORA, N.; SODDE, V.; PRABHU, K.; LOBO, R. *In vitro* cytotoxic activity of *Dendrophthoe falcata* on human breast adenocarcinoma cells-MCF-7. **International Journal of Cancer Research**, v. 7, p. 47-54, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/2011.10.3923/ijcr.2011.47.54>>.

DENG, J. S.; CHI, C. S.; HUANG, S. S.; SHIE, P. H.; LIN, T. H.; HUANG, G. J. Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1161-1171, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.041>>.

DEVKOTA, M. Biology of mistletoes and their status in Nepal Himalaya. **Himalayan Journal of Sciences**, v. 3, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.3126/hjs.v3i5.467>>.

FERNANDES, R. P.; TRINDADE, M. A.; TONIN, F. G.; LIMA, C. G.; PUGINE, S. M.; MUNEKATA, P. E.; LORENZO, J. M.; DE MELO, M. P. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 451-460, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-015-1994-x>>.

FRITZ, P.; DIPPON, J.; MÜLLER, S.; GOLETZ, S.; TRAUTMANN, C.; PAPPAS, X.; OTT, G.; BRAUCH, H.; SCHWAB, M.; WINTER, S.; MÜRDTER, T.; BRINKMANN, F.; FAISST, S.; RÖSSLE, S.; GERTEIS, A.; FRIEDEL, G. Is Mistletoe treatment beneficial in

invasive breast cancer? a new approach to an unresolved problem. **Anticancer Research**, v. 38, n. 3, p. 1585-1593, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.21873/anticancer.12388>>.

GADE, I. S.; CHADENEAU, C.; RICHARD, T. S.; ATCHADE, A. T.; TALLA, E.; SEITE, P.; VANNIER, B.; GUILLARD, J.; LAURENT, S.; HENOUMONT, C.; NWABO KAMDJE, A. H.; MULLER, J. M. A new flavonoid glycoside from *Tapinanthus* sp. (Loranthaceae) and evaluation of anticancer activity of extract and some isolated

compounds. **Natural Product Research**, v. 36, n.16, p. 4085-4093, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1963243>>.

GIL, E. S.; COUTO, R. O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000031>>.

GRIÑAN-LISON, C.; BLAYA-CÁNOVAS, J. L.; LÓPEZ-TEJADA, A.; ÁVALOS-MORENO, M.; NAVARRO-OCÓN, A.; CARA, F. E.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A.; LORENTE, J. A.; MARCHAL, J. A.; GRANADOS-PRINCIPAL, S. Antioxidants for the treatment of breast cancer: are we there yet? **Antioxidants (Basel)**, v. 10, n. 2, p. 205, 2021. Disponível em: <[10.3390/antiox10020205](https://doi.org/10.3390/antiox10020205)>.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020. Disponível em: <[10.1007/s00204-020-02689-3](https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3)>.

HAYOUNI, E.A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, H. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1126-1134, 2007.

HE, D.; WANG, Z.; YANG, L.; LIU, T.; YAO, Y.; MAO, Z. Modeling and optimization of the drug extraction production process. **Scientific Programming**, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2016/3279423>>.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf030723c>>.

IRSHAD, M.; ZAFARYAB, M.; SINGH, M.; RIZVI, M. M. comparative analysis of the antioxidant activity of *Cassia fistula* extracts. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2012, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2012/157125>>.

JUNG, S. H.; KIM, J.; EUM, J.; CHOE, J. W.; KIM, H. H.; KEE, Y.; LEE, K. Velutin, an aglycone extracted from Korean mistletoe, with improved inhibitory activity against melanin biosynthesis. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2549, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules24142549>>.

KATSURA, C.; OGUNMWONYI, I.; KANKAM, H. K.; SAHA, S. Breast cancer: presentation, investigation and management. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 83, n. 2, p. 1-7, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.12968/hmed.2021.0459>>.

KATTOOR, A. J.; POTHINENI, N. V. K.; PALAGIRI, D.; MEHTA, J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 11, p. 42, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>>.

KIM, S. Y.; YANG, E. J.; SON, Y. K.; YEO, J. H.; SONG, K. S. Enhanced anti-oxidative effect of fermented Korean mistletoe is originated from an increase in the contents of caffeic acid and lyoniresinol. **Food & Function**, v. 7, n. 5, p. 2270-2277, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c6fo00138f>>.

KUIJT, J. Pulling the skeleton out of the closet: resurrection of *Phthirusa sensu Martius* and consequent revival of *Passovia* (Loranthaceae). **Plant Diversity and Evolution**, v. 129, p.159-211, 2011.

LUC, K.; SCHRAMM-LUC, A.; GUZIK, T. J.; MIKOLAJCZYK, T. P. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 70, n. 6, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01>>.

MARIADOSS, A.V.A.; SARAVANAKUMAR, K.; SATHIYASEELAN, A.; KARTHIKKUMAR, V.; WANG, M. H. Smart drug delivery of p-Coumaric acid loaded aptamer conjugated starch nanoparticles for effective triple-negative breast cancer therapy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 195, p. 22-29, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.170>>.

MEERA, I.; CHV, S.; SISAY, T. A 96 well-microtiter plate ABTS based assay for estimation of antioxidant activity in green leafy vegetables. **Biotechnology International**, v. 12, n. 2, p. 22-29, 2019.

MENKE, K.; SCHWERMER, M.; EISENBRAUN, J.; SCHRAMM, A.; ZUZAK, T.J. Anticancer effects of *Viscum album* fraxini extract on medulloblastoma cells *in vitro*. **Complementary Medicine Research**, v. 28, p. 15-22, 2021.

MORALES, G.; PAREDES, A. Antioxidant activities of *Lampaya medicinalis* extracts and their main chemical constituents. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 14, p. 259, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-259>>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 56, p. 55-63, 1983.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3380, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms22073380>>.

NAWAZ, H.; SHAD, M. A.; REHMAN, N.; ANDALEEB, H.; ULLAH, N. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000417129>>.

OHIKHENA, F. U.; WINTOLA, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Quantitative phytochemical constituents and antioxidant activities of the mistletoe, *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle extracted with different solvents. **Pharmacognosy Research**, v. 10, n. 1, p. 16-23, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/pr.pr6517>>.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-15, 2016.

PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. Antioxidant capacity of hops. In: Beer in health and disease prevention. Elsevier Inc. Academic Press, 2009. p. 467-474.

QI, J. H.; DONG, F. X. The relevant targets of anti-oxidative stress: a review. **Journal of Drug Targeting**, v. 29, n. 7, p. 677-686, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1870987>>.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

REZAIIE, M., FARHOOSH, R., IRANSHAHI, M., SHARIF, A.; GOLMOHAMADZADEH, S. Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. **Food Chemistry**, v. 173, p. 577-583, 2015.

ROSTOCK, M. Mistletoe in the treatment of cancer patients. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, v. 63, n. 5, p. 535-540, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00103-020-03122-x>>.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; MORAIS, S. M. DE; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-COLIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Comunicado Técnico Embrapa 125, 2006. p.1-4.

SCALON, M. C.; ROSSATTO, D. R.; FRANCO, A. C. "How does mistletoe infection affect seasonal physiological responses of hosts with different leaf phenology?". **Flora**, v. 281, p. 151871, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151871>>.

SODDE, V. K.; LOBO, R.; KUMAR, N.; MAHESHWARI, R.; SHREEDHARA, C. S. Cytotoxic activity of *Macrosolen parasiticus* (L.) Danser on the growth of breast cancer cell line (MCF-7). **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, p. 156-160, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/0973-1296.157719>>.

TESFAYE, B. A.; BERHE, A. H.; WONDAFRASH, D. Z.; BERHE, D. F. Cardioprotective effect of crude extract and solvent fractions of *Urtica simensis* leaves on cyclophosphamide-induced myocardial injury in rats. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 13, p. 147-160, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/JEP.S270038>>.

TRÖGER, W.; JEZDIĆ, S.; ZDRALE, Z.; TIŠMA, N.; HAMRE, H. J.; MATIJAŠEVIĆ, M. Quality of life and neutropenia in patients with early stage breast cancer: a randomized pilot study comparing additional treatment with mistletoe extract to chemotherapy alone. **Breast Cancer (Auckl)**, v. 3, p. 35-45, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.4137/bcbr.s2905>>.

VALLEJO, M. J.; SALAZAR, L.; GRIJALVA, M. Oxidative stress modulation and ROS-mediated toxicity in cancer: a review on *in vitro* models for plant-derived compounds. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2017/4586068>>.

VIEIRA, O. M. C.; SANTOS, M. H.; SILVA, G. A.; SIQUEIRA, A. M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 149-154, 2005.

VITTORAZZI, C.; ENDRINGER, D. C.; ANDRADE, T. U.; SCHERER, R.; FRONZA, M. Antioxidant, antimicrobial and wound healing properties of *Struthanthus vulgaris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 2, p. 331-337, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1040515>>.

VLAD, D. C.; POPESCU, R.; DUMITRASCU, V.; CIMPORESCU, A.; VLAD, C. S.; VÁGVÖLGYI, C.; KRISCH, J.; DEHELEAN, C.; HORHAT, F.L. Phytocomponents identification in mistletoe (*Viscum album*) young leaves and branches, by GC-MS and antiproliferative effect on HEPG2 and MCF7 cell lines. **Farmacia**, v. 64, p. 82-87, 2016.

VO, Q. V.; NAM, P. C.; THONG, N. M.; TRUNG, N. T.; PHAN, C. D.; MECHLER, A. Antioxidant motifs in flavonoids: O-H versus C-H Bond Dissociation. **ACS Omega**, v. 4, n. 5, p. 8935-8942, 2019 Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00677>>.

WILSON, C.; CALVIN, C. L. An origin of aerial branch parasitism in the mistletoe family, Loranthaceae. **American Journal Of Botany**, v. 93, p. 787-96, 2006.

XUAN, T. D.; RONI, Y.; ANDRIANA, Y.; KHANH, T. D.; ANH, T.T.T.; KAKAR, K.; HAQANI, M. S. Chemical profile, antioxidant activities and allelopathic potential of liquid waste from germinated brown rice. **Allelopathy Journal**, v. 45, n. 1, 2018.

ZARKOVIC, N. Roles and functions of ROS and RNS in cellular physiology and pathology. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 767, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cells9030767>>.

ZEB, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. e13394, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>>.

ZHOU, Y.; FU, X.; GUAN, Y.; GONG, M.; HE, K.; HUANG, B. 1,3-Dicaffeoylquinic acid targeting 14-3-3 tau suppresses human breast cancer cell proliferation and metastasis through IL6/JAK2/PI3K pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 172, p. 113752, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113752>>.