



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

ANA LETÍCIA MARINHO FIGUEIRÊDO

**EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE
Passovia ovata E SUA AÇÃO SOBRE A CITOTOXICIDADE E
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS RAW 264.7**

São Luís – MA

2022



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

ANA LETÍCIA MARINHO FIGUEIRÊDO

**EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE
Passovia ovata E SUA AÇÃO SOBRE A CITOTOXICIDADE E
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS RAW 264.7**

Trabalho de monografia apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Ciências Agrárias

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Lucia Abreu Silva

São Luís – MA

2022

Figueiredo, Ana Letícia Marinho.

Efeito antioxidante do extrato hidroetanólico de *Passovia ovata* e sua ação sobre a toxicidade e produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 / Ana Letícia Marinho Figueiredo. – São Luís, 2022.

58 f

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva.

1.Erva-de-passarinho. 2.Flavonoides. 3.Antioxidantes. 4.Nitrito. I.Título.

CDU: 615.322

ANA LETÍCIA MARINHO FIGUEIRÊDO

EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Passovia ovata* E
SUA AÇÃO SOBRE A CITOTOXICIDADE E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM
MACRÓFAGOS RAW 264.7

Trabalho de monografia apresentado ao curso de
Medicina Veterinária da Universidade Estadual do
Maranhão, como requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Medicina Veterinária.
Área de concentração: Ciências Agrárias

APROVADO EM: 11 de julho de 2022

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a Ana Lucia Abreu Silva
Orientadora
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



Me. Allana Freitas Barros
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



Me. Isadora de Fátima Braga Magalhães
Universidade Federal Fluminense (UFF)

*Este trabalho é dedicado aos meus avós:
Maria da Penha Lima Figueirêdo, João
Batista Lima Figueirêdo, Maria do Carmo
Gama e Justo Freitas Marinho. A vocês
dedico quem sou e quem ainda serei.
Obrigada pela nossa família, minha maior
dádiva.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Deus, mãe natureza, força maior que me guia e sempre coloca em meu caminho os melhores suportes que eu poderei ter. A Tua presença se faz através de cada mínimo detalhe e de cada ser com quem tenho o prazer de partilhar.

Agradeço aos meus pais, Maria da Graça Gama Marinho e Marcelo Henrique Lima Figueirêdo pelo apoio incondicional, por nunca terem medido esforços e acreditarem em mim, muitas vezes mais do que eu mesma. Aos meus irmãos, Ana Alícia Marinho Honorato, Marianna Melo Figueirêdo, João Victor Marinho Figueirêdo e Carlos Henrique Melo Figueirêdo pelo companheirismo e aventuras, vocês são partes de mim.

Agradeço aos meus avós, Maria da Penha Lima Figueirêdo, João Batista Lima Figueirêdo, Justo Freitas Marinho e Maria do Carmo Gama. João, Justo e Maria consigo sentir as mãos de vocês hoje sobre mim, continuem me olhando de onde estiverem. Vó Penha, a senhora é meu orgulho, meu exemplo e minha força.

Agradeço a minha boadrasta Carla Rejane Melo por ser uma pessoa tão iluminada que sempre nos acolhe com amor e ternura. A todos os meus demais familiares, seja de sangue ou de alma. Vocês são os melhores que eu poderia ter e eu não seria nada sem vocês.

Agradeço aos meus anjos de luz, Nayara Kelly Monteiro Figueirêdo, Kamila Cristina Martins da Silva e Fernanda Dyllan Garcia Santos por exercerem a melhor parceria e me aturarem nos dias que nem eu aturo.

Agradeço aos presentes da veterinária, Suelem Maria Araujo Pereira por sempre me fazer querer ser uma pessoa melhor e trazer ternura aos meus dias, meu diploma é mais teu que meu. Amanda da Silva Gomes, Elaine Farias Dias, Maryanne Karinne Rêgo, Leandra Patrícia Almeida e Nelson Costa Pinheiro por todos os dias partilhados e que vocês tornaram mais fáceis.

Agradeço aos meus parceiros de laboratório e grandes aventuras, Leonardo Costa Rocha, uma das melhores e mais puras pessoas que já conheci. Allana Carvalho Guedes, responsável por parte desse trabalho. Clarissa Costa Sousa, Wendel Moreira, Sandra Alves, Adryan Batalha, Rafael Costa, Elizeu Mendes e todos os demais que me ajudam nessa caminhada científica.

Agradeço a Aldilene da Silva Lima, Claudia Quintino da Rocha e todos os integrantes do laboratório de química da UFMA por toda ajuda e apoio durante a realização de parte da metodologia desse trabalho.

Agradeço a Prof^a Ana Lucia Abreu Silva por todas as oportunidades, ensinamentos e confiança. A senhora contribuiu muito para meu crescimento profissional e pessoal. Ao Prof^o Fábio Henrique Evangelista pelo conhecimento e puxões de orelha na hora certa. Allana Freitas Barros por sempre estar disponível como amiga, conselheira e ter aceitado fazer parte da banca. Isadora de Fátima Braga Magalhães por ter sido a primeira a acreditar em mim lá no começo e continuar segurando minha mão até aqui de forma compreensiva e acolhedora.

Agradeço a todos que estiveram comigo nessa caminhada, vocês contribuem para meu desenvolvimento e têm mérito direto nos meus resultados. A todos os professores, trabalhadores e pessoas que fazem essa Universidade funcionar, meu mais profundo respeito.

E por fim, aos meus filhos Feijão, Nissin e Lupita, por me ensinarem todos os dias uma forma tão pura de amor que só os animais conseguem transmitir. Agradeço ao ciclo natural e todas as espécies por se alinharem constantemente e permitirem que hoje eu esteja aqui.

“Felicidade é saber e compreender que tudo está se transformando e que somos um elemento nessa transformação.”

(Monja Coen)

RESUMO

Das diversas famílias exploradas com finalidades farmacológicas, podemos destacar Loranthaceae, plantas hemiparasitas de árvores frutíferas e conhecidas como erva-de-passarinho. Considerando a distribuição e identificação de *Passovia ovata* dentre as ervas-de-passarinho utilizadas popularmente para uma série de finalidades, faz-se necessário o estudo e padronização do seu extrato, dando ênfase para análise da composição, ação farmacológica e de sua viabilidade. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito antioxidante do extrato hidroetanólico de *P. ovata*, sua ação citotóxica e quantificar produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). As folhas de *P. ovata* foram coletados na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão- UEMA, localizada na cidade de São Luís- MA. O extrato hidroetanólico (EHE) à 70% foi obtido por maceração durante um período de doze dias. De 750 gramas do material vegetal triturado, pôde-se obter 200g de EHE de *P. ovata* seco, o que lhe conferiu rendimento percentual de 26,6%. Nos ensaios fotoquímicos qualitativos foram encontrados antraquinonas, taninos, catequinas, flavanonas e flavonóis. O teor de flavonoides totais obtido foi de 4,44 mgEQ/g. Na determinação da atividade antioxidante por DPPH e ABTS foram encontrados valores de IC₅₀ correspondentes a 15,38 µg/mL e 62,72 µg/mL, respectivamente. Já na determinação por FRAP, obteve-se um poder redutor de 3488,24 µmolET/g. Ao avaliar a citotoxicidade nas diferentes concentrações testadas após um período de incubação 24 e 48 horas, não foi possível observar diferença significativa entre as células não tratadas e as tratadas. Na dosagem de nitrito dos grupos tratados com 125 e 250µg/mL do EHE de *P. ovata* não houve diferença estatística quando comparados ao grupo estimulado por LPS, mas não tratado. Já o grupo tratado com concentração de 500µg/mL do extrato apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle positivo, apenas estimulado por LPS. Assim, os resultados indicam que o EHE de *P. ovata* tem atividade antioxidante, baixa citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, além de ser capaz de inibir a produção de óxido nítrico nestas células ao serem estimuladas por LPS.

Palavras-chave: erva-de-passarinho, flavonoides, antioxidantes, nitrito

ABSTRACT

Several families are explored for pharmacological purposes, we can highlight Loranthaceae, composed of hemiparasites of fruit trees, better known as mistletoe. Considering the distribution and identification of *Passovia ovata* among the mistletoes popularly used for a series of purposes, it is necessary to study and standardize its extract, emphasizing the analysis of its composition, pharmacological action and its viability. The aim of the study was to evaluate the antioxidant effect of the hydroethanolic extract of *P. ovata*, its cytotoxic action and to quantify nitrite production in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS). *Passovia ovata* leaves were collected at the school farm of the State University of Maranhão- UEMA, located in the city of São Luís- MA. The 70% hydroethanolic extract (EHE) of *P.ovata* was obtained by maceration during a period of twelve days. From 750g of ground plant material, 200g of dry *P. ovata* EHE could be obtained, which gave it a percentage yield of 26.6%. In qualitative photochemical assays, anthraquinones, tannins, catechins, flavanones and flavonols were found. The total flavonoid content was 4.44 mgEQ/g. In the determination of antioxidant activity by DPPH and ABTS, IC₅₀ values were 15.38 µg/mL and 62.72 µg/mL, respectively. In the determination by FRAP, a reducing power of 3488.24 µmolET/g was obtained. When evaluating the cytotoxicity at the different concentrations tested after an incubation period of 24 and 48 hours, it was not possible to observe a significant difference between untreated and treated cells. In the nitrite dosage of the groups treated with 125 and 250µg/mL of *P. ovata* EHE there was no statistical difference when compared to the group stimulated by LPS, but not treated. The group treated with a concentration of 500µg/mL of the extract showed a statistical difference when compared to the positive control group, only stimulated by LPS. Thus, the results indicate that EHE from *P. ovata* has antioxidant activity, low cytotoxicity on RAW 264.7 macrophages, and was able to inhibit the production of nitric oxide in these cells when stimulated with LPS.

Key-words: mistletoe, flavonoids, antioxidants, nitrite

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Planta <i>P. ovata</i> encontrada em mangueira na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão. (B) Amostra vegetal de <i>P. ovata</i> coletada. (C) Parte aérea de <i>P. ovata</i> utilizada para preparo do extrato.....	28
Figura 2: Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato hidroetanólico de <i>P. ovata</i>	37
Figura 3: Curva de Calibração de Quercetina.....	40
Figura 4: Curva padrão de Trolox para o teste DPPH.....	41
Figura 5: Curva padrão de Trolox para o teste ABTS.....	43
Figura 6: Curva de calibração de Trolox para FRAP.....	44
Figura 7: Quantificação de nitrito em sobrenadante de cultura de células RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações de EHE de <i>P. ovata</i> ou dexametasona (100 µM) e estimulados por LPS (10µg/mL) por 48 horas. #p<0,001 quando comparado com grupo não tratado e não estimulado; **p<0,05 ***p<0,01 quando comparado com o grupo estimulado com LPS, após teste de Kruskal-Wallis e análise de comparação múltipla de Dunn.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros para identificação qualitativa de antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.....	31
Tabela 2: Identificação de metabólitos secundários presentes no extrato hidroetanólico de <i>P. ovata</i> segundo método de Costa (1994) e Matos (1997)	38
Tabela 3. Valores de IC ₅₀ obtidos de diferentes concentrações testadas do EHE de <i>P. ovata</i> após um período de incubação de 24 e 48 horas.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- TNF α - Tumour necrosis factor α (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
- LPS - Lipopolissacarídeo
- DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
- ABTS - 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
- FRAP - Ferric Reducing Ability of Plasma (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)
- ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância e Sanitária
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- SUS - Sistema Único de Saúde
- PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
- RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS
- APCs - Células Apresentadoras de Antígenos
- iNOS - Inducible Nitric Oxide Synthase (Enzima Óxido Nítrico Sintetase)
- DNA - DeoxyriboNucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
- UEMA - Universidade Estadual do Maranhão
- EHE - Extrato Hidroetanólico
- HPCL - High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
- PDA - Photodiode array (Fotodiodo)
- NaOH - Hidróxido de sódio
- pH - Potencial Hidrogeniônico
- AlCl₃ - Aluminium chloride (Cloreto de alumínio)
- ABTS⁺ - radical catiônico do ABTS
- TPTZ - 4,4',6-Tripyridyl-S-Triazine
- HCl - Ácido clorídrico
- FeCl₃ - Cloreto de ferro (III)
- RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute 1640
- SFB - Soro Fetal Bovino
- PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato
- CO₂ - Dióxido de carbono
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- IC₅₀ - Concentração inibitória capaz de reduzir em 50%
- H₃PO₄ - Ácido fosfórico

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

NaNO₂ - Nitrito de sódio

ANOVA - Análise da Variância

NADPH - Reduced nicotinamide adenine dinucleotide, phosphate (Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida)

TLR4 - Toll-like receptor 4 (Receptor do tipo Toll 4)

IFN- γ - Interferon-gama

IL-10 - Interleucina 10

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Geral.....	18
2.2	Específicos	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	O uso de plantas medicinais e seus conceitos	19
3.2	Fitoterapia no contexto brasileiro	20
3.3	Família Loranthaceae e o gênero <i>Passovia</i> H. Karst	22
3.4	O processo inflamatório e seus mediadores	23
3.5	Importância dos antioxidantes na ação anti-inflamatória	26
4	METODOLOGIA	28
4.1	Obtenção e padronização do derivado vegetal.....	28
4.1.1	Coleta e identificação botânica	28
4.1.2	Pesagem e higienização da amostra para preparação do extrato hidroetanólico	29
4.1.3	Secagem, trituração da amostra e obtenção do extrato hidroetanólico	29
4.2	Caracterização fitoquímica do extrato hidroetanólico de <i>P. ovata</i>	29
4.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPCL)	29
4.2.2	Ensaios fitoquímicos qualitativos	30
4.2.3	Quantificação de flavonoides.....	32
4.3	Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de <i>P. ovata</i>	32
4.3.1	Determinação da atividade antioxidante por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	32
4.3.2	Determinação da atividade antioxidante por ABTS	32
4.3.3	Determinação da atividade antioxidante pelo método de Redução do Ferro (FRAP).....	33
4.4	Cultivo celular de macrófagos RAW 264.7	33
4.5	Citotoxicidade do extrato hidroetanólico de <i>P. ovata</i> em macrófagos RAW 264.7.....	34
4.6	Quantificação de nitrito em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS	34
4.7	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Caracterização da planta e derivado vegetal	36
5.2	Propriedades fitoquímicas.....	36
5.2.1	Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPCL)	36
5.2.2	Análises fitoquímicas qualitativas	37

5.2.3	Quantificação de flavonoides.....	40
5.3	Capacidade antioxidante do extrato hidroetanólico de <i>P. ovata</i>	41
5.3.1	Determinação da atividade antioxidante por DPPH	41
5.3.2	Determinação da atividade antioxidante por ABTS	42
5.3.4	Determinação da atividade antioxidante por FRAP.....	43
5.4	Citotoxicidade do extrato hidroetanólico de <i>P. ovata</i> em macrófagos RAW 264.7.....	44
5.5	Determinação da produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS	45
6	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO	58

1 INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória é um mecanismo fisiológico complexo, em que o organismo tenta se defender de danos celulares gerados por um agente agressor (GRIVENNIKOV et al., 2010) e tem como principal objetivo garantir o restabelecimento da homeostase (RIOS et al., 2009). Entretanto, em alguns casos, quando há desequilíbrio na regulação do processo inflamatório, este pode assumir um caráter prejudicial e agir de forma até mais agressiva que o próprio flogógeno (SCHMID e BRÜNE, 2021).

Os efeitos da inflamação podem ser reduzidos ou eliminados, utilizando-se tratamentos farmacológicos. Os produtos naturais estão entre os mais usados, devido à crença de serem mais biocompatíveis e apresentarem menor toxicidade, além de terem custos mais acessíveis à população (FRANCISCO et al., 2010).

As plantas medicinais são muito utilizadas nas comunidades tradicionais de modo empírico e esse uso compreende uma forma de atendimento primário à saúde que pode complementar o tratamento com drogas alopáticas, principalmente em população de menor renda (MACHADO et al., 2014). Os produtos naturais oriundos de plantas são usados para diversos fins terapêuticos e dentre eles destaca-se o efeito anti-inflamatório (LI et al., 2020).

Atrelada a essa ação anti-inflamatória também está a atividade antioxidante, diretamente relacionada aos metabólitos secundários presentes nos vegetais, que são capazes de neutralizar a formação de radicais livres e consequentemente o desenvolvimento do estresse oxidativo (WALTER e MARCHESAN, 2011).

Das diversas famílias exploradas com finalidades farmacológicas, podemos destacar Loranthaceae, composta por hemiparasitas de árvores frutíferas, mais conhecidas como erva-de-passarinho. Na medicina popular são utilizadas principalmente em afecções das vias respiratórias, como anti-inflamatório e na limpeza de feridas cutâneas (VIEIRA, 2005). No Brasil, mais especificamente na região Nordeste, os gêneros mais encontrados são *Passovia*, *Psittacanthus* Mart. e *Struthanthus* Mart. O gênero *Struthanthus* tem 60 espécies descritas, o gênero *Psittacanthus* tem quarenta e duas espécies e o gênero *Passovia* quatorze espécies (KUIJT, 2011).

Algumas espécies da família foram pesquisadas para a identificação dos compostos químicos responsáveis pela ação terapêutica. Marques et al. (2017) usando o extrato etanólico de folhas de *Struthanthus vulgaris*, observaram a diminuição significativa da produção de óxido nítrico e redução dos níveis de TNF α (fator de necrose tumoral alfa) em macrófagos, o que

mostra que esse extrato tem efeito imunomodulador. Além disso, observaram ausência de efeito citotóxico nas células tratadas, o que indica que este pode ser usado de forma segura.

Já Bezerra et al. (2016), relatam que o extrato aquoso de *Psittacanthus plagiophyllus* suprimiu a formação do edema de pata induzido em ratos, reduziu o recrutamento de leucócitos totais e de neutrófilos, e apresentou ainda alta capacidade antioxidante *in vitro*, o que indica um potencial de ação anti-inflamatório.

Apesar de diversos trabalhos atribuírem às espécies de erva-de-passarinho uma série de ações que podem contribuir na terapia de doenças, ainda há carência de bases científicas a respeito de alguns grupos da família. A exemplo disso temos *Passovia ovata*, uma das espécies mais encontradas no cerrado brasileiro (SCALON et al., 2016) e que não possui fontes de dados relacionados ao seu estudo fitoquímico e farmacológico publicados.

Diante desse contexto, considerando a distribuição e identificação de *P. ovata* dentre as ervas-de-passarinho utilizadas popularmente para uma série de finalidades, faz-se necessário o estudo e padronização do seu extrato, dando ênfase para análise da composição, ação farmacológica e de sua viabilidade. O desenvolvimento de tais pesquisas possibilita assegurar maior uniformidade e constância para o extrato, além de auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos em sua ação antioxidante e anti-inflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito antioxidante do extrato hidroetanólico (EHE) de *Passovia ovata*, sua ação citotóxica e quantificar produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS).

2.2 Específicos

- Desenvolver ensaios fitoquímicos qualitativos do EHE de *P. ovata*;
- Quantificar flavonoides presentes no EHE de *P. ovata*;
- Avaliar a atividade antioxidante do EHE de *P. ovata* através das metodologias de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS) e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP);
- Analisar a atividade citotóxica de diferentes concentrações do EHE de *P. ovata* sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS;
- Determinar as concentrações de nitrito em sobrenadantes de cultura de macrófagos RAW 264.7 tratados com o EHE de *P. ovata*;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O uso de plantas medicinais e seus conceitos

Devido a constante busca por recursos alternativos naturais que permitam melhorias na qualidade de vida das pessoas, o uso de plantas com propriedades medicinais é uma das formas mais antigas empregadas no tratamento, prevenção e cura de doenças (KUNLE et al., 2012; QURESH et al., 2016). Seja em forma de chás, sucos, compressas, infusões ou xaropes, estudos apontam que cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta em busca do alívio para sintomas de enfermidades e na maioria das vezes o remédio consumido é produzido de forma caseira (ZENI et al., 2017; BRAGA et al., 2021).

Ao longo da história, o uso terapêutico de plantas baseou-se no conhecimento empírico adquirido por homens e mulheres, que partilhavam experiências (OLIVEIRA et al., 2006). Apesar do surgimento da indústria farmacêutica durante a última metade do século 19 ter reduzido o interesse no uso de produtos de origem vegetal de forma mais tradicional, estes nunca deixaram de simbolizar por diversas vezes o único recurso terapêutico de muitos grupos e comunidades (LUIZ, 1997; KUNLE et al., 2012).

A prática de utilizar plantas medicinais e fitoterápicos é mundialmente disseminada e isso se deve a uma série de fatores, como a predileção por terapêuticas consideradas mais naturais, reações adversas desencadeadas pelo uso de algumas drogas sintéticas, assim como a dificuldade de acesso que alguns possuem em relação a estas, o difícil tratamento de algumas doenças e/ou a confiança de que medicamentos obtidos de modo natural não oferecem riscos (PANDEY e TRIPATHI, 2014). Sendo assim, conforme Tôres et al. (2005) ressaltaram, a ideia de que as plantas medicinais usadas intuitivamente pela população são inofensivas é no mínimo perigosa.

Deve-se considerar que mesmo com o uso prolongado pela população, somente essa prática não é suficiente para qualificar um medicamento como seguro e eficaz. É de suma importância o desenvolvimento de pesquisas científicas, explorando estudos da composição, ação farmacológica e alinhamento de todas as informações sobre execuções terapêuticas, assim como o conhecimento e a distinção dos termos relacionados estabelecidos, que por diversas vezes são erroneamente empregados (HENRIQUE et al., 2014).

De acordo com o expresso pela RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, da ANVISA, o conceito de droga vegetal consiste na planta medicinal ou componentes dela que possuam substâncias responsáveis por uma ação terapêutica, após ter passado pelos processos de coleta e secagem. Já ao utilizar o termo derivado vegetal, refere-se ao produto proveniente da extração

da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, que contenha substâncias responsáveis pela ação terapêutica. Este poderá ser obtido de diversos modos, destacando-se como principais os extratos vegetais, óleos voláteis, óleos fixos e as ceras. Ao citar-se matéria-prima, pode-se compreender tanto a droga vegetal, como o derivado ou a planta medicinal ainda fresca (BRASIL, 2014a).

Os extratos vegetais são obtidos a partir do material vegetal e através de métodos já padronizados, como a maceração, percolação e a decocção, adicionando-se solventes como álcool etílico, metanol, água ou aquele que apresentar melhores características extratoras. O resultado do processo poderá se apresentar de maneira fluida, sólida ou intermediária e sua forma final, comumente empregada para obtenção de formas farmacêuticas, é o extrato vegetal seco, atingido por eliminação do solvente usado na preparação (BRASIL, 2010).

Outro termo muito empregado e de importância é o fitoterápico, que segundo a ANVISA, equivale a qualquer produto derivado de planta medicinal, utilizado para fins curativos ou paliativos, seja este manipulado, industrializado ou produzido de modo caseiro. Sendo imprescindível ressaltar que os fitoterápicos só podem ser constituídos de matérias-primas ativas vegetais, podendo ser tanto a droga vegetal como um derivado vegetal (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2014b).

3.2 Fitoterapia no contexto brasileiro

A utilização popular de plantas medicinais como coadjuvantes no tratamento de várias doenças, despertou interesse pelo estudo da fitoterapia que passou a ascender dentre as pesquisas científicas. Desse modo, atualmente sua utilização é uma prática disseminada no mundo inteiro, sendo encorajada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), principalmente nos países em desenvolvimento (MATTOS et al., 2018).

Entre estes, o Brasil se destaca por conter em seu território a maior parcela da biodiversidade mundial, aproximadamente de 15 a 20%, característica que aporta práticas integrativas e complementares no cuidado à saúde provenientes de seus recursos naturais. O uso de produtos mais naturais também se destaca no cenário brasileiro por oferecerem menores custos e possuírem maior facilidade de obtenção, podendo atender um número mais abrangente de usuários (DUTRA et al., 2016).

Contudo, durante muito tempo, a produção de fitoterápicos foi negligenciada no território nacional, o que acabou resultando em produtos sem atualização técnica e pouco confiáveis. Somente na década de 90, os órgãos oficiais passaram a impor maior rigor na

produção de fitoterápicos por meio de normatizações exclusivas para essa finalidade. Na atualidade, a legislação brasileira os considera como medicamentos e, de tal modo, assegura que tenham qualidade suficiente para uma eficácia e segurança controladas e constantes (HENRIQUE et al., 2014).

A fim de certificar essa efetividade, o Ministério da Saúde desenvolveu uma série de estratégias que promoveram estímulo à prática e utilização de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema de Saúde Única (SUS). Em 2006, foi lançada a Portaria N° 971 de 3 de maio de 2006 que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), oferecendo aos usuários do SUS a fitoterapia como prática auxiliar em variados tratamentos (BRASIL, 2006a). Logo após também foram criadas a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006b; BRASIL, 2009a). Já em 2009, foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), contendo cerca de 71 plantas registradas (BRASIL, 2009b).

Atrelado a esse crescente incentivo do uso da fitoterapia em diversos setores de promoção à saúde única, houve o conseqüente avanço na produção e comercialização da sua matéria prima (MATTOS et al., 2018). Dentre os diversos fitoterápicos comercializados em todo país, vários compreendem extratos padronizados, tais como o extrato de *Achillea millefolium* (DALL'ACQUA et al., 2011), *Ginkgo biloba* L. (MOHANTA et al., 2014), *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, *Mikania glomerata* Sprengel (DELLA PASQUA et al., 2019), *Calendula officinalis* L. e *Carapa guianensis* (BORELLA e CARVALHO, 2011; HENRIQUES et al., 2014).

Sabe-se que a padronização de um extrato vegetal pode ser alcançada de dois modos: a partir da concentração de um constituinte ou grupo responsável pela atividade terapêutica da planta, sendo em parte das vezes mais vantajoso que o uso desta inteira; ou baseando-se na presença de um certo percentual de compostos que acabam não sendo indicadores da atividade farmacológica do fitoterápico (KUNLE et al., 2012). A vantagem dessa padronização é permitir uniformidade e estabilidade dos princípios ativos existentes, assim como possibilitar o melhor rendimento do processo extrativo e desse modo, oferecer um produto mais eficaz, confiável, de qualidade e rentável (BEZERRA et al., 2016).

Todavia, essa padronização não é um procedimento simples, já que uma série de fatores bióticos e abióticos podem vir a interferir nos teores dos compostos bioativos e, conseqüentemente, em todas essas vantagens (GARG et al., 2012). Com isso, fica evidente a

importância do desenvolvimento de pesquisas farmacológicas e fitoquímicas aprofundadas na produção de extratos vegetais padronizados.

Dentre as famílias botânicas com potencial terapêutico, mas pouco exploradas quando tratando-se do controle de qualidade, pode-se destacar a Loranthaceae, por diversas vezes citada em levantamentos etnomedicinais no mundo, na qual se inclui a espécie explorada deste trabalho (PATEL e PANDA, 2014).

3.3 Família Loranthaceae e o gênero *Passovia* H. Karst

A espécie *Passovia ovata* (Pohl ex DC.) Tiegh., estudada neste trabalho, pertence à uma família de angiospermas eudicotiledôneas chamada Loranthaceae, que compreende um grupo de plantas com características hemiparasitas arbóreas ou arbustivas. As hemiparasitas são plantas capazes de absorver água e sais minerais diretamente de partes da hospedeira, ainda que realizem fotossíntese e com isso, metabolizem todas as substâncias orgânicas importantes para seu desenvolvimento (WATSON e HERRING, 2012).

Apesar das plantas hemiparasitas só retirarem tais compostos de seus hospedeiros, sua presença acaba gerando danos, uma vez que suas raízes modificadas danificam o lenho, interferem na qualidade e quantidade de frutos e ocasionam um déficit no crescimento, podendo levar até a morte da planta parasitada. Contudo, ainda assim não deixam de ter valor dentre as comunidades de elementos vegetais, visto que, contribuem como fonte de recursos para dispersores e agentes polinizadores (ARRUDA et al., 2012).

Ao usufruírem dos frutos dessas hemiparasitas para alimentação, as aves acabam expelindo sementes sobre os galhos das plantas que passarão a ser hospedeiras destas ervas, e por isso, a família Loranthaceae é comumente conhecida no Brasil como erva-de-passarinho. Tais sementes, ao serem depositadas, se fixarão através da ação de uma substância denominada de viscina, e com a decorrente germinação, uma radícula será lançada e posteriormente se transformará em um haustório, que penetra na casca e forma pontos de conexão secundários. Nesses pontos a vascularização das duas plantas se misturam e a erva-de-passarinho passa a ter acesso ao xilema e conseqüentemente à seiva bruta de sua hospedeira (LIU et al., 2018).

Diversas espécies pertencentes a essa família têm sido alvo de pesquisas científicas que buscam elucidar sobre suas propriedades terapêuticas, além da ampla gama de relatos populares a respeito de seu uso com a finalidade de tratar doenças. Estudos fitoquímicos preliminares dos extratos de variadas espécies do grupo identificaram a presença de metabólitos com importância farmacológica, como flavonoides, terpenoides, taninos, cumarinas e antraquinonas. Além disso,

outros ensaios comprovaram seus potenciais para uma série de atividades, como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral e analgésica (WONG e KADIR, 2011; PATIL et al., 2011; HAMIAD, 2013; MOTHANA et al., 2013; PUNEETHA et al., 2014).

Dentre as espécies da família Loranthaceae que ocorrem no Brasil, o gênero *Passovia* H. Karst. é um dos mais representativos, com cerca de 14 espécies distribuídas nos mais variados pontos geográficos do país. Sabe-se que Eichler em 1868 reconheceu o gênero *Passovia* como sinônimo da *Phthirusa* Mart. e durante anos, esta foi a classificação adotada pela maioria dos autores, sendo todas as novas descobertas relacionadas ao gênero limitadas à tal nomenclatura (SCALON et al., 2016).

Somente anos depois, *Passovia* foi restabelecido por Kuij et al., (2011), que com o auxílio de uma série de registros etnobotânicos reconheceram a diferença entre os gêneros. Desde então, a maioria das espécies conhecidas como *Phthirusa* sensu Eichler, passou a fazer parte do gênero *Passovia* como já proposto por Tieghem (1895). Ainda assim, estudos recentes ainda indicam inconsistências na identificação das espécies pertencentes ao gênero, por vezes registradas como *Oryctanthus* (Griseb.) Eichler, outro grupo considerado bastante semelhante à *Passovia* devido a características moleculares e morfológicas.

O gênero *Oryctanthus* (Griseb.) Eichler, assim como *Psittacanthus* Mart. e *Struthanthus*, possui espécies citadas como detentoras de propriedades medicinais, sendo a maioria já comprovadas cientificamente e ligadas à presença de princípios ativos encontrados em seus extratos (BEZERRA et al., 2016; MARQUES et al., 2017; SANAY et al., 2018). Apesar de relatos do seu uso para fins terapêuticos nas comunidades em que são encontradas, *Passovia* tem registros de estudos farmacológicos escassos. Os registros preliminares existentes concentram-se na ação do óleo essencial da *Passovia pedunculata* (Jacq.) Kuijt, no trabalho ainda classificada como *Phthirusa adunca*, apresentando ação bactericida contra *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (MORA et al., 2011).

A espécie explorada neste trabalho ainda não dispõe de estudos na literatura que evidenciem experimentalmente as suas ações terapêuticas, apesar de pertencer a uma família com espécimes vegetais amplamente explorados na medicina popular e pesquisas científicas principalmente por auxiliarem no tratamento de desordens inflamatórias.

3.4 O processo inflamatório e seus mediadores

O processo inflamatório consiste inicialmente em um mecanismo intrínseco benéfico desencadeado por estímulos nocivos, como a presença de lesões teciduais ou agentes infecciosos, tendo como objetivo combater tais agressores e iniciar a restauração tissular no organismo. Toda essa ação ocorrerá, em geral, de maneira rigorosamente controlada e é tida como arma primária do arsenal do sistema imune, compreendendo uma série de mediadores e células que promoverão a sua defesa (MANSELL et al., 2013).

As primeiras alterações que ocorrem na inflamação são as dilatações das arteríolas, ocasionadas pela neoformação de capilares com conseqüente aumento da permeabilidade vascular no local da lesão. Tal processo irá desencadear um aumento do fluxo sanguíneo e extravasamento de proteínas plasmáticas ao interstício ocasionada pela diferença osmótica entre compartimentos. A fim de controlar essa cadeia, o organismo contará com o sistema imunológico, que se divide em imunidade inata e adaptativa (MOHAMMED et al., 2014).

O sistema imunológico inato é caracterizado por uma resposta mais rápida, inicial e inespecífica, enquanto o adaptativo é mais específico, com capacidade de reconhecimento e memória. Este fará a identificação inicial da infecção por meio das células apresentadoras de antígenos (APCs), como os macrófagos residentes e mastócitos. Essas células produzem uma série de mediadores inflamatórios, incluindo as quimiocinas e citocinas, cujo efeito principal é a formação de exsudato inflamatório composto por proteínas plasmáticas e leucócitos, sobretudo neutrófilos que se dirigem ao local lesionado através de vasos sanguíneos (FULLERTON et al., 2016; SUGIMOTO et al., 2019).

Ao chegarem no local da infecção, os neutrófilos entram em contato direto com o antígeno e liberam seus grânulos com conteúdo tóxico na finalidade de eliminar o agente agressor. Todo este processo será diretamente responsável pela manifestação dos chamados cinco sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, tumor, dor e perda da função (MEDZHITOV, 2008; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

Apesar da inflamação ser uma reação fundamental para o organismo, esta pode ser prejudicial ou mesmo destrutiva. Este quadro está geralmente associado a episódios intensos de infecção, sendo muitas vezes inevitável, assim como quando não há eliminação dos fatores deletérios ou em casos dessa resposta inflamatória ser voltada para antígenos do próprio organismo, caracterizando uma doença autoimune. Em todos esses casos haverá uma persistência da cadeia inflamatória, que poderá causar conseqüentes disfunções devido a produções descontroladas de mediadores inflamatórios, metabólitos e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008).

Para que ocorra a transição do processo inflamatório para a etapa de reparação, é necessário que os mediadores lipídicos mudem de prostaglandinas para lipoxinas, compostos responsáveis pela inibição do recrutamento de neutrófilos e pela promoção da migração de monócitos que removerão as células mortas do local lesado. Estas também ativarão macrófagos que fagocitarão células apoptóticas e microrganismos. Além das lipoxinas, as resolvinas, protectinas, o fator de crescimento transformante- β e os fatores de crescimento produzidos por macrófagos também auxiliarão na resolução da inflamação e início do reparo tecidual (SORDI et al., 2012; LEVY e SERHAN, 2014).

Contudo, esse processo não ocorrerá se houver falha da resposta inflamatória aguda em eliminar o patógeno e o quadro de inflamação irá prosseguir, adquirindo novos traços, como a substituição dos neutrófilos por macrófagos e células T (casos de infecção). Se as ações destas células não forem suficientes, um estado inflamatório crônico se instalará e poderá acarretar em uma cadeia de danos teciduais (MEDZHITOV, 2008; MOHAMMED et al., 2014).

As alterações de funcionalidade de muitos tecidos e órgãos na inflamação são decorrentes da produção e liberação de vários mediadores inflamatórios. Mediadores estes que são resultados de secreção celular ou de derivados de proteínas plasmáticas e que irão agir no recrutamento de leucócitos e alterações vasculares, como a vasodilatação e aumento de permeabilidade. De acordo com as características bioquímicas, serão classificados em sete grupos: peptídeos vasoativos, aminas vasoativas, citocinas, enzimas proteolíticas, quimiocinas, mediadores lipídicos e fragmentos de componentes do complemento (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL et al., 2010).

Dentre os vasodilatadores, o óxido nítrico se destaca entre as moléculas que desempenham importante papel na patogênese da inflamação, sendo um agente pró-inflamatório e em altos níveis, determinante de uma série de desordens. Visto que praticamente todas as células são capazes de produzir óxido nítrico a partir do aminoácido L-arginina por meio de uma reação mediada pela enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), e que a síntese de uma das três isoformas dessa enzima é induzida por estímulos inflamatórios, pode-se afirmar que agentes capazes de inibir sua produção representam um importante avanço no tratamento das doenças inflamatórias. Alguns destes agentes vêm sendo relatados em estudos com derivados vegetais (SAMPAIO et al., 2013; CANEBA et al., 2014).

Outro interessante mecanismo de ação anti-inflamatória observado em extratos vegetais é a atividade antioxidante. Esta está relacionada principalmente aos componentes fenólicos, capazes de neutralizar a formação de radicais livres, que possuem relevante papel no

desenvolvimento de patologias associadas a desordens inflamatórias (BREWER, 2011; WALTER e MARCHESAN, 2011).

3.5 Importância dos antioxidantes na ação anti-inflamatória

Como parte das estratégias de defesa das plantas em ambiente natural, que implica vários fatores por vezes desfavoráveis ao seu desenvolvimento, está a habilidade de sintetizar substâncias com características antioxidantes. Estas são metabólitos secundários presentes em sua estrutura que previnem a formação de radicais livres nas células e a consequente formação de lesões (SILVA, 2021).

Os radicais livres são caracterizados por serem átomos quimicamente ativos ou moléculas que apresentam um número ímpar de elétrons na sua órbita externa, ou seja, são altamente instáveis. Ao procurarem por estabilidade através da aproximação com elétrons de outras moléculas, acabam causando danos celulares, proteicos e ao DNA. Quando há produção exacerbada dessas moléculas prejudiciais, indo além da capacidade protetora das defesas oxidantes, ocorre o estresse oxidativo (PREVEDELLO et al., 2021).

A maioria dos componentes secundários presentes nas plantas com capacidade antioxidante atuam contra o estresse oxidativo. Tais compostos geralmente têm uma base molecular bastante parecida, que consiste em um anel aromático e um grupo hidroxila, incluindo os ácidos fenólicos e flavonoides (FERREIRA, 2020).

Na indústria farmacêutica muitos derivados vegetais estão sendo alvo de estudos a respeito de seus potenciais como antioxidantes naturais. Vários de seus compostos, como os polifenóis, têm sido utilizados para neutralizar a oxidação lipídica, com importante papel na inibição da proliferação de microorganismos e proteção contra diversas doenças, sendo que mais de 8000 compostos fenólicos já foram identificados em plantas (SILVA et al., 2020).

O alto teor dessas substâncias, como a presença de flavonóides, cumarinas e taninos, é citado em pesquisas *in vitro* e *in vivo* por induzirem efeitos anti-inflamatórios devido à sua capacidade de suprimir a produção de moléculas pró-inflamatórias, de reduzir a síntese de eicosanóides (mediadores inflamatórios), modular a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória, além de atuarem direta e/ou indiretamente na atividade de células como linfócitos, monócitos, neutrófilos, mastócitos, macrófagos e células natural killer (KUMAR e PANDEY, 2013)

Logo, a realização de testes *in vitro* para avaliação da ação antioxidante, assim como de demais características fitoquímicas de derivados vegetais com potencial terapêutico é muito útil

para o estabelecimento e compreensão das propriedades farmacológicas desses extratos. Nesse contexto, se evidencia a importância de explorar plantas pertencentes à flora brasileira, principalmente quando o uso destas já vêm sendo relatado dentro das comunidades, como é o caso das ervas-de-passarinho e conseqüentemente, de *P. ovata*.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e padronização do derivado vegetal

4.1.1 Coleta e identificação botânica

As folhas e os caules de *P. ovata* (Pohle x DC.) Tiegh. (Figura 1) foram coletados no mês de julho de 2019, período da estação seca na região, entre 14:00h e 18:00h, em uma área na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão- UEMA, localizada na cidade de São Luís- MA, onde a planta estava parasitando mangueiras (*Mangifera indica*).

Posteriormente foram levadas ao Herbário Rosa Mochel da UEMA e passaram por um processo de prensagem com auxílio de um suporte de madeira, papelão e jornal, sendo colocadas em estufa de lâmpadas ultra violeta intercaladas em 40W e 60W, onde permaneceram por 24 horas. Em seguida, foi feita a montagem da exsicata para a formulação da sua classificação taxonômica.

A confirmação da espécie foi dada pela Dr^a Ana Maria Maciel Leite, curadora do Herbário SLUI, onde a amostra foi depositada no acervo sob número de registro 5516 (Anexo).



Figura 1: (A) planta *P. ovata* encontrada em mangueira na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão. (B) Amostra vegetal de *P. ovata* coletada. (C) Parte aérea de *P. ovata* utilizada para preparo do extrato.

4.1.2 Pesagem e higienização da amostra para preparação do extrato hidroetanólico

A amostra composta por partes aéreas da planta, excluindo folhas muito novas ou com avarias que pudessem comprometer os possíveis resultados, foi pesada e contabilizou 2,5 kg de material. Logo após, essa passou por processo de lavagem em água corrente e foi mergulhada em álcool à 70% com a finalidade de eliminar contaminantes superficiais. Foi depositada de maneira uniforme para que fosse retirado o excesso de umidade ao ar livre.

4.1.3 Secagem, trituração da amostra e obtenção do extrato hidroetanólico

Depois de retirada a umidade, a amostra foi levada ao Herbário para secagem em estufa de lâmpadas UV intercaladas em 40W e 60W, permanecendo nesta por cerca de 48 horas.

As folhas já secas foram levadas ao Instituto Federal do Maranhão – IFMA e foi feita a trituração em moinho de facas com peneira acoplada de 1,0 mm. O pó resultante da trituração foi pesado e resultou em 800 g.

O EHE à 70% foi obtido por maceração (20% p/v) durante um período de doze dias, nos quais ocorreram trocas de solvente e filtração do material em papel filtro comum a cada três dias. O material final de cada filtração foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até que aparentemente todo o álcool fosse eliminado, favorecendo seu posterior congelamento. Em seguida o extrato foi concentrado em um liofilizador a -70 °C. Este passou a ser denominado EHE concentrado, com volume mensurado em 200 g.

4.1.3.1 Rendimento

Após a obtenção do EHE seco, calculou-se o rendimento levando em consideração o peso do material inicial e o peso do extrato ao final da liofilização. Esse rendimento foi calculado de acordo com a fórmula:

$$Re = (P_{ext} / P_{material}) \times 100 \text{ (RODRIGUES, 2011).}$$

Onde: Re= Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato seco (g) $P_{material}$ = Peso do material seco (g).

4.2 Caracterização fitoquímica do extrato hidroetanólico de *P. ovata*

4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPCL)

Foram pesados 10 miligramas (mg) do EHE em uma balança analítica. Em seguida, adicionou-se 800 microlitros (μ l) de metanol HPCL e 200 μ l de água destilada, para posterior homogeneização em um sonicador, aparelho responsável pelo lançamento de ondas eletromagnéticas que diluíram as partículas ainda presentes no extrato. Feito esse procedimento e com a amostra homogênea, iniciou-se a configuração do método exploratório gradiente a ser utilizado, que consistiu na adição de 5-100% de metanol em 40 minutos e 100-100% de 40 a 50 minutos no PDA. Injetou-se 20 μ l da amostra homogênea no HPCL e foram analisados os picos demonstrados no cromatograma.

4.2.2 Ensaios fitoquímicos qualitativos

Os ensaios fitoquímicos seguiram a metodologia relatada por Costa (1994) e Matos (1997). Desse modo, o extrato foi diluído em metanol na concentração de 20mg/mL e todos os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos uma vez.

4.2.2.1 Teste para antraquinonas

A avaliação de antraquinonas foi feita em uma placa de 96 poços, onde foram adicionados 150 μ L da amostra EHE e 50 μ L de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5M. Após isso, o aparecimento de coloração vermelha simboliza a presença de antraquinonas.

4.2.2.3 Teste para saponinas

Foram adicionados 1 mL da amostra a 2 mL de água destilada em cada tubo. O tubo foi então agitado vigorosamente por 30 segundos e colocado em repouso por 10 minutos. A presença de espuma com altura superior a 1 cm indica a presença de saponinas.

4.2.2.4 Teste para taninos

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL do EHE e gota a gota foi adicionada uma solução de gelatina a 2,5%. A formação de precipitado branco indica a presença de taninos.

4.2.2.5 Teste para antocianinas, antocianidinas, flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.

A análise de antocianidinas e flavonóides foi feita utilizando três tubos de ensaio, sendo que, o primeiro foi acidificado com ácido clorídrico 0,1M e teve seu pH ajustado para 3 e os

outros dois foram alcalinizados com hidróxido de sódio 0,1M com pH corrigido para 8,5 e 11, respectivamente.

Já os testes de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas foram feitos em três tubos e estes apresentavam-se já devidamente acidificados com pH igual a 3 para dois deles, ou alcanizados com pH igual a 11, para o último tubo. Os tubos foram então aquecidos por dois minutos.

Para os dois experimentos a modificação de cores no meio aponta a presença dos referentes metabólitos secundários e foram avaliadas de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros para identificação qualitativa de antocianinas, antocianidinas, flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.

Constituintes	Ácido (pH=3)	Alcalino (pH=8,5)	Alcalino (pH=11)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelho	Lilás	Azul-púrpura
Flavona, flavanóis e xantonas	NR	NR	Amarelo
Chalconas e auronas	Vermelho	NR	Vermelho-púrpura
Flavonóis	NR	NR	Vermelho-laranja
Leucoantocianidinas	Vermelho	NR	NR
Catequinas	Pardo-amarelado	NR	NR
Flavanonas	NR	NR	Vermelho-laranja

NR = Não reagente. Fonte: Adaptado de MATOS, 1997.

4.2.2.6 Teste de cumarina

A determinação de cumarina foi feita com a adição de dois pontos, de aproximadamente 1,5cm de diâmetro, do extrato em um pedaço de papel filtro com o auxílio de um capilar. Após secagem, foi adicionado sobre cada ponto uma gota de solução aquosa de hidróxido de potássio e o papel filtro foi levado à luz ultravioleta por três minutos. A observação de uma fluorescência azulada, forte e bem visível na mancha é indicativo da presença de cumarina.

4.2.3 Quantificação de flavonoides

Realizou-se a quantificação do teor de flavonoides em microplaca de 96 poços conforme adaptação de técnica realizada por Acácio et al. (2018). Em cada poço da placa foi adicionado 200 µL da solução metanólica do extrato na concentração de 1 mg/mL e 100µL da solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2%. Em seguida, a placa foi envolvida com papel alumínio e mantida no escuro por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420nm e as absorvâncias obtidas foram interpoladas para a curva de calibração de quercetina. Por fim, todas as soluções testadas foram feitas em triplicatas e o experimento foi repetido duas vezes.

4.3 Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *P. ovata*

4.3.1 Determinação da atividade antioxidante por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A determinação da atividade por DPPH foi realizada seguindo a metodologia proposta por Acácio et al. (2018) com modificações. O EHE de *P.ovata* foi diluído em metanol nas concentrações de 1000 µg/mL a 7,8125 µg/mL. Em cada poço de uma placa de 96 poços, foi adicionado 100 µL da solução teste do extrato e 40 µL da solução de DPPH a 0,3 mM em metanol. Foi realizado um controle negativo que consistiu de 100 µL de metanol e 40 µL da solução de DPPH à 0,3 mM. A curva padrão foi obtida com Trolox nas concentrações de 50µM a 0,390625 µM.

A placa foi mantida no escuro por 30 minutos e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro leitor de placas a 492 nm. O experimento foi feito em triplicata e realizado duas vezes.

As análises da absorvância foram normalizadas segundo a fórmula:

$$\% \text{ de redução do radical DPPH} = \frac{\text{média da absorvância do controle negativo} - \text{absorvância do poço teste}}{\text{Média da absorvância do controle negativo}} \times 100$$

Foi calculada a IC₅₀, concentração necessária para decair em 50% a concentração inicial do radical DPPH. Os valores de IC₅₀ foram calculados por meio da equação da reta obtida pela regressão linear do gráfico.

4.3.2 Determinação da atividade antioxidante por ABTS

O ensaio foi realizado de acordo com Re et al. (1999) e Indracanti et al. (2019) com adaptações. Foi adicionado 20 µL do extrato diluído em metanol, nas concentrações de 1000

$\mu\text{g/mL}$ a $7,8125 \mu\text{g/mL}$, à $280 \mu\text{L}$ da solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. O branco consistiu de $20 \mu\text{L}$ de metanol e $280 \mu\text{L}$ da solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A placa foi mantida no escuro por 20 minutos e depois foi feita a leitura em espectrofotômetro leitor de placas a 734 nm . Foi feita curva de calibração com Trolox nas concentrações de 500 a $25 \mu\text{M}$. O experimento foi feito em triplicata e realizado duas vezes.

As análises da absorbância foram normalizadas segundo a fórmula:

$$\% \text{ de redução do radical ABTS} = \frac{\text{média da absorbância do controle negativo} - \text{absorbância do poço teste}}{\text{Média da absorbância do controle negativo}} \times 100$$

Foi calculada a IC_{50} , concentração necessária para decair em 50% a concentração inicial do radical ABTS. Os valores de IC_{50} foram calculados por meio da equação da reta obtida pela regressão linear do gráfico.

4.3.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método de Redução do Ferro (FRAP)

O experimento foi baseado na metodologia proposta por Rufino et al. (2006), acrescida de algumas modificações. Inicialmente, o reagente FRAP foi preparado por meio da mistura de 25 mL de solução de tampão acetato a $0,3\text{M}$ ($\text{pH } 3,6$) com $2,5\text{mL}$ da solução de TPTZ –2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (10mM de TPTZ em $\text{HCl } 40 \text{ mM}$) e $2,5 \text{ mL}$ da solução aquosa de cloreto férrico (FeCl_3 20 mM). No ensaio, $300 \mu\text{L}$ do reagente FRAP foram adicionados a $10 \mu\text{L}$ do extrato da planta diluído em metanol e $30 \mu\text{L}$ de água destilada. Como branco foi usado $300 \mu\text{L}$ da solução de FRAP, $10 \mu\text{L}$ de metanol e $30 \mu\text{L}$ de água destilada. As placas foram mantidas no escuro durante 30 minutos a 37°C e depois lidas em espectrofotômetro a 595 nm . A atividade antioxidante das amostras foi determinada por meio da curva padrão com Trolox de 1000 a $15,62 \mu\text{mol/L}$ em metanol e os resultados expressos em μmol Trolox equivalente (ET)/g de extrato.

4.4 Cultivo celular de macrófagos RAW 264.7

A solução com as células congeladas era mantida em nitrogênio líquido e foi descongelada. As células foram então mantidas em estufa à temperatura de 37°C e 5% de CO_2 . O meio utilizado foi RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab), 10 ml L-glutamina (20 mM) e 10 ml de solução antibiótica e antimicótica (Antibiotic Antimycotic Solucion 100x, Stabilized- Sigma) contendo 10.000 UI de penicilina, 10 mg de

estreptomicina. Os macrófagos foram monitorados diariamente em microscópio invertido e ao atingirem a confluência de 80-90% foram realizadas as passagens.

4.5 Citotoxicidade do extrato hidroetanólico de *P. ovata* em macrófagos RAW 264.7

A avaliação da citotoxicidade foi realizada conforme adaptação da técnica empregada por Mosmann (1983). Resumidamente, adicionou-se as células na concentração de 2×10^6 / mL em 100 μ l de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB, por poço em uma placa de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas overnight em estufa a 37°C com 5% CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com diluições do EHE em RPMI e duas horas e meia antes de completar cada tempo (24 ou 48 horas) adicionou-se 10 μ L de uma solução estéril de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) na concentração de 5 mg/mL em PBS e a placa foi incubada novamente por duas horas e meia. As diluições do extrato hidroetanólico, os controles positivo e negativo foram adicionados em triplicata.

Ao término do tempo de incubação, retirou-se 100 μ L do sobrenadante de cada poço e 100 μ L de DMSO foram adicionados. A placa foi colocada em agitador automático por 30 minutos para homogeneização. Após a homogeneização, realizou-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm. O experimento foi realizado em duplicata e os dados obtidos na leitura passaram por normalização pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição de crescimento} = (\text{média da absorbância do controle positivo} - \text{média da absorbância do controle negativo}) / (\text{Valor da absorbância do poço teste} - \text{média da absorbância do controle negativo}) \times 100$$

A partir dos resultados da fórmula, os dados normalizados foram utilizados para a análise estatística e cálculo do IC₅₀ das amostras do teste.

4.6 Quantificação de nitrito em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS

Mensurou-se a concentração de nitrito das amostras pelo método colorimétrico de Griess (GREEN et al., 1999). O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de uma solução de 1% de sulfanilamida em 2,5% de ácido ortofosfórico (H₃PO₄) e uma solução de 0.1% de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina. Para dosagem de nitrito, 50 μ L das amostras foram adicionadas em poços de uma microplaca de 96 poços. Posteriormente, o mesmo volume (50 μ L) do reagente de Griess foi adicionado em cada poço. Após 10 minutos, mediu-se a densidade óptica (absorbância) por espectrofotometria em leitor de ELISA com comprimento de onda de 570 nm.

Os resultados foram expressos em μM , com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de nitrato de sódio (NaNO_2) em meio de cultura (de 3,1 a 100 μM).

4.7 Análise estatística

Os valores de absorvância obtidos foram representados como média \pm desvio padrão. Os dados não paramétricos dos ensaios de citotoxicidade e nitrito foram analisados por ANOVA pelo teste de Kruskal–Wallis com pós Teste de Dunn no programa Graph Pad versão 6.0. As diferenças significativas foram consideradas como $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da planta e derivado vegetal

5.1.1 Seleção do líquido extrator

O extrato desenvolvido foi o hidroetanólico e sua escolha foi baseada em demais estudos realizados com amostras vegetais pertencentes à mesma família, que apresentaram melhor desempenho em relação à eficácia na estabilização e facilidade na padronização dos princípios ativos presentes com esse tipo de líquido extrator (VIEIRA et al., 2005).

Além disso, dentre os demais extratos secos, esse demonstrou melhores resultados em testes relacionados a ação anti-inflamatória, antioxidante, bactericida e antitumoral (VITTORAZZI et al., 2016; GRAMMA et al., 2016; CASTRO, 2019). Esses resultados estão diretamente atrelados à efetividade na padronização e extração de compostos secundários citada anteriormente.

5.1.2 Rendimento

De 750g do material vegetal triturado, pôde-se obter 200g de EHE de *P. ovata* seco, o que lhe conferiu rendimento percentual de 26,6%. A título de comparação, em extração realizada por Bezerra et al. (2016) com a espécie *Psittacanthus plagiophyllus* utilizando água a 70°C como líquido extrator, este obteve rendimento equivalente a 28,5%.

Já o extrato aquoso de outra erva-de-passarinho *Tripodanthus acutifolius*, desenvolvido por Grüner et al. (2012) resultou em 20% de rendimento. Enquanto o extrato etanólico de *Struthanthus marginatus* elaborado por Mariano (2012) rendeu o equivalente a 11,04%.

Os diferentes rendimentos obtidos na padronização de extratos estão relacionados a variações na solubilidade dos materiais ao interagirem com determinados solventes, do mesmo modo, a polaridade destes líquidos extratores também poderá interferir no teor de metabólitos secundários finais provenientes da extração. Por isso, é importante que a eleição do líquido extrator seja feita com embasamento em testes prévios (VIEIRA et al., 2005).

5.2 Propriedades fitoquímicas

5.2.1 Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPCL)

A separação dos componentes de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos presentes no EHE foi expressa na figura 2, resultante do emprego da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPCL). Por meio dessa técnica pôde-se analisar maior retenção de compostos polares, fator que posteriormente foi fundamental para a eleição dos solventes

utilizados no fracionamento do extrato, que permitiram uma análise mais precisa de seus componentes.

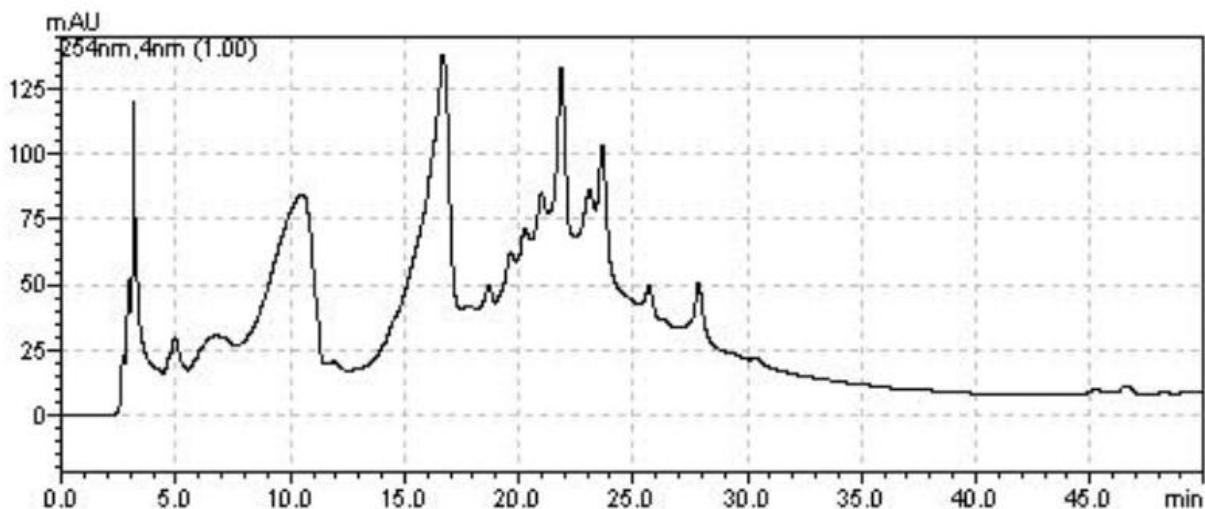


Figura 2: Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato hidroetanólico de *P. ovata*.

A cromatografia é uma técnica muito utilizada na separação, identificação e determinação de compostos em matrizes complexas, sendo HPLC o método considerado mais versátil e empregado para separar os componentes de materiais vegetais (SKOOG et al., 2013). Contudo, é de suma importância para obtenção de mais informações sobre as substâncias expressas na coluna cromatográfica, que esta seja acoplada a um espectrômetro de massas. O espectrômetro permite que os compostos eluídos pela coluna sejam detectados e convertidos em espectros capazes de auxiliar na tentativa de elucidação da estrutura e massa molecular, identificando de modo mais preciso, os componentes da amostra (CHIARADIA et al., 2008).

A realização da HPCL possibilita tanto posterior aplicação da espectrometria de massas, quanto a eleição de solventes usados em frações do EHE, comprovando a importância dessa técnica para melhor compreensão dos componentes presentes no extrato.

5.2.2 Análises fitoquímicas qualitativas

A tabela 2 apresenta os metabólitos secundários encontrados por meio de testes qualitativos no EHE de *P. ovata*.

Tabela 2. Identificação dos metabólitos secundários presentes no extrato hidroetanólico de *P. ovata*, segundo método de Costa (1994) e Matos (1997).

Metabólitos secundários	Extrato hidroetanólico
Antraquinonas	+
Saponinas	-
Taninos	+
Antocianidinas	-
Chalconas	-
Leucoantocianidinas	-
Catequinas	+
Flavanonas	+
Flavonas, flavanois e xantonas	-
Auronas	-
Flavonóis	+
Cumarinas	-

Foram detectadas antraquinonas, que são substâncias estabelecidas como fenólicas, encontradas em acentuada quantidade na natureza, em plantas e bactérias (XIANG et al., 2017). Entre as principais antraquinonas exploradas em pesquisas, podemos citar a aloe emodina, barbaloina e o crisofanol. Tais compostos são capazes de desempenhar atividade anti-inflamatória, antitumoral, laxativa e antimicrobiana (XIANG et al., 2017; WU et al., 2017; SUN et al., 2018), antifúngicos (ARAUJO, 2019).

Algumas dessas ações estão relacionadas a capacidade desses componentes inibirem a produção de óxido nítrico e prostaglandinas em macrófagos, interromperem o ciclo celular, induzirem apoptose e inibirem metástases, como demonstrado por Park et al. (2009) e Choi et al. (2013) ao realizarem experimentos em modelo com macrófagos de murinos.

Os taninos, também detectados na amostra, são compostos presentes nas plantas que desempenham papel na sua defesa química contra agressores e passaram a ser conhecidos por desempenharem ações tanto nutricionais, quanto farmacológicas. Estudos descrevem atividades

antibacterianas, fungicidas, antivirais, antioxidantes e anti-inflamatórias para essas substâncias (LUIZ et al., 2015; LIU et al., 2015). Além destes também serem usados como cicatrizantes no processo de cura de feridas, como adstringentes e antissépticos (NASCIMENTO et al, 2021).

Há correlação entre essas ações e a capacidade dos taninos em sequestrarem radicais livres, estimularem células fagocíticas e a formação de uma camada de tanino-proteína que auxilia na recuperação tecidual (NASCIMENTO et al, 2021). Portanto, a presença desses componentes na amostra vegetal ajuda na validação de possíveis efeitos medicinais que a planta é capaz de desempenhar.

Estudos também atribuem às catequinas, polifenóis encontrados nas folhas de plantas, incluindo *P. ovata*, uma série de efeitos protetores. Como auxiliar no aumento da atividade do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) citocromo c redutase, responsável por proteger a membrana celular e outros componentes celulares de oxidação, inibir o crescimento e secreção de α -fetoproteína quando avaliada em hepatomas humanos, além de impedir o crescimento de tumores de intestino e fígado em ratos (ISHII et al., 2018).

Já as flavanonas e os flavonóis estão entre os metabólitos presentes em plantas cujas funções biológicas são mais citadas em pesquisas. Nestas, desempenham papel de fotoproteção e auxiliam no controle hormonal, de insetos e microrganismos. Quando submetidos a estudos farmacológicos, estes demonstraram ajudar em atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antialérgica, antiviral e na prevenção de úlceras (MACHADO et al., 2008)

Como antioxidantes, atuam direta e indiretamente na modulação da expressão de enzimas oxidativas e reduzem os efeitos do estresse gerado por estas, como em experimento feito por Jannat et al. (2016), em que as flavanonas foram apontadas como auxiliares na redução de estresse oxidativo em células de fígado (HepG2) através de sua ação antioxidante e da indução de enzimas de fase II neste órgão.

Trabalhos realizados com demais espécies da família Loranthaceae evidenciam a presença de outros compostos não encontrados em *P. ovata* nessa pesquisa, como as saponinas e cumarinas, demonstrando a utilidade de uma prospecção fitoquímica mais aprofundada para melhor caracterização do EHE. Contudo, as classes de compostos que puderam ser detectadas nesta análise qualitativa preliminar são suficientes para instigar um interesse por suas propriedades farmacológicas, visto que antraquinonas, taninos, catequinas e flavonóis são diretamente associados às atividades terapêuticas de muitas plantas, inclusive no controle de distúrbios oxidativos e inflamatórios (LIU et al., 2015; FUNAKOSHI-TAGO et al., 2015).

5.2.3 Quantificação de flavonoides

Na figura 3 é apresentada a curva de quercetina, cuja equação da reta foi utilizada para o cálculo de flavonóides do extrato vegetal.

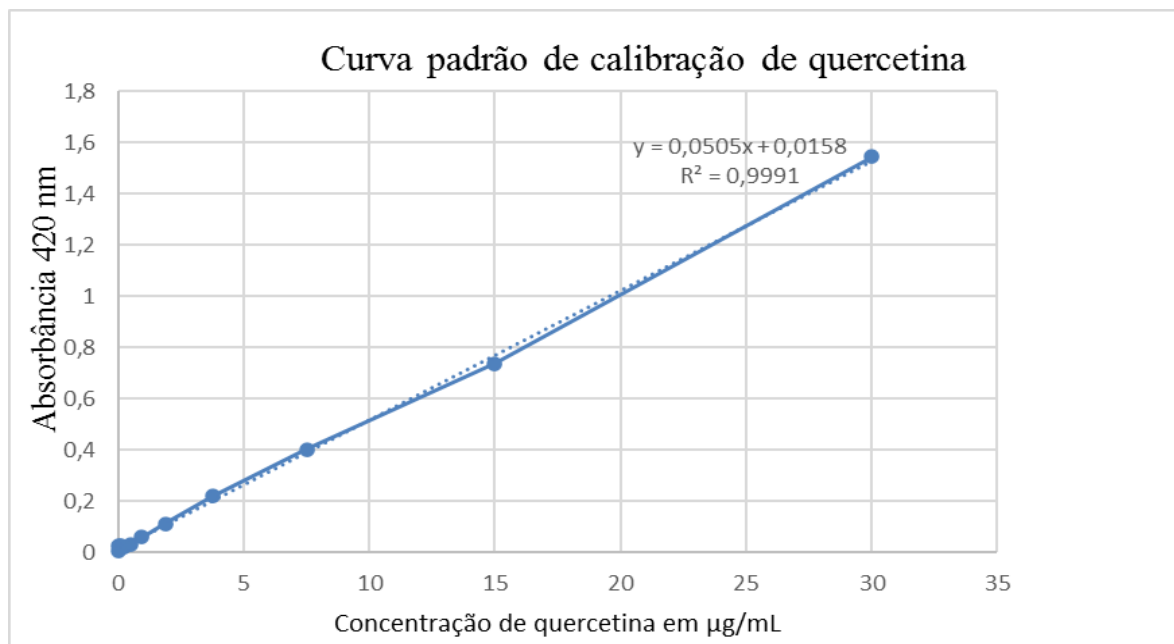


Figura 3: Curva de Calibração de Quercetina

Foi obtido um teor de flavonoides totais de 4,44 mg de Equivalentes de Quercetina/gramas do EHE de *P. ovata*. Em trabalho feito por Ibarra-Alvarado et al., (2010), que estimaram a presença de flavonoides totais a uma concentração de 3,34 mgEQ/g no extrato aquoso liofilizado da parte aérea de *Psittacanthus calyculatus*. Já Chukwu et al. (2022), obtiveram 12,85 mg EQ/g com o extrato hexânico da folha de *Visco album*.

Os flavonoides são compostos capazes de estabilizar e eliminar os radicais livres, uma vez que possuem a capacidade de doar hidrogênio ao radical livre, tornando-os estáveis. Estes são antioxidantes hidrofílicos ativos e captadores de radicais livres que impedem o dano oxidativo das células e evitam a progressão de doenças crônico-degenerativas (DONNARUMMA et al., 2011; CORCORAN et al., 2012).

A presença de flavonóides em extratos vegetais indica que eles podem contribuir significativamente para os potenciais antioxidantes e anti-inflamatórios. Isso está de acordo com o relato de Nazaruk e Orlikowski (2016) que investigaram o perfil fitoquímico e os potenciais terapêuticos de *V. album* L. Assim como com trabalho realizado por Chukwu et al. (2022) que avaliou propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do extrato n-hexano das folhas da mesma erva-de-passarinho.

Acrescido a isso, muitos flavonoides apresentam ação preventiva e terapêutica de doenças bacterianas, virais e cardiovasculares, além de demonstrarem potenciais gastroprotetores, antitumorais, antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores (TANWAR e MODGIL, 2012; DINIZ et al., 2015; FUNAKOSHI-TAGO et al., 2015; XIE et al., 2015).

Seus mecanismos de ação envolvem também a inibição da proliferação de linfócitos T, a inibição da produção de citocinas pró- inflamatórias, como a TNF- α e IL-1, além de auxiliarem na modulação da enzima transformadora do óxido nítrico em óxido nítrico sintase induzida (iNOS), tendo assim efeitos sobre o estresse oxidativo (MARCUCCI et al., 2021). O percentual de flavonóides encontrados no presente estudo indica que o EHE de *P. ovata* possui potenciais terapêuticos diretamente relacionados à presença dessas estruturas.

5.3 Capacidade antioxidante do extrato hidroetanólico de *P. ovata*

5.3.1 Determinação da atividade antioxidante por DPPH

Para o padrão Trolox (Figura 4) foi encontrado um valor de IC₅₀ correspondente a 15,38 $\mu\text{g/mL}$. Sendo importante ressaltar que quanto menor o valor de IC₅₀ obtido, melhores os efeitos do extrato em relação à quantidade de antioxidante capaz de inibir o radical.

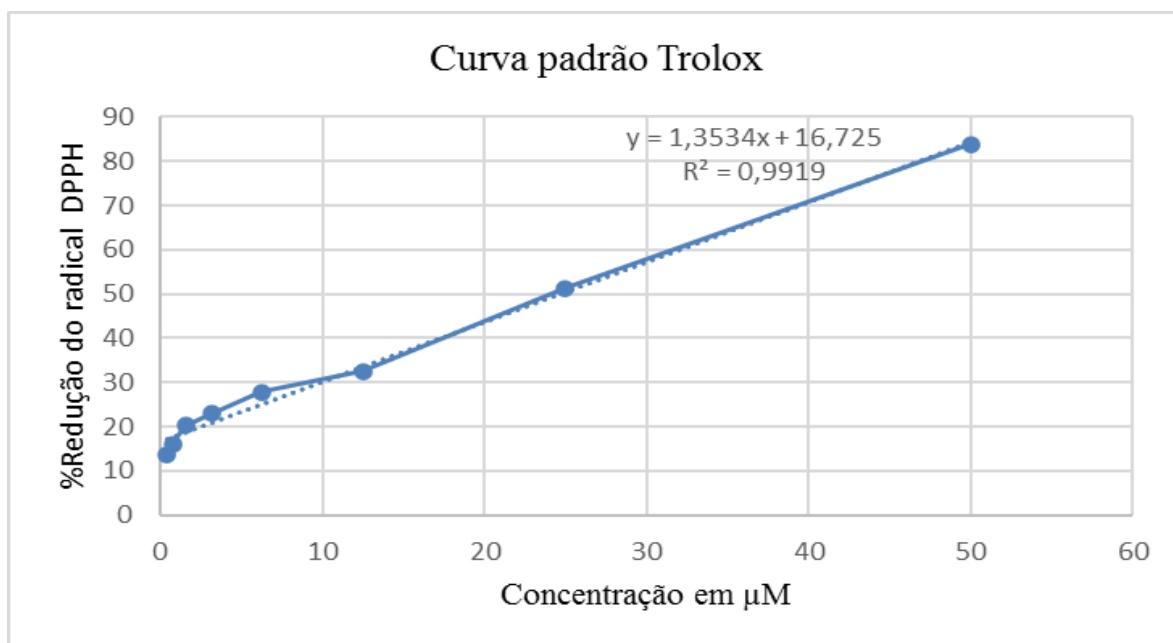


Figura 4: Curva padrão de Trolox para o teste DPPH

Bezerra et al. (2016) em pesquisa utilizando extrato aquoso das folhas de *P. plagiophyllus*, tiveram resultado de IC₅₀ igual a 21,70 $\mu\text{g/mL}$. Já a espécie *Viscum cruciatum*,

ao ter seu extrato bruto estudado por Usman et al. (2018), também apresentou redução do radical, tendo 263,7 µg/mL de concentração eficiente para reduzi-lo em 50%.

O método de análise da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH é considerado um dos mais simples, precisos e reprodutíveis tipos de avaliação dessa capacidade em extratos vegetais e substâncias puras (OLIVEIRA, 2015). As características moleculares das substâncias presentes nas amostras, assim como as interações com o radical estão diretamente relacionadas à atividade antioxidante exercida pelas concentrações do extrato.

5.3.2 Determinação da atividade antioxidante por ABTS

Os resultados foram medidos pelo cálculo do potencial antioxidante do radical catiônico ABTS⁺ mediante o percentual de redução em 50%, expresso pela curva padrão Trolox (Figura 5) e obtendo-se valor de 62,72 µg/mL.

Peisino (2018) ao testar a atividade antioxidante por ABST em extrato metanólico de *Emília sonchifolia*, analisou o percentual de IC₅₀ equivalente a 276,7 µg/mL. Contudo, no mesmo trabalho, ao avaliar os resultados do mesmo extrato de duas outras espécies (*Hypochaeris chillensis* e *Emília fosbergii*), o autor observou menores concentrações com eficiência para reduzir em 50% o radical, sendo estas 45,5 µg/mL e 32,9 µg/mL, respectivamente.

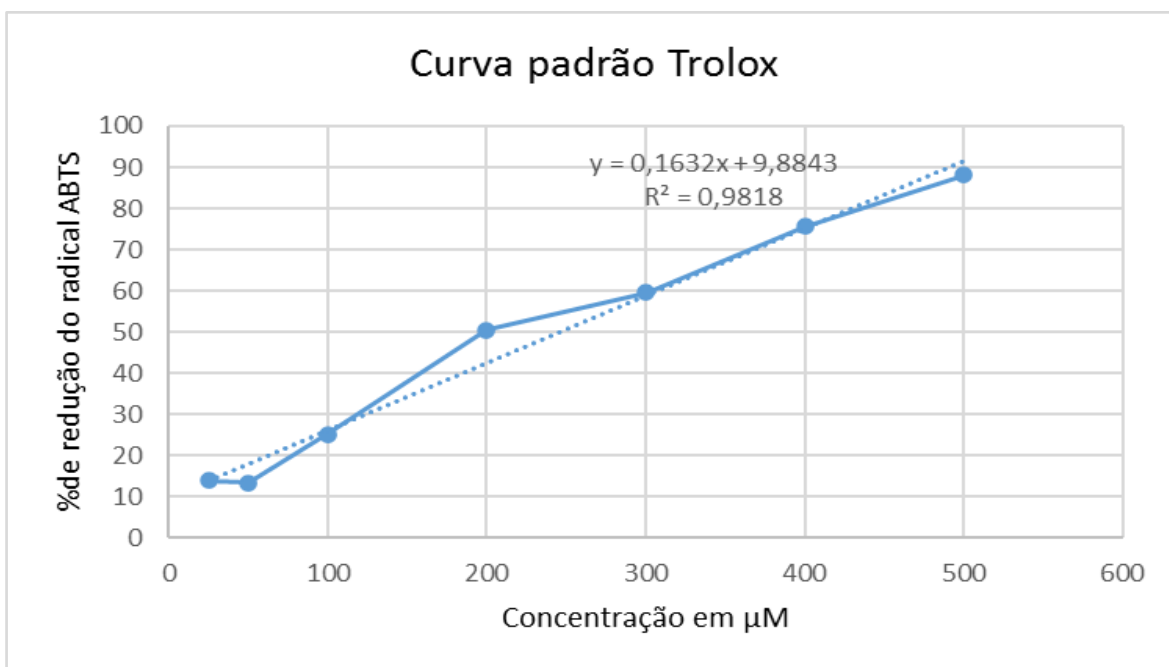


Figura 5: Curva padrão Trolox para o teste ABTS

Dentre os métodos existentes para determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais, tem-se o ABTS, radical sintético que já era bastante utilizado em ensaios enzimáticos como marcador de reação e atualmente vem sendo explorado em testes colorimétricos para estimar o potencial antioxidante de substâncias ou misturas. Nessa aplicação, este reage com o persulfato de potássio e passa de uma coloração verde clara para verde azulada ao formar um radical catiônico $ABST^+$ (TORRES, 2017).

Ainda segundo Torres (2017) a absorção desse radical catiônico na solução é comparada com sua absorção após estabilização por agentes antioxidantes e esse processo será indicado pela mudança de coloração para o verde claro. Todo esse processo foi captado no estudo pela utilização de um espectrofotômetro e quanto maior a absorbância, ou mais clara ficar a coloração da reação submetida ao teste, maior será o potencial antioxidante.

5.3.4 Determinação da atividade antioxidante por FRAP

Mediante a curva de calibração do Trolox (Figura 6), os resultados demonstrados pelo teste de FRAP nesse experimento apresentaram para o EHE de *P. ovata* um poder redutor de 3488,24 μmol de Equivalente Trolox/grama de extrato seco, valor muito promissor ao comparar com o EHE de outras ervas-de-passarinho, como *Plinia glomerata* que teve um resultado de 693,65 $\mu\text{molET/g}$ (OLIVEIRA et al., 2021).

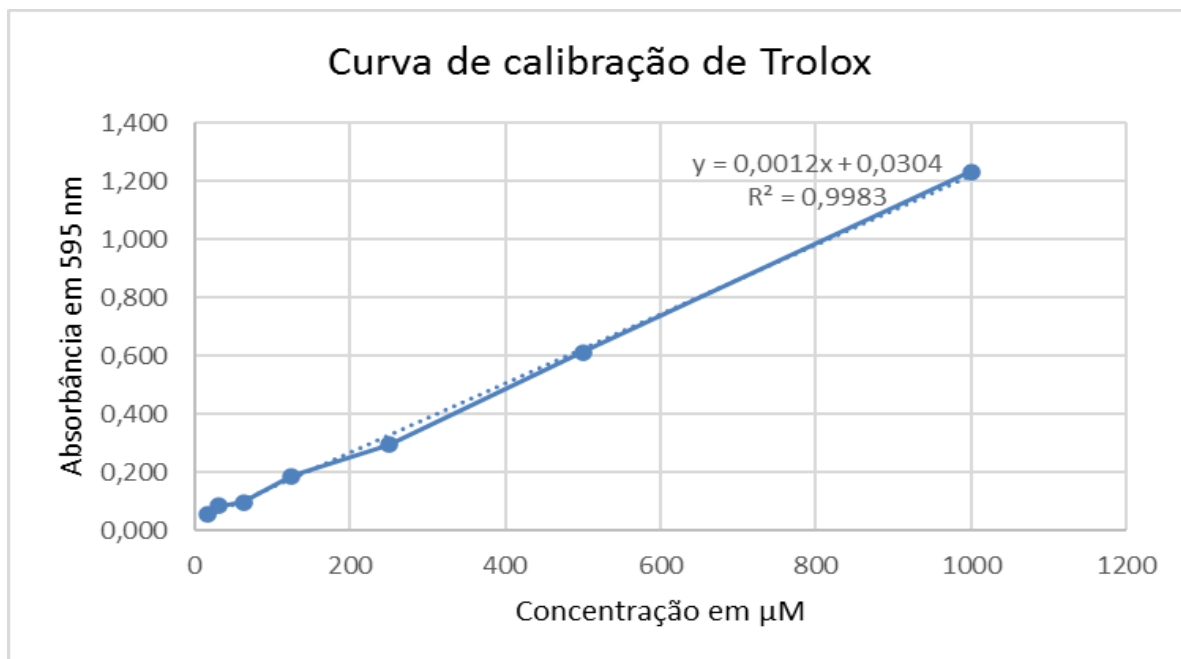


Figura 6: Curva de calibração de Trolox para FRAP

Em outro trabalho, desta vez testando a capacidade antioxidante do extrato aquoso da parte aérea de *Apium graveolens* L., os autores obtiveram poder de redução equivalente a 45.57 $\mu\text{molET/g}$. Enquanto isso, a fração de diclorometado preparada a partir do mesmo extrato apresentou resultado de 233.47 $\mu\text{molET/g}$ (EMAD et al., 2022).

O teste de FRAP demonstra a habilidade de um composto em produzir Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} , e isso definirá sua capacidade como antioxidante (VASCONCELOS et al., 2007). Diferentemente dos demais ensaios, que irão medir a inibição de espécies reativas geradas em uma mistura, causando dependência destas e tornando tais ensaios mais indiretos, o experimento FRAP usará compostos antioxidantes como redutores em reação colorimétrica ligada ao redox, fazendo com que um pré-tratamento não seja necessário (BLOMHOFF et al., 2006).

De acordo com Vittorazzi et al. (2016), à presença de variados metabólitos secundários detectados e aos teores de flavonoides no extrato, indicam que este é capaz de desempenhar efeitos terapêuticos, incluindo diminuição da liberação de radicais livres e consequentemente a ocorrência do estresse oxidativo.

5.4 Citotoxicidade do extrato hidroetanólico de *P. ovata* em macrófagos RAW 264.7

A tabela 3 apresenta os valores de IC_{50} obtidos de diferentes concentrações testadas do EHE de *P. ovata* após um período de incubação de 24 e 48 horas.

Tabela 3. Valores de IC_{50} obtidos de diferentes concentrações testadas do EHE de *P. ovata* após um período de incubação de 24 e 48 horas.

<i>Passovia ovata</i>	$\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL})$ -24h	$\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL})$ -48h
Extrato hidroetanólico	855,7 \pm 1,25	878,4 \pm 1,19

Ao avaliar a citotoxicidade do EHE de *P. ovata* nas diferentes concentrações testadas após um período de incubação de 24 e 48 horas, não foi possível observar diferença significativa entre as células não tratadas e as tratadas, assim, podendo chegar à conclusão de que não houve efeito citotóxico pelas concentrações utilizadas.

O ensaio citotóxico tem como objetivo avaliar a viabilidade das células ao serem submetidas a um tratamento com determinado derivado vegetal. Dessa forma, quanto maior o

valor de IC₅₀ obtido neste teste, melhor, visto que será preciso altas concentrações do extrato para causar danos celulares. Todos os testes subsequentes se afastarão dessa concentração, a fim de produzir efeitos terapêuticos sem se aproximar da dose considerada tóxica.

O método de eleição para a análise foi MTT, por ser considerado um meio rápido, prático e bastante utilizado para determinação de citotoxicidade *in vitro*. O experimento consistiu na determinação da quantidade de células vivas após um tratamento escolhido, a partir da redução mitocondrial do sal de MTT em cristais de formazan, sendo este resultante predominantemente da ação da enzima succinato-desidrogenase, a quantidade desses cristais foi medida pelo espectrofotômetro e foi proporcional ao número de células vivas, ou seja, células viáveis (MEERLOO et al., 2011).

O teste de viabilidade celular é fundamental para o desenvolvimento de experimentos posteriores utilizando o extrato, pois este comprova a não interferência da morte celular nos resultados observados. As células da linhagem de macrófagos RAW 264.7 foram utilizadas devido ao fato de possuírem sensibilidade a ação do LPS e por serem capazes de exibir uma ativação do receptor Toll-like (TLR4), que interage com o LPS e promove sinais inflamatórios. Dessa maneira, ao estimular as células RAW 264.7 será possível analisar efeitos anti-inflamatórios do produto testado (ZHAN et al., 2018).

Os resultados da ação citotóxica do EHE de *P. ovata* no presente estudo assemelham-se aos de Marques et al. (2017), que avaliaram o efeito citotóxico do extrato hidroetanólico de *S. vulgaris* sobre linhagens celulares de macrófagos J774 e notaram que este não revelou citotoxicidade celular para as diferentes concentrações testadas. Assim como observado por Adeniran et al. (2020) em trabalho feito com extratos da raiz de *Hermannia geniculata*, que não demonstrou atividade tóxica para as linhagens celulares de macrófagos Vero e RAW 264.7.

5.5 Determinação da produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS

Na dosagem de nitrito dos grupos tratados com 125 e 250µg/mL do EHE de *P. ovata* não houve diferença estatística quando comparados ao grupo estimulado por LPS, mas não tratado. Já o grupo tratado com concentração de 500µg/mL do extrato apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle positivo, apenas estimulado por LPS, com significância de $p < 0,01$ (Figura 7).

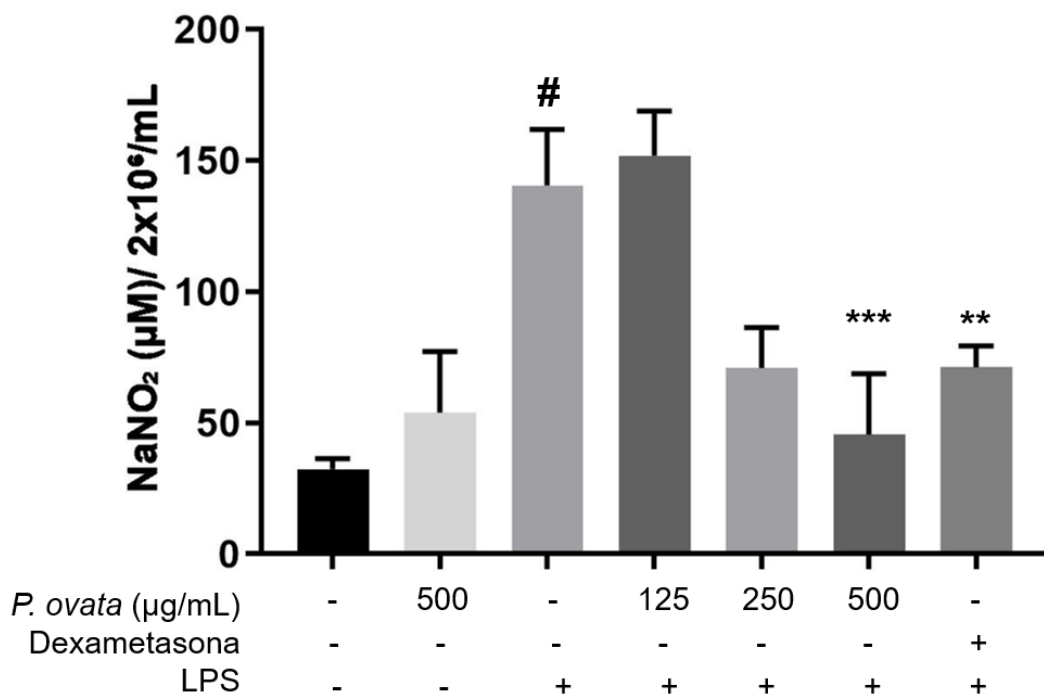


Figura 7- Quantificação de nitrito em sobrenadante de cultura de células RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações de EHE de *P. ovata* ou dexametasona (100 µM) e estimulados por LPS (10µg/mL) por 48 horas. #p<0,001 quando comparado com grupo não tratado e não estimulado; **p<0,05 ***p<0,01 quando comparado com o grupo estimulado com LPS, após teste de Kruskal-Wallis e análise de comparação múltipla de Dunn.

O óxido nítrico possui importante função como mensageiro e mediador inflamatório, cuja produção vai ser resultado da ativação de macrófagos em decorrência de um estímulo pela endotoxina LPS, devido a isso, têm sido o objetivo de diversas pesquisas o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para redução na produção desse componente e, conseqüentemente, diminuição dos sinais de ativação dos macrófagos (SHIN et al., 2015).

Os macrófagos quando estimulados por algum agente indutor da resposta inflamatória, aumentam os níveis de IFN-γ, LPS e TNF-α e acabam intensificando a produção de enzimas sintetizadoras (iNOS), que serão convertidas em óxido nítrico. Já quando estimulados a produzir IL-10, citocina anti-inflamatória, o macrófago reduzirá a produção de iNOS, diminuindo assim os níveis de produção do óxido nítrico (MONCADA e HIGGS, 1993).

O óxido nítrico produzido na célula é convertido a nitrito e nitrato, com isso, para mensuração da sua produção é realizada a quantificação do nitrito no sobrenadante das células (HOSSEINI et al., 2021). Os resultados obtidos na dosagem de nitrito do presente estudo evidenciaram que a utilização de concentrações mais elevadas do extrato foi capaz de promover redução significativa na produção de óxido nítrico. Esses achados podem ser ainda reforçados

quando comparados aos resultados de citotoxicidade, uma vez que, concentrações testadas nos diferentes grupos não comprometeram a viabilidade celular, podemos afirmar que de fato houve redução na produção de nitrito pelas células e não morte destas que também resultaria na diminuição desse composto.

Os achados do presente trabalho são semelhantes aos de Marques et al. (2017), que ao tratarem células J774 com diferentes concentrações de EHE de *S. vulgaris* observaram bloqueio significativo na produção de óxido nítrico nos macrófagos que foram tratados com as concentrações de 80 e 160 µg/mL. No trabalho em questão, os autores também não relataram atividade citotóxica e constataram redução acentuada do TNF- α nas linhagens submetidas a tratamento.

Em pesquisa desenvolvida por Ohikhena et al. (2018) que testaram diferentes concentrações das frações acética, etanólica, metanólica e aquosa extraídas das folhas de *Phragmanthera capitata*, obteve-se que a fração metanólica foi capaz de gerar redução do óxido nítrico a partir da menor concentração testada, sendo esta 25 µg/mL.

Assim, pode-se atribuir a importância em avaliar a produção de nitrito devido ao fato deste estar relacionado a uma série de funções no organismo e possuir participação no estresse oxidativo e processos inflamatórios. A confirmação do efeito anti-inflamatório de determinado extrato vegetal inclui a quantificação de diversos outros mediadores inflamatórios, além de modelos induzidos *in vivo* e por isso ressalta-se a importância na continuação das pesquisas científicas envolvendo o EHE de *P. ovata*.

A ação inibitória do óxido nítrico observada nos testes realizados é considerada um bom indicativo da ação anti-inflamatória e imunomoduladora do extrato, por este favorecer diretamente a redução de citocinas pró-inflamatórias, assim como a redução no recrutamento de leucócitos para o local.

6 CONCLUSÕES

Dado o exposto, conclui-se que o EHE de *P. ovata* analisado possui em sua composição antraquinonas, taninos, catequinas, flavanonas e flavonóis, tem atividade antioxidante, baixa citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, além de ter sido capaz de inibir a produção de óxido nítrico nestas células ao serem estimuladas por LPS.

Tais resultados enfatizam o potencial dessa planta, ainda tão pouco explorado, como uma nova fonte de matéria-prima para produção de fármacos. Além disso, a considerável ação exibida pelo EHE demonstra a importância do estudo de espécies medicinais nativas do Brasil e incentiva o desenvolvimento de pesquisas que busquem elucidar características farmacológicas, fitoquímicas e referentes ao controle de qualidade dos extratos dessas espécies.

REFERÊNCIAS

- ACÁCIO, R. S. et al. Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico de *Melochia tomentosa* Linaeus (1735). **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 412-428, 2018.
- ADENIRAN, L. A.; ASHAFI, A. O. T. Chromatographic Analysis and In Vitro Cytotoxic Properties of Different Root Extracts of *Hermannia geniculata* Eckl. & Zeyh on Vero, HepG2 And RAW 264.7 Macrophage. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 41, n. 2, p. 117-124, 2020.
- ARAÚJO, G. S. **Efeito antifúngico de antraquinonas contra *Cryptococcus neoformans* in vitro: detecção de sinergismo entre barbaloína e anfotericina B**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará, 2019.
- ARRUDA, R. et al. Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 264-274, 2012.
- BEZERRA, A. N. S. et al. Standardization and anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl.(Loranthaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 202, p. 234-240, 2016.
- BLOMHOFF, R. et al. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. S2, p. S52-S60, 2006.
- BORELLA, J. C.; CARVALHO, D. M. A. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de manipulação em Ribeirão Preto – SP. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 1, p. 13-18, 2011.
- BRAGA, J. C. B.; SILVA, L. R. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 3831-3839, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br>. Acesso em: 06 abril, 2022. (2014a).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Disponível em: <https://www.ufpb.br/nepfh/contents/documentos/resolucoes/fitoterapia/guia-de-orientacao-para-registro-de-medicamento-fitoterapico>. Acesso em: 11 mai. 2022. (2014b).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 49, de 23 de novembro de 2010. Aprova Farmacopeia Brasileira, 5ª edição e dá outras providências. 2010. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/rdc0049_23_11_2010.pdf Acesso em: 11 jun. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF), 1 ed, p.9-57, 2006. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf . Acesso em: 18 jun. 2022. (2006b).

BRASIL. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. 2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. Acesso em: 18 jun. 2022. (2009b).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: PNPIC-SUS. 2006. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html. Acesso em: 18 jun. 2022. (2006a).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf . Acesso em: 18 jun. 2022. (2009a).

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2010, p. 221-247, 2011.

CANEBA, C. A. et al. Nitric oxide is a positive regulator of the Warburg effect in ovarian cancer cells. **Cell death & disease**, v. 5, n. 6, p. e1302-e1302, 2014.

CASTRO, A. O. **Perfil químico e avaliação inibitória das enzimas α -amilase e α -glicosidase dos extratos de espécies de *Pthirusa* sp. parasita de *Syzygiumcumini* (jambolão) e *Citrus* sp.(limoeiro)**. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, 2019.

CHIARADIA, M. C. et al. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHOI, R. J. et al. Anti-inflammatory properties of anthraquinones and their relationship with the regulation of P-glycoprotein function and expression. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 272–281, 2013.

CHUKWU, C. N.; ONYEDIKACHI, U. B.; EJIOFOR, E. Evaluation of chemical constituents, antioxidant and anti-inflammatory properties of n-hexane extract of *Viscum album* L.(Mistletoe) leaves. **CMU J. Nat. Sci**, v. 21, n. 1, p. e2022010, 2022.

COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1994.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010.

DALL'ACQUA, S. et al. Vasoprotective activity of standardized *Achillea millefolium* extract. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1031-1036, 2011.

DELLA PASQUA, C. S. P. et al. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **Journal of ethnopharmacology**, v. 231, p. 50-56, 2019.

DINIZ, T. C. et al. The role of flavonoids on oxidative stress in epilepsy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, 2015.

DONNARUMMA, G. et al. AV119, a natural sugar from avocado gratissima, modulates the LPS-induced proinflammatory response in human keratinocytes. **inflammation**, v. 34, n. 6, p. 568-575, 2011.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EMAD, A. M. et al. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Characterization of Polyphenol-Enriched Extract of Egyptian Celery (*Apium graveolens* L., Apiaceae) Aerial Parts via UPLC/ESI/TOF-MS. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 698, 2022.

FERREIRA, A. L. et al. **Avaliação da capacidade antioxidante, proliferativa e/ou anti-tumoral dos extratos de acerola**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico, 2020.

FRANCISCO, K. S. F. et al. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v. 4, n. 1, p. 18-24, 2010.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature reviews Drug discovery**, v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016.

FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. **International immunopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 189-198, 2015.

GARG, V. et al. Facts about standardization of herbal medicine: a review. **Jornal of Chinese Integrative Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1077-1083, 2012.

GRAMMA, L. S. S. et al. *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.

GREEN, L. C. et al. Regulation of macrophage gene expression by pro- and anti-inflammatory cytokines. **Pathobiology**, v. 67, n. 5-6, p. 241-4, 1999.

GRIVENNIKOV, S. I. et al. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GRÜNER, J. M. et al. Análise do perfil fitoquímico de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pavon) Tieghem, Loranthaceae. **Revista Jovens Pesquisadores**, n. 1, p. 1-133 2012.

- HAMIAD, M. N.; NUMAN, I. T.; HASSAN, A. F. Evaluation of Anti-Inflammatory Effect of Ethyl Acetate and Methanol Extracts of *Loranthus europaeus* in Experimental Models of Acute Inflammation in Rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 23, p. 170-174, 2013.
- HENRIQUE, J. R. et al. Controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil: avaliação diagnóstica e propostas de intervenção. **Revista de Fitoterapia**, v. 14, n. 2, p. 129-136, 2014.
- HENRIQUES, M., G; PENIDO, C. The therapeutic properties of *Carapa guianensis*. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 6, p. 850-856, 2014.
- HOSSEINI, F. et al. Nitrate-nitrite exposure through drinking water and diet and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 5, p. 3073-3081, 2021.
- IBARRA-ALVARADO, C. et al. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 7, p. 732-739, 2010.
- INDRACANTI, M.; 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.
- ISHII, P. L.; OLIVEIRA, R. J.; OLIVEIRA, M. M. Atividades biológicas do Chá-Verde e suas implicações na prevenção do câncer. **Revista Terra & Cultura: Cadernos De Ensino E Pesquisa**, v. 24, n. 47, p. 49-57, 2018.
- JANNAT, S. et al. Protective effects of sweet orange, unshiu mikan, and mini tomato juice powders on t-BHP-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 21, n. 3, p. 208, 2016.
- KUIJT, J. Pulling the skeleton out of the closet: resurrection of *PhthirusasensuMartius* and consequent revival of *Passovia* (Loranthaceae). **Plant Diversity and Evolution**, v. 129, p. 159–211, 2011.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-16, 2013.
- KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 3, p. 101-112, 2012.
- LEVY, B. D.; SERHAN, C. N. Resolution of acute inflammation in the lung. **Annual Review of Physiology**, v. 76, p. 467-492, 2014.
- LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020.

- LIU, B. et al. Historical biogeography of Loranthaceae (Santalales): Diversification agrees with emergence of tropical forests and radiation of songbirds. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 124, p. 199-212, 2018.
- LIU, J. et al. Anti-inflammatory hydrolyzable tannins from *Myricaria bracteata*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1015-1025, 2015.
- LUIZ, M. T. Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. **Physis: revista de saúde coletiva**, v. 7, p. 13-43, 1997.
- LUIZ, R. L. F. et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2015.
- MACHADO, A. C. et al. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 2, p. 283-289, 2014.
- MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução (Descontinuada)**, v. 27, n. 1/2, 2008.
- MANSELL, A.; JENKINS, B. J. Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and tolllike receptor families: A potent combination in inflammation and câncer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, p. 249–256, 2013.
- MARCUCCI, M. C. et al. Metodologias acessíveis para a quantificação de flavonoides e fenóis totais em própolis. **Rev. Virt. Quím**, v. 13, n. 1, p. 61-73, 2021.
- MARIANO, L. A. Screening químico e biológico de extratos brutos obtidos de espécies de Loranthaceae, 2012.
- MARQUES, F. M. et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of *Struthanthus vulgaris*. **Planta Medica**, v. 83, n. 09, p. 770-777, 2017.
- MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC; 1997.
- MATTOS, G. et al. Medicinal plants and herbal medicines in Primary Health Care: the perception of the professionals/Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciência & saúde coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3735-3745, 2018.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 24, p. 428–435, 2008.
- MEERLOO, J. V.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: **Cancer cell culture**. Humana Press, p. 237-245, 2011.
- MOHAMMED, B. M. et al. Resolution of sterile inflammation: role for vitamin C. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-15, 2014.

- MOHANTA, T. K.; TAMBOLI, Y.; ZUBAIDHA, P. K. Phytochemical and medicinal importance of Ginkgo biloba L. **Natural product research**, v. 28, n. 10, p. 746-752, 2014.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England journal of medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.
- MORA, F. D. et al. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of Phthirusaadunca from Venezuelan Andes. **Natural product communications**, v. 6, n. 7, p. 1051-1053, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 56, n. 16, p. 55-63, 1983.
- MOTHANA, R. A. A. et al. Antiinflammatory, antinociceptive, antipyretic and antioxidant activities and phenolic constituents from Loranthus regularis growing in Saudi Arabia. **Planta Medica**, v. 2013, n. 79, p. 66, 2013.
- NASCIMENTO, I. J. R.; JESUS, H. S.; OLIVEIRA, H. G. A. Uso dos taninos provenientes do barbatimão para cicatrização de ferimentos. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 4, n. 8, p. 201-212, 2021.
- NAZARUK, J.; ORLIKOWSKI, P. Phytochemical profile and therapeutic potential of Viscum album L. **Nat. Prod. Res.**, v. 30, n. 4, p. 373-385, 2016.
- 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, 2018.
- OLIVEIRA, C. L. S. et al. Atividade antioxidante do extrato do fruto de *Plinia glomerata*. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 3, p. 24-24, 2021.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.
- OLIVEIRA, M.; SIMOES, M.; SASSI, C. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.
- PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, p. 115-119, 2014.
- PARK, M. Y.; KWON, H.J.; SUNG, M.K. Evaluation of aloin and aloe-emodina as antiinflammatory agents in aloe by using murine macrophages. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73, n.4, p.828-832, 2009.

PATEL, S.; PANDA, S. Emerging roles of mistletoes in malignancy management. **3 Biotech**, v. 4, p. 13-20, 2014.

PATIL, S. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity and in-vitro antioxidant activity of indian mistletoe, the hemiparasite *Dendrophthoe falcata* L. F. (Loranthaceae). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 2, p. 253-259, 2011.

PEISINO, M. C. O. **Atividade antioxidante e anti-inflamatória in vitro de plantas alimentícias não convencionais**. Tese de Doutorado. Brasil, 2018.

PREVEDELLO, M. T.; COMACHIO, G. Antioxidantes e sua relação com os radicais livres, e Doenças Crônicas Não Transmissíveis: uma revisão de literatura Antioxidants and their relationship with free radicals, and Chronic Non communicable Diseases: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 55244-55285, 2021.

PUNEETHA, G. K. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial properties of *Taxillus cuneatus* (Roth.) danser - a hemi-parasitic angiosperm. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 702-711, 2014.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RICCIOTTI, E; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RIOS, J. L. et al. Inhibition of transcription factors by plant-derived compounds and their implications in inflammation and cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 11, p. 1212-1237, 2009.

RODRIGUES, T. S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatos* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 587-590, 2011.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2006.

SAMPAIO, A. L. F. et al. Biphasic modulation of NOS expression, protein and nitrite products by hydroxocobalamin underlies its protective effect in endotoxemic shock: downstream regulation of COX-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, and HMGB1 expression. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1-20, 2013.

SANAY, F. L. R. et al. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi from *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kuijt (Mistletoe). **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n. 11, p. 263-268, 2018.

SCALON, M. C. et al. Leaf morphophysiology of a Neotropical mistletoe is shaped by seasonal patterns of host leaf phenology. **Oecologia**, v. 180, n. 4, p. 1103-1112, 2016.

SCHMID, T.; BRÜNE, B. Prostanoids and Resolution of Inflammation—Beyond the Lipid-Mediator Class Switch. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 2838, 2021.

SHIN, J. et al. Fulgicidic acid isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus* suppresses LPS-induced iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 expression by AP-1 inactivation in RAW264. 7 macrophages. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 7, p. 1081-1086, 2015.

SILVA, J. D. et al. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES MEDICINAIS DA PLANTA LIBIDIBIA FERREA. **Revista Multidisciplinar do Sertão**, v. 2, n. 2, p. 310-320, 2020.

SILVA, J. M. A. M. C. **Metabólitos secundários das macroalgas castanhas de elevado potencial para a indústria farmacêutica**. Tese de Doutorado, 2021.

SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentals of analytical chemistry**. Cengage learning, 2013. p. 958.

SORDI, R.; LIMA JR, O. M.; ASSREUY, J. Biossíntese e funções das lipoxinas na resolução da inflamação. Publicatio UEPG - **Biological and Health Sciences**, v.18, n.1, p.7- 13, 2012.

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

SUN, Y. et al. Cytochrome P450 mediated metabolic activation of chrysophanol. **Chemical-Biological Interactions**, v. 289, p. 57-67, 2018.

TANWAR, B.; MODGIL, R. Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. **Spatula Dd**, v. 2, n. 1, p. 59-68, 2012.

TÔRRES, A. R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 373-380, 2005.

TORRES, P. B. et al. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS^{•+} em microplaca. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 1-4, 2017.

USMAN, A. G.; AMMANI, H. M.; BALA, S. S. Comparative Antioxidative and Cytotoxic Activity of Extracts of *Moringa Oleifera* and its Mistletoe. **IOSR Journal of Applied Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 13-18, 2018.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VIEIRA, O. M. C. et al. Antimicrobial activity of *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 149-154, 2005.

VITTORAZZI, C. et al. Antioxidant, antimicrobial and wound healing properties of *Struthanthus vulgaris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 2, p. 331-337, 2016.

WALTER, M.; MARCHESAN, E. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 371-377, 2011.

WATSON, D. M.; HERRING, M. Mistletoe as a keystone resource: an experimental test. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1743, p. 3853-3860, 2012.

WONG, D. Z. H.; KADIR, H. A. Antioxidative and neuroprotective effects of *Loranthus parasiticus* (L.) Merr (Loranthaceae) against oxidative stress in NG108-15 cells. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 27, p. 6291-6298, 2011.

WU, S.Y. et al. Molecular characterisation of clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from Sichuan province China. **Mycoses**, v.58, n. 5, p. 280-287, 2017.

XIANG, H. et al. Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development. **App Microbiol Biotechnol**, v. 101, n. 17, p. 6671-6681, 2017.

XIE, Y. et al. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current medicinal chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

ZENI, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2703-2712, 2017.

ZHANG, J. et al. Characterization of polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the peels of 'Shatangju' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) by online high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9023-9034, 2012.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
HERBÁRIO ROSA MOCHEL - SLUI

IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

Atendendo a solicitação de Ana Leticia Marinho Figueirêdo ao Herbário Rosa Mochel da Universidade Estadual do Maranhão, segue a classificação taxonômica da amostra vegetal oferecida ao Herbário:

Família: **LORANTHACEAE**

Espécie: *Passovia ovata* (Pohl ex DC.) Tiegh.

Nome vulgar: Erva de passarinho

Obs.: No passado esta espécie chamava-se *Phthirusa ovata* (Pohl ex DC.) Eichler, porém segundo o APG IV a espécie foi classificada como *Passovia ovata* (Pohl ex DC.) Tiegh. A consulta da nova nomenclatura pode ser consultada no site da flora do Brasil (<http://reflora.jbrj.gov.br>).

A amostra foi registrada no acervo do Herbário Rosa Mochel com o seguinte número de tombo: 5516

São Luís, 14 de agosto de 2019.

A handwritten signature in black ink, reading 'Ana Maria Maciel Leite', is written over a horizontal line.

Ana Maria Maciel Leite
Curadora do Herbário SLUI