



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

**ISLA VANESSA GOMES ALVES BASTOS**

*Phoradendron mucronatum* (DC.) Krug & Urb. e *Phoradendron microphyllum* (Pohl  
ex DC.) Trel.: **COMPONENTES QUÍMICOS E BIOATIVIDADE**

**RECIFE**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

*Phoradendron mucronatum* (DC.) Krug & Urb. e *Phoradendron microphyllum* (Pohl ex DC.)

Trel.: **COMPONENTES QUÍMICOS E BIOATIVIDADE**

ISLA VANESSA GOMES ALVES BASTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biologia Química para a Saúde.

**Linha de pesquisa:** Química Medicinal e Biomolecular

**Orientador:** Prof. Dr. Sebastião José de Melo

RECIFE

2015

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Bastos, Isla Vanessa Gomes Alves**  
***Phoradendron mucronatum* (DC.) Krug & Urb. E *Phoradendron***  
***microphyllum* (Pohl ex DC.) Trel.: Componentes químicos e bioatividade/**  
**Isla Vanessa Gomes Alves Bastos- Recife: O Autor, 2015.**

120 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Sebastião José de Melo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro  
de Biociências. Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Química vegetal 2. *Phoradendron* 3. Cicatrização de ferimentos  
I. Melo, Sebastião José de (orientador). II. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-122

**ISLA VANESSA GOMES ALVES BASTOS**

*Phoradendron mucronatum* (DC.) Krug & Urb. e *Phoradendron microphyllum* (Pohl ex DC.)

Trel.: **COMPONENTES QUÍMICOS E BIOATIVIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Recife, 27 de fevereiro de 2015.

APROVADA.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. **Sebastião José de Melo** - Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Elba Lúcia Cavalcanti Amorim** - Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Profa. Dra. **Janete Magali de Araújo** - Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Profa. Dra. **Renata Patrícia Freitas Soares de Jesus** - Programa de Pós-graduação de Mestrado Profissional em Avaliação em Saúde - Diretoria de Ensino do IMIP

---

Prof. Dr. **José Antonio de Sousa Pereira Junior** - Centro de Saúde - Faculdade Escritor Osman Lins – FACOL

Dedico este trabalho e tudo alcançado na minha vida aos meus pais Marcos e Nelbe, assim como, a minha irmã Fernanda.

**“Crê em ti mesmo; age e verá os resultados  
Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar”.**

**(Chico Xavier)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que nos dá o dom da vida e nos concebe maravilhas inexplicáveis todos os dias.

Aos meus pais Marcos Bastos e Nelbe Alves, que muitas vezes sem nem mesmo entender meus objetivos, nunca mediram esforços para minha realização profissional, me incentivando para que tudo fosse alcançado com responsabilidade, honestidade e para que nunca desistisse diante das dificuldades.

À minha irmã Fernanda Bastos que sempre me incentiva, companheira que tanto admiro e torço a cada dia pela sua vitória.

Ao professor e orientador Dr. Sebastião José de Melo pela oportunidade que me foi dada, pela dedicação, orientação e amizade que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

À professora Dra. Teresinha Gonçalves da Silva do Departamento de Antibióticos com admiração e respeito, por todas as oportunidades oferecidas no meu doutorado, pela confiança, paciência e incentivo.

Ao professor Dr. Norberto Peporine Lopes, e a todos do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do estágio, pelos ensinamentos e amizades construídas.

À professora Dra. Maria Nelly Caetano Pisciotano e aos mestrandos Felipe e Danilo do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE pela realização dos ensaios antimicrobianos.

À professora Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim e aos alunos Allan, Bruno e Valerium do Laboratório de Produtos Naturais da UFPE pela realização dos testes antioxidantes.

À professora Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão e a técnica em laboratório Maria Rodrigues pela realização dos ensaios citotóxicos.

Aos colegas de pós-graduação. Em especial, Zenaide, Rômulo e George pelos momentos de lutas e sonhos compartilhados e por tornarem o dia-dia mais agradável.

A turma do Laboratório de Prospecção Farmatológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX), alunos de iniciação científica, mestrandos e doutorandos que tive o prazer de conhecer e por fazerem parte dessa minha trajetória.

À Dra. Jaciana Aguiar pelo apoio, incentivo, compreensão e amizade.

As doutorandas Larissa Corrêa e Jéssica Barbosa pela amizade, colaboração nos experimentos e análises dos resultados.

Em especial, a doutoranda Tatiana Bezerra por me ajudar na execução das tarefas do laboratório e, por me escutar em alguns momentos difíceis da minha vida.

Ao médico veterinário, José de Castro Souza Neto Júnior pelo apoio, incentivo e realização dos ensaios cicatrizantes.

À Dra. Renata Patrícia Freitas Soares de Jesus, pela amizade e por sempre torcer pelo meu sucesso.

Aos Drs. Gibson Oliveira e Antônio Pereira pela troca de experiência, convívio e descontração.

Ao funcionário do biotério Edilson, pelo auxílio com a organização dos materiais relacionados aos animais e sempre demonstrar vontade em ajudar em todos os momentos.

A todos os amigos e familiares que me apoiaram e compreenderam o motivo da minha ausência durante esse tempo.

À coordenação e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e a Adenilda Lima, secretária acadêmica, pela compreensão e atenção a mim dispensadas.

A FACEPE, pelo Auxílio à Mobilidade Discente (AMD).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa.

Espero não ter esquecido ninguém, contudo saibam que expresso minha gratidão a todos direta e indiretamente ligados ao desenvolvimento e êxito deste trabalho. Mesmo que seu nome não conste aqui, saiba que sou muito grata também.

Muito Obrigada!

Isla Vanessa Gomes Alves Bastos

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1 -</b> <i>Phoradendron mucronatum</i> . (A) planta parasitando o hospedeiro, (B) ramos, (C) detalhe da folha face abaxial, (D) inflorescência, (E) infrutescência, (F) fruto.....	27
<b>Figura 2 -</b> <i>Phoradendron microphyllum</i> . (A) ramos e folhas, (B) detalhe da inflorescência.....	28
<b>Figura 3 -</b> Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), derivados de enxofre (ERS), de cloro (ERCl), de carbono (ERC) e metais de transição [M <sup>n+</sup> ].....	35
<b>Figura 4 -</b> Componentes básicos de um cromatógrafo a gás.....	37
<b>Figura 5 -</b> Principais etapas da resposta inflamatória.....	43
<b>Figura 6 -</b> Tipos de cicatrização: por primeira e segunda intenção.....	46
<b>Figura 7 -</b> Esquema representando a divisão do processo de reparo tecidual e definição entre regeneração e cicatrização.....	47
<b>Capítulo 1 – Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of <i>Phoradendron mucronatum</i> and <i>Phoradendron microphyllum</i> (Viscaceae)</b>	
<b>Figure 1 -</b> Constituents identified in extracts of leaves of <i>P. mucronatum</i> by GC/MS with the highest similarity indices or equal to 90%..	73
<b>Capítulo 3: Avaliação da toxicidade aguda, anti-inflamatória e cicatrizante do extrato das folhas de duas espécies do gênero <i>Phoradendrom</i></b>	

<b>Figura 1 –</b>	Fotomicrografia do fígado dos grupos Controle - Salina (A), <i>P. microphyllum</i> (B) e <i>P. mucronatum</i> (C) HE: 100x.....	111
<b>Figura 2 –</b>	Fotomicrografias do rim dos grupos Controle - Salina (A), <i>P. microphyllum</i> (B) e <i>P. mucronatum</i> (C). HE: 400x.....	112
<b>Figura 3 –</b>	Fotomicrografia do baço dos grupos Controle - Salina (A), <i>P. microphyllum</i> (B) e <i>P. mucronatum</i> (C).HE: 100x.....	113
<b>Figura 4 -</b>	Comparação do percentual da área de contração das feridas nos dias 3, 7, 14 e 21 após tratamento com creme base Polowaz (CN), creme do EMB 5% das folhas de <i>P. mucronatum</i> (T1) e creme do EMB 5% das folhas de <i>P. microphyllum</i> (T2) e Dexpanthenol (50 mg/g) (CP).....	113
<b>Figura 5 -</b>	Fotomicrografia da reação inflamatória no 3º dia (grupo CN). A reação inflamatória foi intensa, com células mononucleares e polimorfonucleares. HE: 100x.....	114
<b>Figura 6 -</b>	Fotomicrografias de feridas cutâneas no 7º dia de tratamento. HE: 100x.....	114
<b>Figura 7 -</b>	Fotomicrografia da presença do tecido de granulação e neovascularização no 7º dia. Os animais foram tratados com o creme do EMB 5% das folhas de <i>P. microphyllum</i> (T2) na dose de 50 mg/kg. HE: 100x.....	115
<b>Figura 8 -</b>	Fotomicrografia da presença de fibrose no 14º dia do grupo tratado com o creme do extrato metanólico de <i>P. mucronatum</i> . Observa-se fibras de colágeno, sob a nova epiderme (avaliação de reepitelização). Seções coradas com HE: 100x.....	115

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais.....	33
 <b>Capítulo 1:</b> Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of <i>Phoradendron mucronatum</i> and <i>Phoradendron microphyllum</i> (Viscaceae)	
<b>Tabela 1.</b> Constituents identified in extracts of leaves of <i>P. microphyllum</i> by GC/MS with the highest similarity indices or equal to 90%.....	74
<b>Tabela 2.</b> Cell growth inhibition percentage (%) of the extracts from leaves of <i>P. microphyllum</i> and <i>P. mucronatum</i> in three tumor cell lines at a concentration of 50 µg/mL by MTT method after 72 hours incubation.....	76
 <b>Capítulo 2:</b> Avaliação das atividades biológicas <i>in vitro</i> dos extratos metanólicos de duas espécies do gênero <i>Phoradendron</i> (Viscaceae)	
<b>Tabela 1.</b> Teor de fenóis totais (TFT), teor de taninos totais (TTT), teor de flavonóides totais (TFLT) e atividade antioxidante dos extratos metanólicos de duas espécies do gênero <i>Phoradendron</i> .....	84
<b>Tabela 2.</b> Atividade antimicrobiana do extrato metabólico bruto das folhas de <i>P. microphyllum</i> e <i>P. mucronatum</i> através do método de difusão em Àgar.....	86
<b>Tabela 3.</b> Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos EMB das folhas de <i>P. mucronatum</i> e <i>P. microphyllum</i> em três linhagens tumorais na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT após	

72 h de incubação..... 87

**Tabela 4.** Valores da concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e o intervalo de confiança (IC 95%) dos EMB das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* referente a atividade hemolítica..... 88

**Capítulo 3:** Avaliação da toxicidade aguda, anti-inflamatória e cicatrizante do extrato das folhas de duas espécies do gênero *Phoradendron*

**Tabela 1.** Efeito dos extratos metanólicos das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* sobre parâmetros fisiológicos de camundongos *Swiss* (n=6 animais/grupo)..... 100

**Tabela 2.** Efeito dos extratos metanólicos das folhas de *Phoradendron mucronatum* e *Phoradendron microphyllum* sobre a migração celular para o bolsão de ar..... 102

**Tabela 3.** Efeito dos extratos metanólicos das folhas de *Phoradendron mucronatum* e *Phoradendron microphyllum* sobre a permeabilidade vascular..... 103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de etila  
ANOVA – Análise de Variância  
APG – *Angiosperm Phylogeny Group*  
CaCl<sub>2</sub> – cloreto de cálcio  
CAT – catalase  
CCD – cromatografia em camada delgada  
CE<sub>50</sub> – Concentração Efetiva 50%  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
CF – Clorofórmio  
CG – Cromatografia Gasosa  
CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa  
CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
CI<sub>50</sub> – Concentração Inibitória 50%  
CIT – Cromatograma de íons totais  
CN – Controle Negativo  
CP – Controle Positivo  
DB-5MS – 5 % - fenil – metilpolisiloxano  
DCM – Diclorometano  
DL<sub>50</sub> – Dose letal 50%  
DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA – ácido desoxiribonucléico  
DP – desvio padrão  
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil  
EAT – equivalentes de ácido tânico  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EM – Espectrometria de Massa  
EMB – Extrato Metanólico Bruto  
ER – espécies reativas  
ERC – espécies reativas de carbono  
ERCl- espécies reativas de cloro  
ERNs – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio  
ERS – espécies reativas de enxofre  
EtOAc – acetate de etila  
eV – elétron volts  
FE – Fase Estacionária  
FM – fase móvel  
Fe<sup>3+</sup>-TPTZ – complex férrico - tripiridiltriaquina  
FRAP – Poder de redução férrica  
GPx – glutatona peroxidase  
GR – glutatona redutase  
GSH – glutatona reduzida  
GST – glutatona S-transferase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
HE – Hematoxilina Eosina  
HeLa – Carcinoma de cérvix uterina humana  
HEp-2 – Carcinoma de laringe humana  
HIV – vírus da imunodeficiência humana  
HSV-1 – vírus de DNA  
Hx - hexano  
IC% – percentual de inibição de crescimento celular  
IE – Impacto de elétrons  
IFN- $\gamma$  – Interferon gamma  
IL-2 – Interleucina 2  
IL-6 – Interleucina 6  
IL-12 – Interleucina 12  
IL-23 – Interleucina 23  
i.p. – intraperitoneal  
IPA – Instituto Agrônomo de Pernambuco  
IQ – Ionização Química  
KB – carcinoma de nasofaringe  
kDa – kilo Dalton  
LTB<sub>4</sub> – Leucotrieno B<sub>4</sub>  
MCF-7 – Adenocarcinoma de mama humano  
[M<sup>n+</sup>] – Metais de transição

MeOH – Metanol  
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)  
n – número de amostra  
NaCl – cloreto de sódio  
NCI-H69 – Carcinoma de pulmão humano  
NCIH292 – Carcinoma mucoepidermóide  
NO – óxido nítrico  
OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico  
p – nível de significância  
PBS – *Phosphate-buffered saline*  
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas  
PGD2 – prostaglandina D2  
PGE2 – prostaglandina E2  
PGI2 - prostaciclina  
RL – radicais livres  
RS<sup>\*</sup> – radicais derivadas de tióis  
SAB – Sabouraud  
SE – Solução de Eritrócitos  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SOD – superóxido dismutase  
T1 – teste 1 EMB de *P. mucronatum* na concentração de 50 mg/g  
T2 – teste 2 EMB de *P. microphyllum*, na concentração de 50 mg/g  
TC-1 – células cancerígenas de pulmão murinho  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  
TGF- $\beta$  – fator de crescimento de transformação beta  
TFLT – teor de flavonoides totais  
TFT – teor de fenóis totais  
TTT – teor de taninos totais  
UFC – unidade formadora de colônias  
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco  
v.o. – via oral

## RESUMO

O gênero *Phoradendron* Nutt. compreende um grande número de espécies hemiparasitas conhecidas popularmente como ervas-de-passarinho. A medicina popular atribui a este gênero algumas propriedades farmacológicas como: cicatrizante, analgésica e anticancerígena. Assim, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo fitoquímico e biológico dos extratos das folhas de *Phoradendron microphyllum* e *Phoradendron mucronatum*. Os constituintes químicos dos extratos obtidos por maceração em hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila foram analisados por CG/EM. A atividade citotóxica desses extratos foi avaliada utilizando as linhagens celulares HEP-2, NCI-H292, MCF-7. Além desses, foram realizados estudos com os extratos metanólicos das folhas de ambas as espécies. O perfil fitoquímico foi analisado por cromatografia em camada delgada, com diferentes fases móveis e reveladores. O conteúdo de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu; o teor de flavonóides totais pelo complexo formado entre o flavonóide e o alumínio reagente; o teor de taninos pela precipitação com caseína e a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH. Para avaliação do potencial hemolítico foram usados eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*) e nos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens celulares HEP-2, NCI-H292, MCF-7. A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em Ágar. Para determinação da toxicidade aguda foram utilizados camundongos Swiss, aos quais foram administrados uma dose de 2.000 mg/kg por via oral. A atividade anti-inflamatória foi analisada pelos métodos de bolsão de ar subcutâneo e permeabilidade vascular induzida por ácido acético. O potencial cicatrizante dos extratos em feridas cutâneas foi realizado em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) por meio de avaliações histológicas. A análise por CG/EM dos extratos das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum*, possibilitou detectar 51 constituintes de diferentes classes de compostos e apresentaram atividade citotóxica frente as três linhagens testadas. No extrato metanólico das folhas, o perfil fitoquímico evidenciou: açúcares redutores, flavonóides, alcalóides, triterpenos/esteróides, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, proantocianidinas e leucoantocianidina. O conteúdo fenólico total dos extratos metanólicos das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* foi  $479,64 \pm 44,07$  e  $139,42 \pm 10,78$  mg equivalente de ácido tânico/g dos extratos, respectivamente. O extrato metanólico de *P. mucronatum* apresentou atividade antioxidante. Os extratos metanólicos se mostraram inativos frente à hemólise das hemácias e apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem HEP-2. Não foi evidenciada atividade bacteriana frente às linhagens testadas, exceto para o fungo *Candida albicans*. No ensaio de toxicidade aguda, os animais apresentaram algumas reações tóxicas, porém não letais na dose administrada. Os extratos metanólicos reduziram a migração celular assim como inibiram o aumento da permeabilidade vascular em camundongos com o tratamento por via oral. O creme contendo os extratos metanólicos das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* apresentou efeito cicatrizante, reduzindo a área de contração da ferida. Os resultados obtidos mostram que *P. microphyllum* e *P. mucronatum* podem ser uma fonte de metabólitos secundários além de apresentar atividades biológicas significativas. No entanto, estudos posteriores serão necessários para isolar e identificar os principais constituintes químicos assim como os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas atividades.

**Palavras-chave:** Fitoquímica. Citotoxicidade. Antimicrobiano. Toxicidade aguda. Anti-inflamatório. Cicatrização de feridas.

## ABSTRACT

The genus *Phoradendron* Nutt. comprises a large number of hemiparasite species popularly known as herbs-to-bird. Popular medicine attributes to this genus some pharmacological properties such: healing, analgesic and anti-cancer. Thus, the objective of this work was to carry out a phytochemical and biological study of leaves extracts of *Phoradendron microphyllum* and *Phoradendron mucronatum*. The chemical constituents of extracts obtained by maceration in hexane, dichloromethane, chloroform and ethyl acetate were analyzed by GC/MS. The cytotoxic activity of these extracts was evaluated using the Hep-2, NCI-H292, MCF-7 cell lines. In addition, studies were carried out with the methanolic extracts of leaves of both species. The phytochemical profile was analyzed by thin layer chromatography, with different mobile phases and revelators. The content of total phenols was determined by the Folin-Ciocalteu method; the total flavonoid content by the complex formed between the flavonoid and the aluminum reagent; the tannin content by casein precipitation and the antioxidant activity by the DPPH radical sequestration method. In order to evaluate the hemolytic potential, erythrocytes of Swiss mice (*Mus musculus*) were used and the cell lines HEp-2, NCI-H292, MCF-7 were used in the cytotoxicity assays. The antimicrobial activity was performed by the diffusion method in Agar. To determine the acute toxicity, Swiss mice were given a dose of 2,000 mg/kg orally. The anti-inflammatory activity was analyzed by the methods of pockets of subcutaneous air and vascular permeability induced by acetic acid. The wound healing potential of extracts from cutaneous wounds was performed in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) by means of histological evaluations. GC/MS analysis of leaves extracts of *P. microphyllum* and *P. mucronatum* allowed to detect 51 constituents of different classes of compounds and presented cytotoxic activity against the three strains tested. In the methanolic extract of the leaves, the phytochemical profile evidenced: reducing sugars, flavonoids, alkaloids, triterpenes/steroids, monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes, proanthocyanidins and leucoantocianidina. The total phenolics content of the methanolic extracts of the *P. microphyllum* and *P. mucronatum* leaves was  $479.64 \pm 44.07$  and  $139.42 \pm 10.78$  mg tannic acid equivalent/g of the extracts, respectively. The methanolic extract of *P. mucronatum* showed antioxidant activity. The methanolic extracts proved inactive against the erythrocyte hemolysis and showed cytotoxic activity against the HEp-2 lineage. There was no evidence of bacterial activity against the tested strains, except for the fungus *Candida albicans*. In the acute toxicity test, the animals had some toxic but non-lethal reactions at the dose administered. The methanolic extracts reduced cell migration as well as inhibited increased vascular permeability in mice with oral treatment. The cream containing the methanolic extracts of leaves of *P. microphyllum* and *P. mucronatum* showed wound healing effects, reducing wound contraction area. The results obtained show that *P. mucronatum* and *P. microphyllum* can be a source of secondary metabolic compounds besides showing significant biological activities. However, further studies will be needed to isolate and identify the main chemical constituents as well as the possible mechanisms of action involved in the activities.

**Keywords:** Phytochemical. Cytotoxicity. Antimicrobial. Acute toxicity. Anti-inflammatory. Wound healing.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
3.1	BOTÂNICA: ORDEM SANTALALES.....	24
3.2	BOTÂNICA : FAMÍLIA VISCACEAE.....	24
3.2.1	<i>Phoradendron</i> .....	25
3.2.2	<i>Phoradendrom mucronatum</i> (DC.) Krug & Urb. ....	26
3.2.3	<i>Phoradendrom microphyllum</i> (Pohl ex DC.) Trel.....	28
3.3	ESTUDOS DO GÊNERO <i>Phoradendron</i> .....	28
3.3.1	Uso Popular.....	28
3.3.2	Fitoquímica.....	29
3.3.3	Atividades Biológicas.....	30
3.4	ASPECTOS DA INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO.....	31
3.5	ESPÉCIES REATIVAS, ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	33
3.6	CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)/ESPECTROMETRIA DE MASSA (EM) ....	36
3.7	ANTIMICROBIANO.....	38
3.8	CITOTOXICIDADE.....	39
3.9	TOXICIDADE AGUDA.....	41
3.10	PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	42
3.11	CICATRIZAÇÃO.....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
	<b>Capítulo 1</b> – Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of <i>Phoradendron mucronatum</i> and <i>Phoradendron microphyllum</i> (Viscaceae). ....	60
	<b>Capítulo 2</b> – Avaliação das atividades biológicas <i>in vitro</i> dos extratos metanólicos de duas espécies do gênero <i>phoradendron</i> (viscaceae).....	77
	<b>Capítulo 3</b> – Avaliação da toxicidade aguda , anti-inflamatória e cicatrizante do extrato das folhas de duas espécies do gênero <i>Phoradendron</i> .....	94
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	116
	<b>APÊNDICE A</b> – Tabela com os micro-organismos utilizados na atividade	

antimicrobiana.....	118
<b>APÊNDICE B</b> – Resultado do perfil fitoquímico do extrato MeOH das folhas de <i>P. mucronatun</i> e <i>P. microphyllum</i> .....	119
<b>ANEXO – A:</b> Tabela com os sistemas cromatográficos empregados na prospecção fitoquímica dos extratos MeOH das folhas de <i>P.micrphyllum</i> e <i>P. mucronatum</i> .....	120
<b>ANEXO B – Comitê de Ética</b> .....	121

## 1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, populações de vários países usam os produtos naturais com o intuito de tratar diversas patologias de forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos. As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial porque constitui uma rica fonte na obtenção de moléculas bioativas (VEIGA-JÚNIOR; MELLO, 2008).

Planta medicinal é qualquer espécie vegetal, que administrada ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, tem por finalidade prevenir e tratar doenças ou aliviar sintomas de uma doença (CARVALHO, 2001; DI STASI, 2007). A contribuição das plantas medicinais no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é proveniente dos metabólitos secundários que atuam de forma direta ou indireta no organismo, inibindo ou ativando importantes alvos moleculares (CALIXTO, 2005).

Dentre os diferentes grupos vegetais podemos destacar a ordem Santalales que de um modo geral é caracterizada pelo hábito parasítico das espécies, embora são conhecidas também espécies não parasitas (NICKRENT et al., 2010).

Um dos tipos de parasitismo por plantas é o realizado pelas hemiparasitas que apesar de possuir clorofila e executar a função de fotossíntese, utilizam uma planta hospedeira para absorver a água e os nutrientes diretamente do xilema da planta parasitada. Plantas hemiparasitas podem apresentar diferentes estratégias de uso dos recursos em relação às suas hospedeiras (LAMBERS; CHAPIN, 2008).

O estudo de hemiparasitas tem grande importância para a ecologia e botânica econômica, devido aos danos que ocorrem nas culturas agrícolas, florestas e da silvicultura. Tem sido relatado que a presença de hemiparasitas no hospedeiro promova interferências no desenvolvimento normal, no fenótipo e na saúde, principalmente com a extração de nutrientes, espaços e danos mecânicos aos pontos de contato (VENTOSA; OVIEDO, 2002).

Porém, algumas espécies hemiparasitas têm sido estudadas tanto na fitoquímica quanto na farmacologia, pois apresentam indicação popular para curar ou controlar uma grande variedade de doenças tais como distúrbios gastrointestinais, diabetes, dores de reumatismo, hipertensão, hemorragia uterina dentre outras (AGRA et al., 2008).

O uso popular e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; AGRA et al., 2008). Estudos toxicológicos são realizados para avaliar a idéia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, não apresentam efeitos tóxicos ou adversos, e demonstrar que somente o uso popular de plantas medicinais não serve para garantir a eficácia

destes medicamentos (CRAVEIRO et al., 2008; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008). É fundamental, estabelecer a segurança e qualidade das preparações de uma planta medicinal, assim como o conhecimento prévio dos constituintes químicos incluindo isolamento, caracterização e ensaios de bioatividade.

Neste contexto, o referido trabalho pesquisou duas espécies do gênero *Phoradendron*, o *Phoradendron mucronatum* (DC.) Krug & Urb. e *Phoradendron microphyllum* (Pohl ex DC.) Trel., buscando informações etnobotânicas e etnomedicinais na literatura científica, assim como realizou estudos fitoquímicos e biológicos, permitindo incorporar informações indispensáveis ao estudo de plantas medicinais.

## 2 OBJETIVOS

Nesta seção, são indicados os objetivos abordados para realização do trabalho sobre as espécies *Phoradendron microphyllum* e *Phoradendron mucronatum*.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos de caracterização química e atividade biológica dos extratos das folhas de *Phoradendron mucronatum* (DC.) Krug & Urb. e *Phoradendron microphyllum* (Pohl ex DC.) Trel.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as classes ou metabólitos secundários dos extratos hexânico, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e metanólico das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum*;
- Verificar o potencial citotóxico dos extratos hexânico, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* frente às linhagens tumorais humanas;
- Determinar o teor de fenóis totais, taninos e flavonóides presentes nos extratos metanólicos brutos das folhas *P. mucronatum* e *P. microphyllum*;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos metanólicos brutos das folhas *P. mucronatum* e *P. microphyllum*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos brutos das folhas *P. mucronatum* e *P. microphyllum*;
- Analisar as atividades hemolítica e citotóxica dos extratos metanólicos brutos das folhas *P. mucronatum* e *P. microphyllum*;

- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos metanólicos brutos das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* por via oral;
- Investigar o efeito anti-inflamatório dos extratos metanólicos brutos das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum*;
- Determinar a atividade cicatrizante dos extratos metanólicos brutos das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção aborda a fundamentação teórica adotada para tratar o tema da pesquisa.

#### 3.1 BOTÂNICA: ORDEM SANTALALES

Esta ordem contém 18 famílias, cerca de 160 gêneros e aproximadamente 2.200 espécies. É caracterizada pelo hábito parasítico de suas espécies (holo ou hemiparasitas), no entanto, também são encontradas cerca de 60 espécies não-parasitas. Distribui-se por todos os continentes, exceto na Antártida, e a maior diversidade concentra-se nas regiões tropicais (NICKRENT et al., 2010).

A ordem Santalales foi enquadrada por Cronquist (1981) na suclasse Rosidae, sendo composta por dez famílias: Medusandraceae (atualmente sem ordem definida), Dipentodontaceae (atualmente em Huerteales), Olacaceae, Opiliaceae, Santalaceae, Misodendraceae, Loranthaceae, Viscaceae, Eremolepidaceae (atualmente em Santalaceae *s.l.*) e Balanophoraceae. Kuijt (1969) e Takhtajan (1997) não reconhecem Balanophoraceae incluída em Santalales, tendo este último autor as tratado em sua própria ordem, Balanophorales.

Na classificação proposta pelo Angiosperm Phylogeny Group (APG III) (2009) são reconhecidas sete famílias nesta ordem: Balanophoraceae, Loranthaceae, Misodendraceae, Santalaceae (incluindo Viscaceae e Eremolepidaceae), Olacaceae, Opiliaceae e Schoepfiaceae.

Em relação à filogenia de Santalales, várias tendências evolutivas são observadas, como a mudança de hábito, inicialmente não-parasítico para parasítico na maior parte das espécies. O parasitismo de ramos aéreos é derivado em relação ao parasitismo de raízes (VIDAL-RUSSELL; NICKRENT, 2008). O holoparasitismo parece ser também uma condição derivada no grupo (KUIJT, 1969).

#### 3.2 BOTÂNICA : FAMÍLIA VISCACEAE

Composta por plantas que crescem em galhos de árvores ou arbustos hospedeiros, estabelecendo uma conexão com o xilema deste para retirar água e alguns nutrientes (KUIJT, 1969). Representantes dessa família em conjunto com as hemiparasitas aéreas da família

Loranthaceae Juss são conhecidos de uma forma geral como “ervas-de-passarinho”, “mistletoe”, “gui” e “mistel”, além de outros (MATHIASSEN et al., 2008).

Viscaceae é uma das três famílias que possuem representantes hemiparasitas de ramos aéreos (ARRUDA et al., 2012). Contém cerca de 520 espécies com distribuição cosmopolita (NICKRENT et al., 2010). Dentre os sete gêneros atualmente reconhecidos, dois são exclusivos do continente americano: *Dendrophthora* (110 espécies) e *Phoradendron* (234 espécies) (ASHWORTH, 2000).

Os dois gêneros são morfologicamente muito semelhantes. A diferença entre eles são o número de lóculos da antera, dois em *Phoradendron* e um em *Dendrophthora*. Uma segunda diferença entre eles seria os nichos ecológicos ocupados, enquanto *Phoradendron* ocorre preferencialmente em baixas e médias altitudes, o gênero *Dendrophthora* é encontrado em grandes altitudes (WIENS; BARLOW, 1971).

No Brasil, o gênero *Phoradendron* apresenta a maior diversidade com cerca de 60 espécies distribuídas em todos os domínios fitogeográficos, enquanto que *Dendrophthora* possui apenas três espécies e com distribuição restrita (Amazônia, Floresta Atlântica, Cerrado e Caatinga) (CAIRES; DETTKE, 2010; ARRUDA et al., 2012).

Foi a partir do trabalho de Barlow (1964), o qual reúne evidências morfológicas, especialmente de cunho embriológico, para a distinção de Loranthaceae e Viscaceae, que a família passou a ser amplamente aceita na literatura científica.

### 3.2.1 *Phoradendron*

O gênero *Phoradendron* foi nomeado por Nuttall (1848) que o diferenciou de *Viscum* seu equivalente do Velho Mundo (do grego *phor-* um ladrão, e *dendron-* árvore).

É considerado o mais numeroso da família Viscaceae e as espécies que compõem esse gênero são hemiparasitas sobre angiospermas ou gimnospermas, ocorrem de forma agrupada ou esparsa sobre o hospedeiro. É um gênero neotropical com 234 espécies encontradas desde o sudeste dos Estados Unidos e América Central, incluindo Caribe, alcançando Peru, Bolívia, Argentina e Brasil (KUIJT, 2003).

Quanto ao habitat, tais espécies ocorrem em ambientes tão diversos quanto desertos e florestas tropicais. No Brasil, as hemiparasitas são heliófitas e ocupam o dossel das matas, recebendo maior insolação, sendo poucas as formas esciófitas, do interior da floresta, as quais assumem coloração verde mais intensa. Essas plantas manifestam esclerofilia, sendo comuns

espécies providas de folhas grossas, duras ou suculentas e ramos fortemente lignificados (RIZZINI, 1978).

### 3.2.2 *Phoradendrom mucronatum* (DC.) Krug & Urb.

Segundo Rigon (2013), é uma erva hemiparasita (Figura 1 A), monóica, com caule quadrangulare formando arestas muito leves. Os entrenós têm 3 – 5,6 cm x 0,2 – 0,3 cm, furcados ou ramosos; com 1 a 2 pares de catafilos basais (Figura 1 B).

As folhas são elípticas, obovadas ou orbiculares, com base atenuada e ápice arredondado com dimensão de 2,9 – 5,1 x 1,3 – 2,4 cm, nervação do tipo acródroma, a nervura central proeminente na face abaxial e margem inteira. O pecíolo tem 0,3 – 0,6 cm comp., 0,1 – 0,2 cm de largura (Figura 1 C).

As inflorescências estão dispostas em espigas articuladas (3-4 artículos), com 1 a 3 espigas por axila, medindo 0,8 – 0,9 cm de comprimento a 1,8 cm de largura, com 3 flores por bráctea fértil. As flores estaminadas tem 1 mm de diâmetro, 1 flor apical em cada artículo com 3 anteras biloculares sésseis e estigma rudimentar. As flores pistiladas têm pistilo discóide e breve estilete; pétalas abertas (Figura 1 D e E). Os Frutos são do tipo baga, ovóides, com 0,3 x 0,45 cm e verrucosos (Figura 2 F). Essa espécie floresce e frutifica o ano todo.

Está distribuída na Ilha de São Domingos e Antilhas Menores, México, Belize, Guatemala, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, e Argentina (KUIJT, 2003).

No Brasil, ocorre nas regiões Norte: Amazonas, Pará e Tocantins; Nordeste: Maranhão, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Bahia; Centro-Oeste: Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul; Sudeste: Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro e Sul: Paraná (CAIRES; DETTKE, 2010).

**Figura 1** – *Phoradendron mucronatum*. (A) planta parasitando o hospedeiro, (B) ramos, (C) detalhe da folha face abaxial, (D) inflorescência, (E) infrutescência, (F) fruto.



### 3.2.3 *Phoradendrom microphyllum* (Pohl ex DC.) Trel

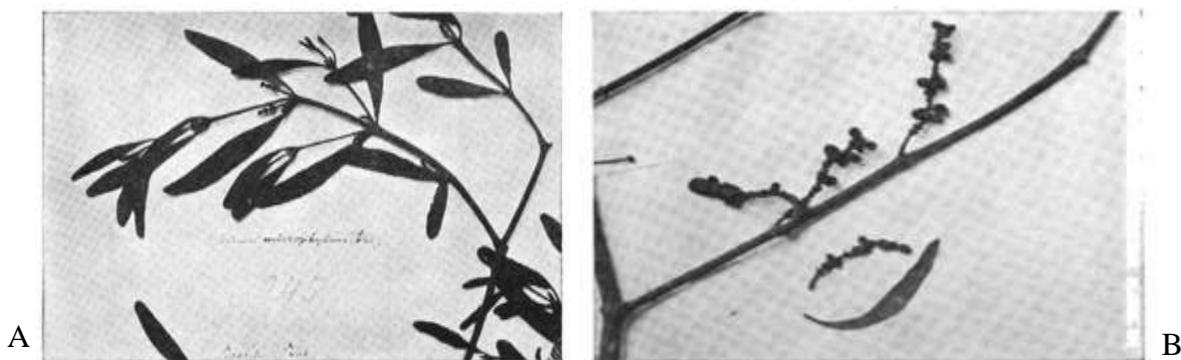
Segundo Trelease (1916), são ervas hemiparasitas, pseudo dicotômica, com caules quadrangulares e ramos moderados. Os entrenós são bastante curtos (1 – 2 x 20 – 40 mm), lisos e com 1 par de catafilos basais ou quase basais (5 mm acima da base) (Figura 2 A).

As folhas são lanceoladas ou espatuladas, com base e ápice atenuados, com dimensão de 3 – 7 x 2,5 – 4 cm (Figura 2 B).

As inflorescências estão dispostas em espigas curtas articuladas (3 artículos finos), com 1 espiga por axila, medindo 10 – 30 mm. O pedúculo das flores tem aproximadamente 2 – 5 mm de comprimento e as sépalas são estreitamente inflexíveis. Os frutos são do tipo elipsóide, com 3 x 4 mm e lisos.

No Brasil, ocorre nas regiões Centro-Oeste (Distrito Federal); Nordeste (Bahia, Pernambuco); Sudeste (Rio de Janeiro) e Sul (Paraná).

**Figura 2** – *Phoradendron microphyllum*. (A) ramos e folhas, (B) detalhe da inflorescência.



Fonte: TRELEASE, 1916.

## 3.3 ESTUDOS DO GÊNERO *Phoradendron*

### 3.3.1 Uso Popular

A parte aérea de *P. amplifolium* Nutt. é usada pelo povo nativo do Sul do México no tratamento de erisipela, infecções locais, caxumba, tumor, reumatismo e cicatrização (FREI et al., 1998).

Na medicina tradicional mexicana, as partes aéreas de *P. serotinum* (Raf.) M.C. Johnst são usadas para tratar dores no corpo, câncer, diabetes, infecções no trato urinário, varizes e dismenorréia (JACOBO-SALCEDO et al., 2011).

A decocção das folhas de *P. vernicosum* Greenm é usada externamente como banhos no tratamento de doenças de pele (CAAMAL-FUENTES et al., 2011).

No Nordeste do Brasil, *P. mucronatum* tem sido utilizada medicinalmente pelas comunidades rurais do Riacho da Catingueira e Horizonte para tratar reumatismo (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010) e sarampo (LOZANO et al., 2014).

### 3.3.2 Fitoquímica

Os extratos aquoso e acetato de etila das folhas de *P. tomentosum* resultaram no isolamento de flavonóides como vitexina, 6-C-glicosil-8-C-arabinosil apigenina e 6-C-arabinosil-8-C-glicosilapigenina, apigenina 4'-O-glicoside e apigenina (DOSSAJI et al., 1983).

Um triterpeno (ácido oleanólico) foi identificado na planta inteira da espécie *P. juniperinum* (KASHIWADA et al., 1998).

O *screening* fitoquímico das folhas em diferentes extratos (hexano, diclorometano, etanol e aquoso) de *P. crassifolium* Eichl. demonstrou a presença de saponinas, flavonóides e taninos (GONZALES, 2000).

Rios et al. (2001) isolou um triterpeno tetracíclico (ácido 3,4-seco-olean-18-eno-3,28-diólico) das partes aéreas de *P. reichenhachianum*.

O extrato metanólico das folhas e do caule de *P. liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. apresentou C-glicosilflavonas (Apigenina-6-C-glicosídeo, Apigenina-6-C-galactosídeo, Apigenina-8-C-glucosídeo, Luteolina-6-C-xilosídeo-8-C-glicosídeo) e proantocianidina (apigeninidina). Uma lectina galactosídeo de 70 kDa, denominada L-Phl foi isolada do extrato aquoso de *P. liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl (VARELA et al., 2004).

Estudos fitoquímicos têm demonstrado a presença de vitexina um flavonóide C-glicosilado no extrato etanólico das folhas de *P. serotinum* (Raf.) M.C. Johnst (ALONSO-CASTRO et al., 2012).

Foi identificado no extrato acetônico das folhas de *P. brachystachyum*, o ácido morólico como componente principal, além de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, triacantanol, esqualeno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, lupeol, lupenona, uma variedade de aldeídos e ácidos fenólicos (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2013).

### 3.3.3 Atividades Biológicas

Os extratos etanólico e aquoso de *P. crassifolium* (Polh) Eichler apresentaram baixa toxicidade nas concentrações 125 µg/ml e 500 µg/ml frente a cultura de células HeLa (carcinoma de cérvix uterina humana), respectivamente (ABAD et al., 1999).

Phoratoxinas isoladas de *P. tomentosum* apresentaram atividade citotóxica frente a dez linhagens celulares diferentes. Os resultados mais significativos foram observados frente à linhagem NCI-H69 (Carcinoma de pulmão humano) (JOHANSSON et al., 2003).

O extrato metanólico das folhas de *P. vernicosum* Greenm apresentou moderada atividade citotóxica frente a linhagem celular de carcinoma de nasofaringe (KB) (CI<sub>50</sub> = 29 µg/mL) (CAAMAL-FUENTES et al., 2011).

O extrato aquoso das folhas de *P. serotinum* (Raf.) M.C. Johnston exerceu efeitos tóxicos ativos contra as células cancerosas MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) (CI<sub>50</sub> = 28 µg/mL) (JACOBO-SALCEDO et al., 2011).

O extrato etanólico das folhas *P. serotinum* (Raf.) M. C. Johnston apresentou atividade citotóxica (CI<sub>50</sub> = 5,1 ± 0,6 µg/mL) e apoptóticas na dose de 5 µg/ml contra células TC-1 (células cancerígenas de pulmão murino). O extrato nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg, administrados por via intraperitoneal, após um tratamento de 25 dias inibiu o crescimento do tumor TC-1 nos camundongos em 18%, 40% e 69%, respectivamente (ALONSO-CASTRO et al., 2012).

A parte aérea de *P. amplifolium* apresentou elevada atividade no ensaio anti-fúngico e fraca atividade nos ensaios antibacterianos (FREI et al., 1998).

O extrato em diclorometano do caule de *P. obtusissimum* (Miq.) Eichl na dose de 50 µg/ml apresentou atividade antimicobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* com percentual de inibição de 69% (GRAHAM et al., 2003).

O extrato aquoso das folhas de *P. longifolium* Eichler ex. Trel. apresentou alto potencial antimicrobiano contra *Acinetobacter lwoffii* cujo halo de inibição foi igual e maior a 15 milímetros (JACOBO-SALCEDO et al., 2011).

O extrato aquoso de *P. crassifolium* (Polh). Eichler apresentou atividade antiviral contra HSV-1 (um vírus de DNA) nas concentrações de 125 a 500 µg/ml (ABAD et al., 1999).

Os extratos em diclorometano e aquoso de *P. crassifolium* Eichl. apresentaram respectivamente, atividade citoprotetora de 71,4 % e 90,0 % na mucosa gástrica em modelo de ulcera induzida por etanol (GONZALES, 2000).

O extrato aquoso das folhas de *P. serotinum* estimulou a proliferação das células mononucleares do sangue periférico humano com atividade similar ao comparado com fitohemaglutinina 1 µg/ml (JACOBO-SALCEDO et al., 2011).

O extrato etanólico das folhas de *P. serotinum* nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg (i.p.) aumentou a liberação das citocinas IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$ , porém não apresentou efeito na liberação de IL-12 e IL-23 em experimentos *in vivo* e *in vitro*. A DL<sub>50</sub> calculada para o extrato etanólico das folhas de *P. serotinum* foi de 125 mg/kg por via intraperitoneal (v.i.p.) e 375 mg/kg por via oral (v.o.). Sintomas visíveis de toxicidade como sedação e imobilidade foram observados em animais tratados com doses superiores a 50 mg/kg (i.p.) e 150 mg/kg (v.o.). Além disso, o extrato nas doses de 50 mg/kg (i.p.) e 100 mg/kg (v.o.) reduziu significativamente o peso corporal enquanto que concentrações mais baixas não apresentaram tal efeito (ALONSO-CASTRO et al., 2012).

O extrato metanólico de *P. californicum* Nutt demonstrou moderada ação antioxidante através da captura do radical livre 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>\*</sup>) e do poder de redução férrica (FRAP) utilizando o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) (JIMÉNEZ-ESTRADA et al., 2013).

#### 3.4 ASPECTOS DA INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO

Das espécies de plantas com flores conhecidas, 4.500 apresentam algum grau de parasitismo (HEIDE-JORGENSEN, 2008). Existem plantas que são parasitas em uma fase de seu desenvolvimento - parasitas facultativas; outras mantêm sua capacidade fotossintética, mas dependem totalmente do hospedeiro para aquisição de água e sais minerais - *hemiparasitas*; e ainda as aclorofiladas que necessitam tanto da obtenção de água como de fotoassimilados de uma planta hospedeira - *holoparasitas* (NICKRENT, 2002).

Essas plantas parasitas utilizam um sistema haustorial, que corresponde efetivamente ao sistema radicular profundamente modificado para execução das mesmas funções que as raízes, porém em substrato de natureza biótica (HEIDE-JORGENSEN, 2008). De acordo com Stewart e Press (1990), o sistema haustorial exerce três funções vitais para estas plantas: fixação, penetração e aquisição de água, solutos e/ou fotoassimilados.

O principal efeito negativo relacionado às plantas parasitas é a sobrecarga, principalmente nutricional e hídrica, que causam em seus hospedeiros. Apesar do efeito nocivo das plantas parasitas ser bastante ressaltado na literatura, estas plantas são importantes elementos das comunidades vegetais, e recentemente, vem sendo investigado o seu papel

como recursos-chave em várias comunidades, onde um grande número de outros organismos dependem destas plantas, pelo menos durante parte do ano, como fonte de alimento (néctar, pólen, frutos, folhas etc..) e abrigo (na construção de ninhos, por exemplo) (BAREA; WATSON, 2007).

De acordo com Aukema (2003) e Medel et al. (2004), a germinação e o estabelecimento das plantas parasitas dependem do sucesso da dispersão de sementes juntamente com a compatibilidade do hospedeiro. A maioria das espécies de Santalales possui os pássaros como principais agentes dispersores das sementes, sendo que para muitos grupos existe uma relação bastante estreita entre determinadas famílias e gêneros de pássaros e espécies parasitas. Esta extrema dependência dos agentes dispersores influencia diretamente na distribuição espacial das espécies parasitas.

Vários taxon de pássaros estão associados à disseminação de *Phoradendron*, mas os principais dispersores pertencem a subordem Oscine, espécies de *Euphonia* e aves migratórias como *Vireo flavirostris* (RESTREPO et al., 2002).

De um modo geral, as plantas parasitas aéreas são encontradas parasitando espécies de “dicotiledôneas” ou gimnospermas e menos frequentemente são encontradas sobre monocotiledôneas (RIZZINI, 1951; YONG; HEW, 1995). Muitas delas são generalistas, parasitando uma grande variedade de hospedeiros, enquanto outras são especialistas, sendo específicas de um ou poucos hospedeiros (NORTON; CARPENTER, 1998). Vários fatores são relatados por influenciar o comportamento dos dispersores e o estabelecimento das plântulas em relação aos hospedeiros, tais como o tipo da casca, espessura da periderme, diâmetro dos ramos, idade do hospedeiro, tamanho da copa, presença de espinhos e vários compostos secundários (CAZZETA; GALETTI, 2007).

Exemplos desta especificidade quanto ao hospedeiro é observado em *P. mucronatum* (DC.) Krug & Urb que pode ser encontrado instalado sobre a espécie *Aspidosperma pyriforme* Mart., uma Apocynaceae bastante comum no semi-árido nordestino, e conhecida por “pereiro” ou “pereiro preto” e em *P. microphyllum* (Pohl ex DC.) Trel. que parasita a espécie *Mimosa tenuiflora* (Wild), uma Leguminosae (subfamília Mimosoideae) típica das áreas semi-áridas do Brasil e conhecida como jurema-preta (FERREIRA et al., 2007).

Nas hemiparasitas aéreas da ordem Santalales, a penetração dos haustórios nos tecidos do hospedeiro ocorre de forma mecânica, já que nenhuma evidência de mecanismos químicos foram observados (MATHIASSEN et al., 2008) diferente do que foi verificado nas famílias Scrophulariaceae, Orobanchaceae, Balanophoraceae, Rafflesiaceae, Hydnoraceae e

Lennoaceae que requerem sinais químicos do hospedeiro para a germinação e desenvolvimento de um haustório funcional (STEWART; PRESS, 1990).

### 3.5 ESPÉCIES REATIVAS, ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

A oxidação é um processo essencial aos organismos aeróbios, sendo os radicais livres (RL) produzidos naturalmente, como consequência desse processo de oxidação, ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS et al., 2006).

Os RL são moléculas cuja reatividade resulta da presença de um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, geralmente formado pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A maioria das moléculas em meio biológico não se encontram na forma de radicais, ou seja, os elétrons permanecem emparelhados. No entanto, em algumas situações os RL podem gerar efeitos fisiológicos e patológicos (OLSZEWER, 1995).

Espécies reativas (ER) é um termo coletivo que abrange as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Tabela 1), os radicais derivados de tióis (RS•), as ER de cloro, as ER de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr (FINKEL; HOLBROOK, 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

**Tabela 1.** Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais.

<b>Espécies reativas de oxigênio (EROs)</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não radicais</b>
Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Hidroxil ( $\cdot OH$ )	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxil ( $RO_2^{\cdot}$ )	Ácido hipobromoso (HOBr)
Alcoxil ( $RO^{\cdot}$ )	Ozônio ( $O_3$ )
Hidroperoxil ( $HO_2^{\cdot}$ )	Oxigênio singleto ( $^1\Delta g$ )
	Oxigênio ( $O_2$ )
<b>Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não radicais</b>
Óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ )
Dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\cdot}$ )	Alquil peroxinitrito ( $ROONO$ )

Fonte: Adaptada de Halliwell, 2001.

O termo “reativo” nem sempre é apropriado, pois se observa que a reatividade destes compostos com biomoléculas é variável, sendo alguns estáveis e pouco reativos, como por ex.  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  e óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) que reagem diretamente com poucas moléculas no corpo

humano, outros são altamente reativos como  $\cdot\text{OH}$  que pode reagir com qualquer molécula (HALLIWELL, 2001).

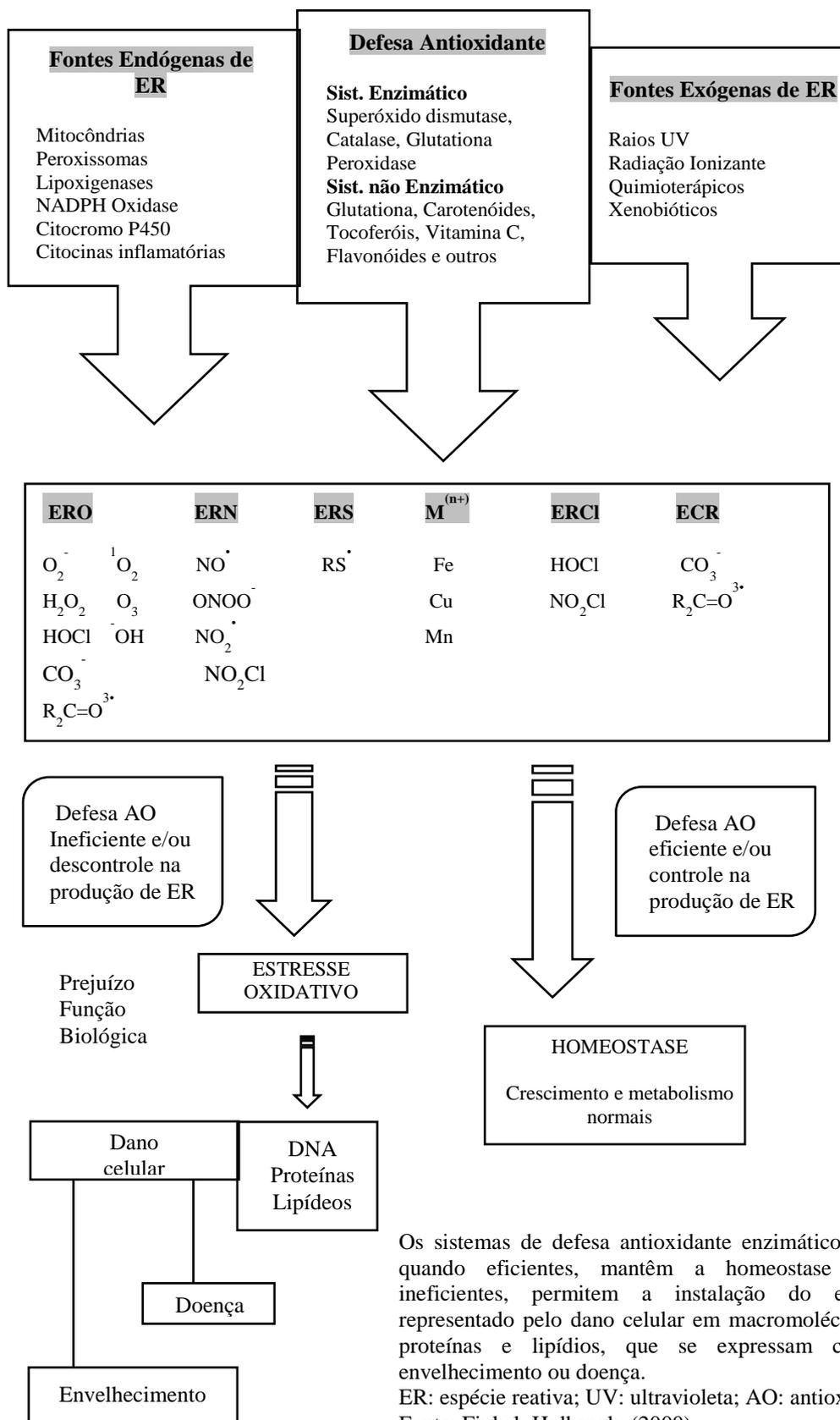
Uma condição de estresse oxidativo é gerada quando a célula acumula um excesso de ER. Isso ocorre quando a produção dessas espécies excede as defesas celulares. Todas as células ativas produzem certa quantidade de ER, mas o sistema antioxidante mantém os níveis baixos dessas espécies. Como um efeito passivo, as ER podem danificar as células através do dano oxidativo em açúcares ( $\text{CHOH}_n$ ), lipídios, proteínas e DNA (Figura 3) (COVARRUBIAS et al., 2008).

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, a indução do câncer e a propagação da AIDS em pacientes soropositivos ( $\text{HIV}^+$ ), além disso atua na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, como doenças auto-imunes, cardiopatias, doenças do pulmão, arteriosclerose, trauma, artrite, isquemia, intoxicação por xenobióticos e muitas outras. Por outro lado, as ER têm importante função biológica, como o controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, entre outros. A oxidação de alvos biológicos depende da rapidez com que o oxidante em questão reage e também da concentração presente de substrato e de oxidante (HALLIWELL et al., 1995; ELEJALDE, 2001; ZWART et al., 1999; GUTTERIDGE, 1993; PAGANO et al., 1998).

As células dispõem de uma variedade de mecanismos de defesa contra os danos causados pelas ER, denominados de defesas antioxidantes. Para o funcionamento celular normal, deve haver uma compensação entre a formação de ER e os níveis de defesas antioxidantes, que mantêm a célula em estado geral reduzido (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Halliwell e Gutteridge (2007) definiram antioxidante como uma substância presente em concentrações baixas, comparada às concentrações do substrato oxidante, que previne significativamente ou atrasa a oxidação de substratos susceptíveis. Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem captadores de radicais e supressores de estados excitados; sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam EROs/ERNs e a ligação de íons metálicos a proteínas, o que os torna indisponíveis para a produção de espécies oxidantes.

**Figura 3.** Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), derivados de enxofre (ERS), de cloro (ERCI), de carbono (ERC) e metais de transição  $[M^{n+}]$ .



Os antioxidantes produzidos pelo organismo agem em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathione reduzida (GSH), as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-peroxidase (GPx). A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pela glutathione-redutase (GR) e pela glutathione-S-transferase (GST), entre outros. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, os demais agentes antioxidantes estão no meio intracelular. O sistema de defesa antioxidante inclui ainda algumas moléculas endógenas como a albumina, transferrina, ferritina, ácido úrico, bilirrubina e antioxidantes exógenos como os carotenóides, polifenóis e vitamina C (HEBBEL, 1986).

Como substâncias antioxidantes mais estudadas e sintetizadas pelas plantas estão os compostos fenólicos dentre os quais se destacam os flavonóides. Nesta classe há grandes variações estruturais, dependendo do nível de hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfonação das moléculas. Além disso, flavonóides formam complexos com açúcar, lipídios, aminas e ácidos carboxílicos (DUTHIE; DUTHIE; KYLE, 2000; SUN; SIMONYI; SUN, 2002).

Estudos *in vitro* indicam que os polifenóis de plantas podem efetivamente participar de processos que possam ter implicações anti-carcinogênicas e anti-aterogênicas. Entre estes processos, o mais evidente é a capacidade antioxidante destes compostos atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que podem doar elétrons e reduz os radicais livres reativos. Essa atividade dos polifenóis é influenciada pelo número e posição dos grupos OH, assim como pelas posições de glicosilação. Ao contrário do ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol, que agem em meio aquoso e na camada fosfolipídica, respectivamente, os flavonóides podem se localizar nas duas fases (MCKAY; BLUMBERG, 2002).

No entanto, a eficácia antioxidante de polifenóis *in vivo* ainda precisa ser melhor avaliada, pois é necessário conhecer todos os processos que envolvem suas biodisponibilidades (DUTHIE; DUTHIE; KYLE, 2000).

### 3.6 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)/ESPECTROMETRIA DE MASSA (EM)

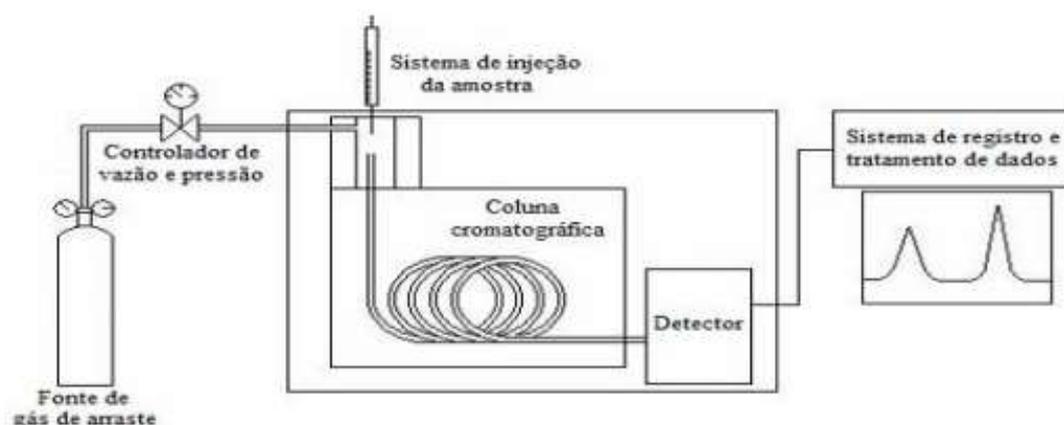
A cromatografia gasosa (CG) é assim chamada, pois utiliza como fase móvel um gás (SKOOG et al., 2002; BONATO, 2006) que possibilita a separação e análise de misturas de substâncias voláteis.

A CG é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, pois possui um alto poder de resolução, é muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a

picogramas ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$  g). A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou termicamente estável, embora amostras não voláteis ou instáveis possam ser derivadas quimicamente (DEGANI et al., 1998).

O equipamento que executa essa análise é o cromatógrafo, que apresenta como componentes principais, o sistema de gases, o sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica, o detector e o registrador (SKOOG; HOOLER; NIEMAN, 2002) (Figura 4).

**Figura 4** – Componentes básicos de um cromatógrafo a gás.



Fonte: Adaptado de Bonato (2006).

Os gases mais utilizados como fase móvel (FM) são hidrogênio, nitrogênio e hélio. Estes devem ter alta pureza e ser inertes em relação à fase estacionária (FE). A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de gás adequado. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a FE (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura. As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector, dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional a sua massa, o que possibilita a análise quantitativa (LANÇAS, 1993; MENDHAM et. al., 2002; SKOOG et al., 2002).

O espectrômetro de massas é um equipamento que pode ser acoplado ao cromatógrafo gasoso. Essa combinação é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas (ARDREY, 2003). Esse mecanismo permite análises

com alta especificidade em amostras complexas (SKOOG et al., 2002; COLLINS et al., 2006).

Os métodos de ionização mais empregados em CG/EM são ionização por impacto de elétrons (IE) e a ionização química (IQ). Na IE, o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 elétron volts- eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron ( $M^+$ ). Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera fragmentação dos analitos (SMERAGLIA; BALDREY; WATSON, 2002). Isto consiste em um dos maiores problemas encontrados na aplicação de IE, pois a fragmentação rápida pode conduzir a não observação do íon molecular no espectro, perdendo-se, portanto, uma das mais importantes informações analíticas oferecidas pela EM (ARDREY, 2003).

Quando se faz o acoplamento da cromatografia com a EM obtém-se o chamado cromatograma de massas que é assim denominado por se tratar de um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas ou apenas pelos íons de interesse produzidos. O cromatograma contendo todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas é denominado "cromatograma de íons totais" (CIT) (AQUINO NETO; NUNES 2003).

A CG/EM é uma ferramenta muito útil na identificação de compostos de origem vegetal porque fornece informação estrutural da molécula e permite comparação com bibliotecas espectrais. Como exemplo de sua aplicação na área de plantas medicinais temos: estudo da sazonalidade de algumas classes de metabólitos secundários, caracterização de aromas, identificação de terpenóides, análise de flavonóides, entre outras (RODRIGUES et al., 2006).

### 3.7 ANTIMICROBIANOS

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

O sucesso obtido com o desenvolvimento dos antimicrobianos levou a um período de glória na medicina, representado pela fase de maior desenvolvimento da indústria farmacêutica (1950-1970). Acreditava-se que a ciência seria capaz de extinguir todas as

doenças através do combate aos micro-organismos. Entretanto, essa realidade proporcionou o uso inadequado dos antimicrobianos e conseqüentemente o aparecimento de bactérias patogênicas resistentes a ação dos mesmos (NASCIMENTO, 2003).

A resistência microbiana à determinada droga pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ou natural é aquela que faz parte da herança genética do micro-organismo, transmitida de geração a geração sem perda da característica. O maior determinante de resistência natural é a presença ou ausência do alvo para a ação da droga. Esta característica fenotípica não apresenta qualquer risco a terapêutica, pois é previsível, bastando-se conhecer o agente etiológico da infecção e os mecanismos de ação dos fármacos disponíveis clinicamente (HAWKEY, 1998).

A resistência não natural ou adquirida ocorre quando surge o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão. É uma “nova” característica expressa no micro-organismo e que está ausente nas células genitoras. Essa nova propriedade é resultado de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extra-cromossômicas (plasmídios). Uma simples alteração genética pode levar ao aparecimento de um exemplar muito resistente, que normalmente não perde viabilidade e patogenicidade (GOLD; MOELLERING, 1996).

Uma alternativa terapêutica para o tratamento de micro-organismos resistentes a antibióticos é a utilização de extratos vegetais. Há muitas vantagens no uso de compostos antimicrobianos de plantas medicinais, dentre eles melhor tolerância do paciente, mais econômico, melhor aceitação devido à longa história de uso e ser renovável por estar disponível na natureza (PAREKH; CHANDA, 2007). A investigação quanto à ação antimicrobiana de plantas produz resultados úteis e elas constituem um potencial terapêutico com ação significativa frente a patógenos humanos, incluindo bactérias, fungos e vírus (SCHUCK et al., 2001).

### 3.8 CITOTOXICIDADE

O câncer é uma doença que afeta mais ou menos 200 tipos de células e caracteriza-se pela perda de função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação não controlada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástase. A origem dessa célula é decorrente de alterações genéticas que são produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes

responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (BRENTANI et al., 1998; SIMPSON et al., 1998). Há muitas dificuldades no tratamento dessa doença, os mais frequentes são a resistência ao medicamento, toxicidade e baixa especificidade.

A busca por novas drogas com atividade para os diferentes tipos de câncer é um dos temas mais amplos na pesquisa de produtos naturais. Moléculas de plantas, os seus derivados semi-sintéticos e sintéticos são importantes fontes de drogas antitumorais. De acordo com Cragg e Newman (2000), várias drogas utilizadas em ensaios clínicos para atividade anticancerígena foram purificadas a partir ou estão relacionados a fontes naturais. Por exemplo, os alcalóides da Vinca, vimblastina e vincristina, isolados das folhas da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Apocynaceae), antigamente chamada de *Vinca rosea* L. e popularmente conhecida como Vinca (LEVEQUE; JEHL, 2007; MAGNOTTA et al., 2007), os derivados de lignanas, etoposido e teniposido (ALLEN et al., 2003; CHOI et al., 2007), o derivado semi-sintético epidofilotoxina, isoladas do gênero *Podophyllum* (Berberidaceae), bem como os taxanos isolados a partir do gênero *Taxus* (Taxaceae) (KELLAND, 2005; KINGSTON; NEWMAN, 2007), os derivados semi-sintéticos camptotecina, irinotecano e topotecano, isolados de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), entre outros (CRAGG et al., 1993, 1994; WANG, 1998).

Os agentes conhecidos com ação sobre o câncer podem ser classificados em dois grupos. O primeiro é constituído por drogas que inibem a iniciação do processo carcinogênico e o segundo, por drogas que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer. Muitos agentes do primeiro grupo são encontrados em alimentos, como os diterpenos do café e os ácidos sulfídricos do alho (DUVOIX et al., 2005). Outro exemplo clássico de quimioprevenção (como é denominada a ação desses agentes) é o elevado consumo do chá verde no oriente, cujos polifenóis possuem atividade comprovada em diversos sistemas fisiológicos (LAMBERT et al., 2005). Já os agentes supressores são os mais procurados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois atuam após a instalação da doença (DUVOIX et al., 2005).

Atualmente o tratamento tem baixa eficácia em virtude do mecanismo de ação que as drogas supressoras possuem, inibindo o crescimento ou matando as células malignas. A maior parte desses quimioterápicos são genotóxicos, produzindo dano ao DNA e mutações, que podem induzir a formação de outras células neoplásicas. Os princípios ativos mais procurados são aqueles que induzem a apoptose, levando apenas células malignas à morte (SUBHASHINI; MAHIPAL; REDDANNA, 2005).

O aprimoramento da técnica de cultura de células permitiu o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, que por sua vez, possibilitou a elaboração de metodologias para triagem *in vitro*. Com esse objetivo, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos desenvolveu um painel de células cancerígenas que, atualmente, conta com 60 linhagens oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Essa metodologia permite avaliar diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Outra vantagem dessa triagem é a rapidez e eficiência do método, que em apenas quatro dias pode avaliar um número elevado de drogas (SKEHAN et al., 1990; MONKS et al., 1991; RUBINSTEIN et al., 1990).

O screening inicial para o tratamento do câncer baseia-se nessa triagem citotóxica *in vitro*, utilizando linhagens celulares estabelecidas, nos quais o efeito tóxico pode ser medido. Essa avaliação apresenta dados preliminares importantes para selecionar extratos de plantas ou compostos com propriedades anti-neoplásicas (ALONSO-CASTRO et al., 2012).

### 3.9 TOXICIDADE AGUDA

A investigação do potencial tóxico de plantas medicinais pode elucidar importantes aspectos farmacológicos de seus princípios ativos, permitindo uma utilização segura, respeitando seus possíveis riscos toxicológicos (RABÊLO, 2010).

Uma substância altamente tóxica promoverá um efeito danoso ao organismo vivo e/ou ao ambiente, quando empregada em mínimas quantidades, enquanto que as substâncias de baixa toxicidade precisam de altas doses para promover um efeito tóxico (VENANCIO, 2006).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Comparada com os medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade das plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Entretanto, isto não é verdade, pois os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias. Para determinação dessa atividade, é necessário a realização de ensaios pré-clínicos e clínicos. Os

ensaios pré-clínicos são realizados em laboratório através de testes *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vivo* utilizam animais, principalmente mamíferos como camundongos, ratos, macacos, cães entre outros. Os ensaios *in vitro* empregam frequentemente órgãos isolados, fluídos corpóreos, organismos inferiores e cultura de células e tecidos (BRASIL, 2004).

Um dos primeiros testes realizados para avaliar o potencial tóxico de quaisquer substâncias é o de toxicidade aguda. Esta consiste nos efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas administradas dentro de um período de 24 horas, e tem como objetivo determinar a sintomatologia em curto prazo após a administração de um composto (KUMAR et al., 2006).

O teste serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para pesquisas de toxicidade subaguda e crônica, fornece subsídios sobre o modo de ação tóxica da substância teste bem como o binômio dose-efeito letal, que é estimada por um parâmetro denominado dose letal 50%, mais conhecida como  $DL_{50}$  (KLAASSEN; EATON, 1994).

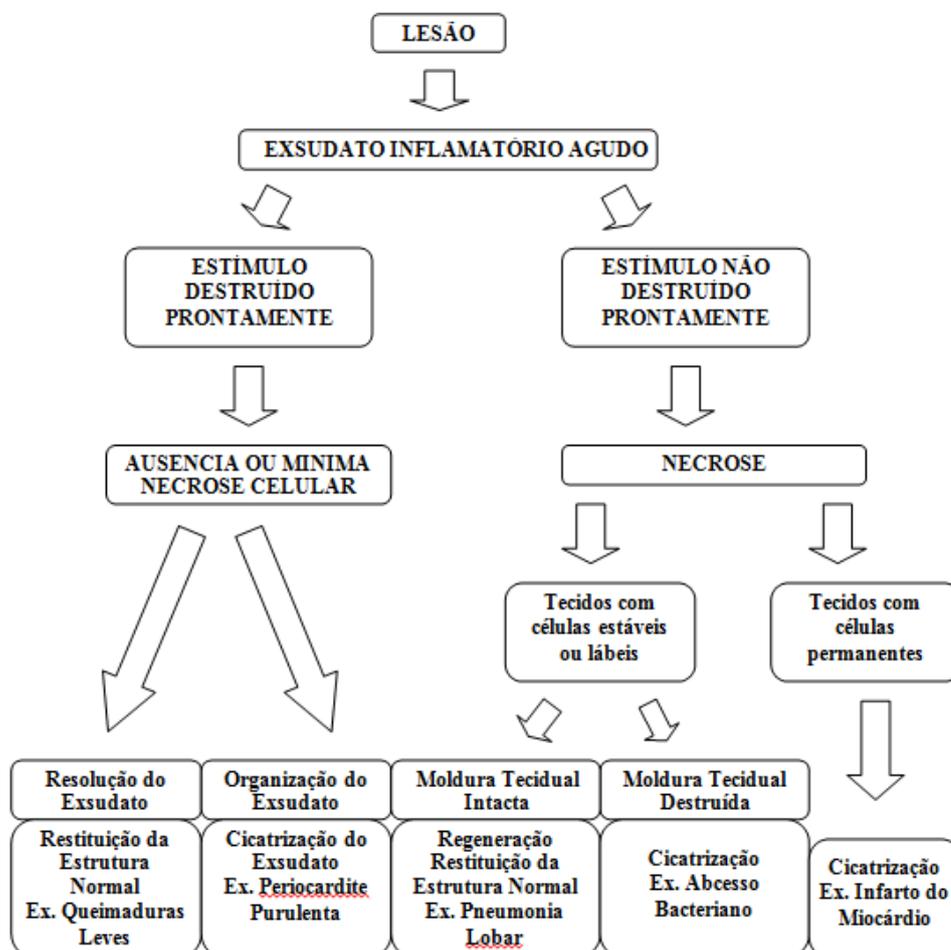
Assim, este ensaio visa à detecção e avaliação do potencial tóxico, para o homem ou animal, de qualquer substância ou produto químico acabado, ao qual possa estar exposto, por meio da observação e quantificação do número de mortes após a administração por diferentes vias em ratos ou camundongos (BIGHETTI et al., 2004).

### 3.10 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação refere-se, por definição à reação do tecido vivo vascularizado a uma lesão local (Figura 5). É geralmente causada por infecções microbianas, agente físico, substâncias químicas, tecido necrótico ou reações imunológicas. O papel da inflamação consiste em conter e isolar a lesão, destruir os microrganismos invasores, inativar toxinas e iniciar processos de cura e reparo. Todavia, estes processos podem ser potencialmente nocivos, causando reações de hipersensibilidade que ameaçam a vida do indivíduo, bem como a lesão progressiva e fibrose de órgãos (ROBBINS, 2000).

De uma maneira geral, os sintomas que caracterizam a inflamação são dor, calor, edema, rubor e perda de função da área afetada. Tais sintomas ocorrem por um período limitado de tempo, em uma área determinada e comumente acontecem em benefício ao organismo. Durante esse processo, as células do sistema imune são atraídas para a área afetada e transformadas de um estado inativo ou latente para um estado ativado, tornando-se aptos para combater a causa da lesão (KATZUNG, 2000).

**Figura 5.** Principais etapas da resposta inflamatória.



Fonte: ROBBINS (1998).

Existe uma série de fenômenos biológicos envolvidos no processo inflamatório, que se associam e se complementam, com isso, formam reações em cascata e envolvem uma interação complexa entre as células inflamatórias, tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos (TEDGUI; MALLAT, 2001). Esses acontecimentos podem ser desencadeados por vários fatores, chamados agentes flogogênicos. Dentre esses, destacam-se: a) agentes físicos, como o calor excessivo (queimaduras), o frio exagerado (congelamento), traumatismos, fraturas, incisões, raios ultravioleta e radiações ionizantes como causas importantes da inflamação; b) agentes químicos, neste caso, a inflamação é determinada pela ação de substâncias químicas de natureza muito variadas, como substâncias cáusticas, ácidos, álcalis, óleo de cróton, terebentina, formaldeído, carragenina; c) agentes infecciosos, em que o fator desencadeante da inflamação é de origem biológica, como bactérias, fungos, vírus, protozoários, etc. (CARVALHO, 2004).

O tempo de duração e a intensidade do agente inflamatório determinam diferentes graus ou fases de transformação nos tecidos. A resposta inflamatória é dividida em três fases, sendo que cada fase é mediada aparentemente por diferentes mecanismos. Inicialmente, é evidenciada uma fase aguda, caracterizada por ser de duração variável e por conter alterações vasculares, seguida de uma fase subaguda, em que se observa infiltração leucocitária e de outras células fagocíticas e posteriormente, ocorre à fase crônica, onde a proliferação é fato de destaque, em que ocorre a regeneração tecidual e fibrose (SANTOS JUNIOR, 2003).

Os fenômenos vasculares predominam no foco da inflamação, onde ocorre um aumento da dilatação dos vasos e ainda, um aumento da permeabilidade vascular (CIRINO; FIORUCCI; SESSA, 2003), gerados principalmente pelos seguintes mediadores: prostaglandinas, histamina, serotonina, leucotrienos, e substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina – CGRP) (HEDQVIST; GAUTAN; LINBOM, 2000; LECCI et al., 2000). Este aumento da permeabilidade vascular culmina com a saída de exsudato, ou seja, um fluído rico em proteínas para o meio extravascular resultando no local da lesão, o edema (PATTERSON; LUM, 2001; LEY, 2002).

Na fase sub-aguda, ocorre o fenômeno da quimiotaxia, caracterizada por migração e infiltração leucocitária e de células fagocíticas, no sítio da lesão (ALI et al., 1997; FRANGOIANNIS; SMITH; ENTMAN et al., 2002).

No local da lesão, ocorre o reconhecimento do agente agressor através de neutrófilos e macrófagos, em seguida, essas células englobam, fagocitam e liberam enzimas lisossomais a fim de destruir o agente agressor (RODRIGUES et al., 2002). Ainda no foco inflamatório, ocorre um importante evento: a ativação dos mastócitos e agregação plaquetária, que também resultam na liberação de mais mediadores quimiotáticos.

Dentre os mediadores quimiotáticos citam-se: os prostanóides (PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>α), derivados da via da lipoxigenase (5 HETE, LTB<sub>4</sub>), cininas, substâncias liberadas de neutrófilos ativados, entre outros (TAN; LUSCINKAS; HONNER-VANNIASINKAM, 1999).

Finalmente, após a fase sub-aguda, ocorre uma complexa série de eventos na tentativa de reconstituir o tecido danificado por meio da ativação de células mesenquimatosas (resposta primária), incluindo hiperplasia, hipertrofia, e produção de matriz extracelular. A injúria inflamatória (injúria secundária) é mantida e induz o processo de cicatrização (resposta secundária) que freqüentemente reconstitui o sítio lesado com tecidos fibroblásticos menos especializados (SUZUKI et al., 2003).

### 3.11 CICATRIZAÇÃO

A capacidade do corpo de substituir células lesadas ou mortas e de proceder ao reparo dos tecidos após a inflamação é fundamental para sobrevivência (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

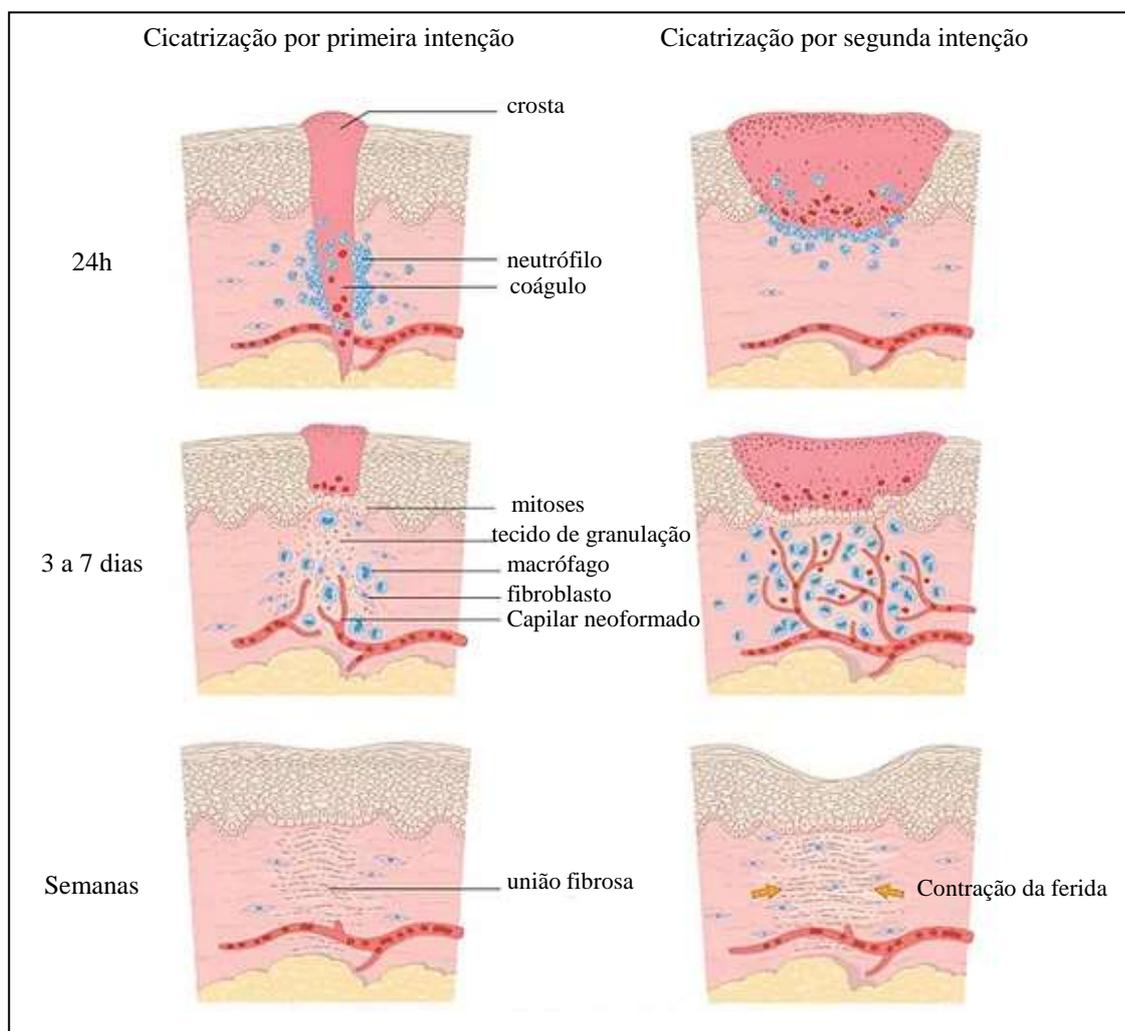
Esse processo de reparo pode ocorrer por dois processos distintos: a regeneração que é a substituição do tecido lesado por um tecido semelhante àquele perdido na lesão, ocorre em tecidos com grande potencial mitótico, enquanto que a cicatrização é o processo pelo qual a perda tecidual é substituída por uma cicatriz não funcional (CARVALHO, 1991; MEDEIROS et al., 2003).

Segundo Dealey et al. (2001), dois tipos de cicatrização podem ser observados: por primeira intenção, que ocorre quando não há perda de tecido e as extremidades da pele ficam justapostas uma à outra, como nas suturas cirúrgicas; ou por segunda intenção, que ocorre quando houve perda de tecido e as extremidades da pele ficam distantes umas das outras (Figura 6). Segundo Saviato e Silva (2004) tem-se ainda a terceira intenção, que é uma combinação das outras duas, com retardo no fechamento primário devido ao início da cicatrização por segunda intenção.

A cicatrização é um processo complexo, dinâmico e para reparar um dano ocorrido na pele, o organismo sempre reage da mesma maneira (Figura 7). O processo cicatricial é classificado nas seguintes fases: coagulação, inflamatória, proliferativa, contração da ferida e remodelação (SAVIATO; SILVA, 2004).

Na coagulação, ocorre uma complexa liberação de substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases que são liberadas e favorecem o desencadeamento de outras fases. Essa etapa é importante para cooptar as bordas das feridas, e também no cruzamento da fibronectina formando uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos penetram na ferida (FAZIO; ZITELLI; GOSLEN, 2000).

**Figura 6** – Tipos de cicatrização: por primeira e segunda intenção.

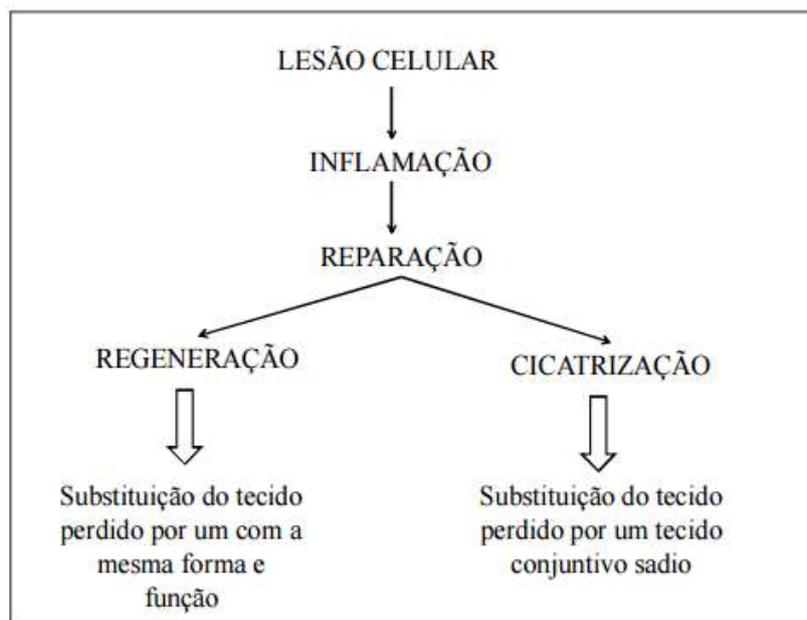


Fonte: KUMAR et al., 2007

A fase inflamatória está intimamente ligada à etapa de coagulação e se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade celular, promovendo a quimiotaxia (migração de neutrófilos para a ferida). Os neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, com maior concentração 24 horas após a lesão. São atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas. Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana). Essas células produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradualmente substituídos por macrófagos. Estes por sua vez, migram para a ferida após 48-96 horas da lesão, e são as principais células antes dos fibroblastos. Tem papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese,

fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição da fase proliferativa (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006a,b).

**Figura 7** – Esquema representando a divisão do processo de reparo tecidual e definição entre regeneração e cicatrização.



Fonte: RUH et al., 2013.

A fase proliferativa é responsável pelo “fechamento” da lesão propriamente dita. Essa etapa pode ser subdividida em: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Esta fase tem início ao redor do 4º dia após a lesão e se estende até o término da segunda semana. A epitelização ocorre precocemente. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora. A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a cicatrização adequada (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994). A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência. O fator mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o fator de crescimento derivado de plaquetas

(PDGF). Em seguida, é liberado o fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ), que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo 1 e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER 2006 a, b).

A contração da ferida é uma fase dinâmica, que objetiva a redução das bordas (espessura total), produzindo um movimento centrípeto das feridas contribuindo para o fechamento da mesma (FAZIO; ZITELLI; GOSLEN, 2000).

A remodelação representa a última fase do processo de cicatrização e tem duração de meses. É responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações do colágeno, melhoria nos componentes das fibras colágenas e reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura (GUIRRO; GUIRRO, 2004).

A neovascularização diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. A ferida madura tem uma superfície epitelial íntegra que inicialmente apresenta uma coloração rosa “luminosa” devido à vascularização do tecido de granulação subjacente, a superfície epitelial começa a se tornar pálida, devido à redução dessa vascularização com o avanço no processo de cicatrização (HOSGOOD, 2006).

Nos processos cicatriciais, o tecido de granulação e a epitelização sempre motivaram estudos com a finalidade de esclarecer aspectos da neoformação tecidual, como também verificar os efeitos da medicação sistêmica ou tópica na evolução deste processo (CARVALHO; OLIVEIRA, 1991). Com relação às medicações tópicas, há uma série de trabalhos com o objetivo de acelerar a cicatrização por segunda intenção, sendo que alguns autores julgaram que a interferência na cicatrização deve-se à infecção e a perda de proteínas para a produção de novos tecidos (ROBBINS et al., 2000).

## REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; GONZALE, E.; IGLESIAS, I.; IRURZUN, A.; GENERAL, L.C. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. **Pharmacology**, v. 32, n. 4, p. 499–503, 1999.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-50, 2008.
- ALLEN, J. D.; DORT, S. C. V.; BUITELAAR, M.; TELLINGEN, O. V.; SCHINKEL, A. H., Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by p-glycoprotein. **Cancer Research**, v. 63, n. 6, p. 1339–1344, 2003.
- ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. C. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Medical Clinics of North America**, v. 81, n. 1, p. 1-28, 1997.
- ALONSO-CASTRO, A. J.; JUÁREZ-VÁZQUEZ, M. del C.; DOMÍNGUEZ, F.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, I.; ESTRADA-CASTILLÓN, E.; LÓPEZ-TOLEDO, G.; CHÁVEZ, M.; CERBÓN, M. A.; GARCÍA-CARRANCA, A. The antitumoral effect of the American mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. (Viscaceae) is associated with the release of immunity-related cytokines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 857–864, 2012.
- APG III (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.
- AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: Princípios e Técnicas Afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 188 p.
- ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. Huddersfield: John Wiley & Sons, 2003. 300 p.
- ARRUDA, R.; FADINI, R. F.; CARVALHO, L. N.; DEL-CLARO, K.; MOURÃO, F. A.; JACOBI, C. M., TEODORO, G. S.; VAN DEN BERG, E., CAIRES, C. S. & DETTKE, G. A. Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 264-274, 2012.
- ASHWORTH, V. E. T. M. Phylogenetic relationship in Phoradendrea (Viscaceae) inferred from three Regions of nuclear ribosomal cistron. I. Major lineages and paraphyly of *Phoradendron*. **Systematic Botany**, v. 25, n. 2, p. 349-370, 2000.
- AUKEMA, J. E. Vectors, viscin, and Viscaceae: mistletoes as parasites, mutualists, and resources. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 1, n. 3, p. 212-219, 2003.

BAREA, L. P.; WATSON, D. M. Temporal variation in food resources determines onset of breeding in an Australian mistletoe specialist. **Emu**, v. 107, n. 3, p. 203-209, 2007.

BARLOW, B. A. Classification of the Loranthaceae and Viscaceae. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, n. 89, p. 268-272, 1964.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; POSSENTI, A.; FOGLI, M. A.; SIQUEIRA, M. G.; CARVALHO, J. E. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. **Lecta**, v. 22, n. 1/2, p. 53-58, 2004.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, cap. 8, p. 203-270. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 18 mar. 2004.

BRENTANI, R. R.; CHAMMAS, R.; COELHO, F. R. G., Mecanismos de invasão e metástases. In: BRENTANI, M. N.; COELHO, F. R. G.; IYAYASU, H.; KOWALSKI, L. P. **Bases da Oncologia**. 1ª ed. São Paulo: Marina, p. 91-98, 1998.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, Supl. 7, p. 12S-34S, 2006a.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, Supl. 7, p. 1e-S-32e-S, 2006b.

CAAMAL-FUENTES, E.; TORRES-TAPIA, L. W.; SIMÁ-POLANCO, P.; PERAZA-SÁNCHEZ, S. R.; MOO-PUC, R. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 719-724, 2011.

CAIRES, C. S.; ANDRADE, M. J. G.; REIF de PAULA, C. H.; MELO, E. Loranthaceae. In: ANA MARIA GIULIETTI; ALESSANDRO RAPINI; MARIA JOSÉ GOMES DE ANDRADE; LUCIANO PAGANUCCI DE QUEIROZ; JOSÉ MARIA CARDISO DA SILVA. **Plantas Raras do Brasil**, v. 1, p. 240-242, 2009.

CAIRES, C. S.; DETTKE, G. A. Santalaceae. In: FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A. et al. (orgs.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, vol. 2. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 1603-1606, 2010.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, P. S. P.; TAGLIAVINI, D. G.; TAGLIAVINI, R. L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas; estudo clínico e histológico em ratos. **Revista de Ciência Biomédica**, v. 12, p. 39-50, 1991.

CARVALHO, J. E. Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento? In: MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; PEREIRA, J. L.; PASTORE, G. M. **Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas**. vol II. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, p. 196-202, 2001.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004. 480 p.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. L. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CAZZETA, E.; GALETTI, M. Frugivoria e especificidade por hospedeiros na erva-de-passarinho *Phoradendron rubrum* (L.) Griseb. (Viscaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 345-351, 2007.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHOI, H. J.; CHO, B. C.; SHIN, S. J.; CHEON, S. H.; JUNG, J. Y.; CHANG, J.; KIM, S. K.; SOHN, J. H.; KIM, J. H. Combination of topotecan and etoposide as a salvage treatment for patients with recurrent small cell lung cancer following irinotecan and platinum first-line chemotherapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 309–313, 2007.

CIRINO, C.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 91-95, 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: **Patologia Funcional e estrutural**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 1252 p.

COVARRUBIAS, L.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, D.; SCHNABEL, D.; SALAS-VIDAL, E.; CASTRO-OBREGÓN, S. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? **Developmental Biology**, v. 320, n. 1, p. 1-11, 2008.

CRAGG, G. M.; SCHEPARTZ, S. A.; SUFFNESS, M.; GREVER, M. R. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1657–1668, 1993.

CRAGG, G. M.; BOYD, M. R.; CARDELLINA, J. H.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M.; MCCLOUD, T. G. Ethnobotany and drug discovery : the experience of the US National Cancer Institute. In: CHADWICK, D. J.; MARSH, J. **Ciba Foundation Symposium 185 - Ethnobotany and the search for new drugs**. Chichester, UK: Wiley and Sons, p. 178–196, 1994.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, n. 9, n. 12, p. 2783-2797, 2000.

CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO, D. M. M.; NUNES, R.S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, S. A.; TEIXEIRA-SILVA, F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (Supl.), p. 739-743, 2008.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press. 1981. 1262p.

DEALEY, C.; LACERDA, R. A.; KANNER, E. **Cuidando de feridas: Um guia para enfermeiras**. São Paulo: Atheneu. 2001. 256 p.

DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na escola**, n. 7, 1998.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: Edunesp; 2007.

DOSSAJI, S. F.; BECKER, H.; EXNER, J. Flavone C-Glycosides of *Phoradendron tomentosum* from different host trees. **Phytochemistry**, v. 22, n. 1, p. 311-312, 1983.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heartdisease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 79-106, 2000.

DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLE, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Chemopreventive and therapeutic effects of *Curcumin*. **Cancer Letters**, v. 233, n. 2, p. 181-190, 2005.

ELEJALDE, G. J. I. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. **Anales de Medicina Interna**, v. 18, n. 6, p. 326-35, 2001.

FAZIO, M. J.; ZITELLI, J.Á.; GOSLEN, J.B. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN III W. P.; HANKE, C. W.; ALT, T. H.; ASKEN, S. **Cirurgia Cosmética – Princípios e Técnicas**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, p.18-23, 2000.

FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S.; PIMENTEL, R. M. M. Estudo Morfoanatômico Foliar de *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 708-710, 2007.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FRANGOIANNIS, N. G.; SMITH, C. W.; ENTMAN, M. L. The inflammatory response in myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v. 53, n. 1, p. 31-47, 2002.

FREI, B.; HEINRICHLH, M.; BORK, P. M.; HERRMANN, D.; JAKI, B.; KATO, T.; KUHNT, M.; SCHMITT, J.; SCHUHLY, W.; VOLKEN, C.; STIEBER, O. Multiple screening of medicinal plants from Oaxaca, Mexico: ethnobotany and bioassays as a basis for phytochemical investigation. **Phytomedicine**, v. 5, n. 3, p. 177-186, 1998.

GOLD, H. S.; MOELLERING JR. R. C. Antimicrobial-Drug Resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 1445-1453, 1996.

GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 3, p. 329-333, 2000.

GRAHAM, J. G.; PENDLAND, S. L.; PRAUSE, J. L.; DANZINGER, L. H.; SCHUNKE VIGO, J.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N. R. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 528-535, 2003.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia dermato-funcional: fundamentos, recursos, patologias**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 2004. 584 p.

GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free radical research communications**, v. 19, n. 3, p. 141-58, 1993.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 1-2, p. 7-20, 1995.

HALLIWELL B: Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: **Nature Encyclopedia of Life Sciences**. London: Nature Publishing Group, p.1-7, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 851p.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **British Medical Journal**, v. 317, p. 657-660, 1998.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, n. 5, p. 401-405, 1986.

HEDQVIST, P.; GAUTAN, N.; LINBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 117-119, 2000.

HEIDE-JORGENSEN, H. S. **Parasitic Flowering Plants**. Brill Leiden: The Netherlands, 2008. 438 p.

HOSGOOG, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 4, p. 667-85, 2006.

JACOBO-SALCEDO, M. R.; ALONSO-CASTRO, A. J.; SALAZAR-OLIVO, L.A.; CARRANZA-ALVAREZ, C.; GONZÁLEZ-ESPÍNDOLA, L. A.; DOMÍNGUEZ, F.; MACIEL-TORRES, S. A.; GARCÍA-LUJAN, C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M.D.R.;

GÓMEZ-SÁNCHEZ, M.; ESTRADA-CASTILLÓN, E.; ZAPATA-BUSTOS, R.; MEDELLIN-MILÁN, P.; GARCÍA-CARRANCA, A. Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 12 p. 1925 – 1928, 2011.

JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; VELÁZQUEZ-CONTRERAS, C.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; SIERRAS-CANCHOLA, D.; LAPIZCO-VÁZQUEZ, R.; ORTIZ-SANDOVAL, C.; BURGOS-HERNÁNDEZ, A.; ROBLES-ZEPEDA R.E. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1-8, 2013.

JOHANSSON, S.; GULLBO, J.; LINDHOLM, P.; EK, B.; THUNBERG, E.; SAMUELSSON, G.; LARSSON, R.; BOHLIN, L.; CLAESON, P. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly, selective cytotoxicity to human breast cancer cells. **Journal Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 1, p. 165-175, 2003.

KATZUNG, B. G. **Basical and clinical pharmacology**. 8<sup>a</sup> ed. New York: Mc Graw-Hill/Appleton & Lang, 2000. 1217 p.

KASHIWADA, Y.; WANG, H. K.; NAGAO, T.; KITANAKA, S.; YASUDA, I.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; COSENTINO, L. M.; KOZUKA, M.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C. Q.; YEH, E.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal Natural Products**, v. 61, n. 9, p. 1090-1095, 1998.

KELLAND, L. R. Emerging drugs for ovarian cancer. **Expert Opinion Emerging Drugs**, v. 10, n. 2, p. 413–424. 2005.

KINGSTON, D. G.; NEWMAN, D. J. Taxoids: cancer-fighting compounds from nature. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 10, n. 2, p. 130–144, 2007.

KLAASSEN, C. D.; EATON, D. L. Principles of Toxicology. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons**. 4<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill Inc, p. 12-49, 1994.

KUIJT, J. **The biology of parasitic flowering plants**. Berkeley: University of California Press, 1969. 246 p.

KUIJT, J. Monograph of *Phoradendron* (Viscaceae). **Systematic Botany Monographs**, v. 66, p. 1-643, 2003.

KUMAR, V. P.; CHAUHAN, N. S.; PADH, H.; RAJANI, M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p.182-188, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. Inflammation and repair in pathologic basis of disease. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins Basic Pathology**. 8<sup>a</sup> ed. Elsevier Health Sciences, p. 51-92, 2007.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Springer Verlag. p. 604, 2008.

LAMBERT, J. D.; HONG, J.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **The American Journal of Clinican Nutrition**, v. 81, supl. 1, p. 284S-291S, 2005.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos-SP: Acta, 1993. 254 p.

LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 157-169, 1994.

LEVEQUE, D.; JEHL, F. Molecular pharmacokinetics of *Catharanthus* (vinca) alkaloids. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 5; p.579–588, 2007.

LECCI, A.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; CARINI, F.; MAGGI, C. A. Peripheral actions of tachykininis. **Neuropeptides**, v. 34, n. 5, p. 303-313, 2000.

LEY, K. Integration of inflammatory signals by rooling neutrophils. **Immunological Reviews**, v. 186, p. 8-18, 2002.

LOPEZ-MARTINEZ, S.; NAVARRETE-VAZQUEZ, G.; ESTRADA-SOTO, S.; LEON-RIVERA, I.; RIOS, MY.; Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae). **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 27, n. 2, p. 130–136, 2013.

LOZANO, A.; ARAÚJO, E. L.; MEDEIROS, M. F. T.; ALBUQUERQUE, U. L. The apparency hypothesis applied to a local pharmacopoeia in the Brazilian northeast. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2014.

MAGNOTTA, M., J.; CHEN, J.; LUCA, V. Expression of deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots. **Phytochemistry**, v. 68, n, 14, p. 1922–1931, 2007.

MATHIASSEN, R. L.; NICKRENT, D. L.; SHAW, D. C.; WATSON, D. M. Mistletoes: Pathology, Systematics, Ecology, and Management. **Plant Disease**, v. 92, n. 7, p. 988-1006, 2008.

MEDEIROS, C. A.; FILHO, A. M. D. S.; ROCHA, K. F. B.; AZEVEDO, I. M.; MACEDO, F. Y. B. Ação do fator de crescimento de fibroblasto básico na cicatrização da aponeurose abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 5-9, 2003.

MEDEL, R.; VERGARA, E.; SILVA, A.; KALIN-ARROYO, M., Effects of vector behavior and host resistance on mistletoe aggregation. **Ecology**, v. 85, n.1, p. 120-126. 2004.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. Cromatografia com fase gasosa. In: **Análise Química Quantitativa**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 160-173, 2002.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. The role of tea in human health: an update. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2002.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high- flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

NASCIMENTO, M. C. **Medicamentos: ameaça ou apoio à saúde?** Rio de Janeiro: Vieira e Lent, 2003. 197 p.

NICKRENT, D. L. Parasitic Plants of the World. In: LÓPEZ-SÁEZ, J. A.; CATALÁN, P.; SÁEZ, L. **Parasitic Plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands**. Madrid: Mundi-Prensa Libros, S. A. p. 7-27, 2002.

NICKRENT, D. L. Parasitic Plants. In: MCGRAW-HILL **Yearbook of Science & Technology**. New York (U.S.A.): McGraw-Hill. p. 251-253, 2008.

NICKRENT, D. L.; MALÉCOT, V.; VIDAL-RUSSEL, R.; DER, J. P. A revised classification of Santalales. **Taxon**, v. 59, n. 2, p. 538-558, 2010.

NORTON, D. A.; CARPENTER, M. A. Mistletoes as parasites: host specificity and speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 13, n. 3, p. 101-105, 1998.

NUTTALL, T. Descriptions of plants collected by William Gambel, M. D., in the Rocky Mountains and Upper California. **Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, vol. 1, second series, parte II, p. 149-189, 1848

OLSZEWER, E. **Radicais livres em Medicina**. 2ª ed. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 1995. 204 p.

PAGANO, G.; KORKINA, L. G.; BRUNK, U. T.; CHESSA, L.; DEGAN, P.; PRINCIPE, KELLY, F. J.; MALORNI, W.; PALLARDÓ, F.; PASQUIER, C.; SCOVASSI, I.; ZATTERALE, A.; FRANCESCHI, C. Congenital disorders sharing oxidative stress and cancer proneness as phenotypic hallmarks: prospects for joint research in pharmacology. **Medical Hypotheses**, v. 51, n. 3, p. 253–266, 1998.

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, p. 53-58, 2007.

PATTERSON, C. E.; LUM, H. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. **Endothelium**, v. 8, n. 2, p. 75-105, 2001.

RABÊLO, W. F. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*)**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

RESTREPO, C.; SARGENT, S.; LEVEY, D. J.; WATSON, D. M. The role of vertebrates in the diversification of new world mistletoes. **Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution and Conservation**. p. 83-98, 2002.

- RIGON, J.; CERVI, A. C. O gênero *Phoradendron* Nutt. (Viscaceae) no estado do Paraná, Brasil. *Pesquisas, Botânica*, v. 64, p.15-38, 2013.
- RIOS, M. Y.; SALINA, D.; VILLARREAL, M. L. Cytotoxic activity of moronic acid and identification of the new triterpene 3,4-seco-olean-18-ene-3,28-dioic acid from *Phoradendron reichenbachianum*. ***Planta Medica***, v. 67, n. 5, p. 443-446, 2001.
- RIZZINI, C. T. O parasitismo de “Loranthaceae” sobre monocotiledôneos. ***Revista Brasileira de Biologia***, v. 11, n. 3, p. 289-302, 1951.
- RIZZINI, C.T. El género *Phoradendron* en Venezuela. ***Rodriguésia***, v. 30, n. 46, p. 33-125, 1978.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. R. ***Patologia estrutural e funcional***, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251 p.
- RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, v. 292, n. 4; p. 869-873, 2002.
- RODRIGUES, M. V. N., REHDER, V. L. G., SINÉSIO, A. S., JÚNIOR, B.A., SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. ***Revista MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais***, v. 7, 2006.
- RUBINSTEIN, L.V.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; SIMON, R. M.; TOSINI, S.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; BOYD, M R. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. ***Journal of National Cancer Institute***, v. 82, n. 13, p. 1113-1118, 1990.
- RUH, A. C.; FERNANDES, D.; ARTONI, R. F.; FAVERO, G. M. Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização. ***Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde***, v. 19, n. 1, p. 11-19, 2013.
- SANTOS JUNIOR, J. C. M. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. ***Revista Brasileira de Coloproctologia***, v. 23, n. 3, p. 206-210, 2003.
- SAVIETO, R. M.; SILVA, M. J. P. Toque terapêutico na cicatrização de lesões da pele de cobaias. ***Revista Brasileira de Enfermagem***, v. 57, n. 3, p. 340-343, 2004.
- SCHUCK, V. J. A.; FRATINI, M.; RAUBER, C. S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVAL, E. E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. ***Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas***, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001.
- SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

- SIMPSON, A. J. G.; CABALLERO, O. L.; DANI, S. U. *Oncogenes e genes supressores*. In: BRENTANI, M. N.; COELHO, F. R. G.; IYAYASU, H.; KOWALSKI, L. P. **Bases da Oncologia**. 1ª ed. São Paulo: Marina, p. 53-70, 1998.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- SKOOG, D. A.; HOOLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
- SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. **Chromatographia**, v. 55, n. 1, p. 95S- 99S, 2002.
- STEWART, G. R.; PRESS, M. C. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 127-151, 1990.
- SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; REDDANNA, P. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia *in vitro*. **Cancer Letters**, v. 224, p. 31-43, 2005.
- SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 4, p. 314-318, 2002.
- SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n.6, p. 881-900, 2003.
- TAKHTAJAN, A. **Diversity and classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1997. 643 p.
- TAN, P.; LUSCINKAS, F. W.; HONNER-VANNIASINKAM, S. Celular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 17, n. 5, p.373-389, 1999.
- TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Research**, v. 88, n. 9, p. 877-887, 2001.
- TRILEASE, W. **The Genus *Phoradendron*. A Monographic Revision**. University of Illinois, Urbana. p. 3- 224, 1916.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 189-306, 2006.
- VARELA, B. G.; FERNÁNDEZ, T.; RICCO, R. A.; ZOLEZZI, P. C.; HAJOS, S. E.; GURNI, A. A.; ALVAREZ, E.; WAGNER, M. L. *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 109–116, 2004.

- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. 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, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Mediciniais: Cura Segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 464-471, 2008.
- VENANCIO, A. M. **Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã), em *Mus musculus* (camundongos)**. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, Aracajú. 2006.
- VENTOSA, I.; OVIEDO, R. Plantas parásitas en los humedales cubanos. **Moscosoa**, v. 13, p. 263-274, 2002.
- VIDAL-RUSSELL, R.; NICKRENT, D. L. Evolutionary relationships in the showy mistletoe family (Loranthaceae). **American Journal of Botany**, v. 95, n. 8, p. 1015–1029. 2008.
- WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistence. ASM Press: Washington, 2003. 354 p.
- WANG, H. K. Plant-derived anticancer agents currently in clinical use or clinical trials. **The Investigation Drugs Journal**, v. 1, n. 1, p. 92–102, 1998.
- WIENS, D.; BARLOW, B. A. The cytogeography and relationships of the Viscaceous and Eremolepidaceous Mistletoes. **Taxon**, v. 20, n. 2/3, p. 313-332, 1971.
- YONG, J. W. H.; HEW, C. S. A report of mistletoes on pigeon orchids in Singapore. *Lindleyana*, n. 10, p. 131-132, 1995.
- ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H.; COMMANDEUR, J. N.; VERMEULEN, N. P. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 202-26, 1999.

**Capítulo 1** – Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of *Phoradendron mucronatum* and *Phoradendron microphyllum* (Viscaceae)

**ISLA V. G. A. BASTOS<sup>1</sup>, TATIANE B DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, MARIA D. RODRIGUES<sup>1</sup>,  
GARDENIA C. G. MILITÃO<sup>2</sup>, TERESINHA G. DA SILVA<sup>1</sup>, IZABEL C. C.  
TURATTI<sup>3</sup>, NORBERTO P. LOPES<sup>3</sup>, SEBASTIÃO J. DE MELO<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos, Av. Prof. Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária – 50740-520, Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Rua Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária - 50670-901 - Recife, PE – Brasil;

<sup>3</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Química, Avenida do Café, S/N, Monte Alegre - 14040-903 - Ribeirão Preto, SP – Brasil

**Keywords:** Cytotoxicity, Gas Chromatography, *Phoradendron microphyllum*, *Phoradendron mucronatum*.

**Running head:** GC/MS analysis and cytotoxicity of *Phoradendron* species

Seção da Academia na qual se enquadra o artigo: CIENCIAS BIOLOGICAS

\*Sebastião José de Melo, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos, Av. Prof. Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária – 50740-520, Recife, Pernambuco, Brasil. Fax: 2126-8346. Telefone: 2126-8347. E-mail: [melosebastiao@yahoo.com.br](mailto:melosebastiao@yahoo.com.br)

**Resumo:** *Phoradendron mucronatum* and *P. microphyllum* are plants that found in tropical and subtropical areas, used in traditional medicine and popularly known as mistle-thrush. The aim of this study was to identify the chemical constituents of different leaf extracts from *P. mucronatum* and *P. microphyllum* and assess cytotoxic activity against strains from a human tumour cells. Extracts obtained with n-hexane, dichloromethane, chloroform and ethyl acetate from the leaves were analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and the cytotoxicity was assessed by the MTT method (bromide (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide)). The tested human tumour cells were NCI-H292 (human pulmonar mucoepidermoid carcinoma), MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and HEp-2 (epidermoid carcinoma of the larynx). Analysis by GC/MS of the extracts from leaves of *P. microphyllum* and *P. mucronatum* detected 51 different compounds, such as alkaloids, diterpenes, triterpenes, sterols, alcohols, aldehydes, fatty acids and hydrocarbons. In the cytotoxic evaluation, n-hexane and ethyl acetate extracts leaves *P. microphyllum* inhibited cell growth of NCI-H292 strains (72.97%) and HEp-2 (87.53%), respectively. The extracts of *P. mucronatum* species showed an inhibitory effect towards NCI-H292 (83.19%/n-hexane), MCF-7 (88.69%/dichloromethane) and HEp-2 (93.40%/nhexane). The extracts showed cytotoxic activity against the tested strains, especially the *P. mucronatum*, which presented the highest percentages of inhibition of cell growth.

## INTRODUCTION

Most current drugs are derived, directly or indirectly from the chemical constituents of higher plants. About 60% of the drugs used for the treatment of cancer have been isolated from vegetable products (Gordaliza, 2007).

The main plant-derived compounds with anticancer properties are alkaloids and terpenoids (Gupta et al., 2005). Examples are derivatives of etoposide and teniposide lignans (Allen et al., 2005; Choi et al., 2008), vincristine and vinblastine from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Johnson et al., 1963; Carvalhaes et al., 2002), semi-synthetic derivatives of epidophyllotoxin isolated from species of the genus *Podophyllum* (Berberidaceae) (Kelland, 2005), taxol, and docetaxel from *Taxus brevifolia* Nutt. (Wani et al., 1971) and semi-synthetic derivatives from camptothecin, irinotecan and topotecan isolated from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) (Cragg et al., 1993, 1994; Wang, 1998).

The initial screening activity is based on assays that use established cell lines where the toxic effect of plant extracts can be measured. Cytotoxic screening models provide

important preliminary data for selecting plant extracts or compounds with antineoplastic properties (Alonso-Castro et al., 2011).

*Phoradendron* is a genus of the Viscaceae family with approximately 234 species. Mistletoes are plants that occur in tropical and subtropical areas of both hemispheres (Cronquist, 1981). Several species have wide use in traditional medicine. For example, *P. Carneum* Urb., *P. galeottii* Trel., *P. reichenbachianum* (Seem.) Oliver and *P. serotinum* (Raf.) M.C. Johnst are used to treat dermatological disorders and skin tumors (Alonso-Castro et al., 2011).

Phoratoxinas isolated from *P. tomentosum* manifests cytotoxic activity in different cell lines (Johanssona et al., 2003). The methanol extract of the leaves of *P. vernicosum* Greenm. Presented activity against nasopharyngeal carcinoma (Caamal-Fuentesa et al., 2011). The aqueous extract the leaves of *P. serotinum* (Raf.) MC Johnst. caused toxic effects against breast carcinoma (Jacobo-Salcedoa et al., 2011) and ethanol extract shows cytotoxic activity against lung epithelial cells (Alonso-Castro et al., 2012).

The *P. microphyllum* and *Phoradendron mucronatum* species are popularly known as "herbal" or "bird dung" and can be found as parasite species in the northeastern semiarid region of Brazil (Pereira et al., 2007).

Scientific reports concerning this species are scarce. The present study then was mounted to identify the chemical constituents of n-hexane, dichloromethane, chloroform and ethyl acetate extracts from the leaves of *P. mucronatum* and *P. microphyllum* and to evaluate their cytotoxic activity against human tumour cell lines.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **PLANT MATERIAL**

The specie *Phordendron mucronatum* (DC.) Krug & Urb (Viscaceae) was collected in the municipality of Buique - Pernambuco, (08°37'23" S 37°09'21" W). *Phoradendrom microphyllum* (Pohl ex DC.) Trel (Viscaceae) was collected at Fazenda Canto dos Passaros in Sao Jose do Espinharas, Paraiba, (06°52'56" S 37°17'12" W). Samples of *P. mucronatum* and *P. microphyllum* were identified by curators Rita Pereira and Olivia Cano, respectively, and deposited in the Dardano of the Andrade Lima Herbarium of the Agricultural Institute of Pernambuco (IPA) under registration numbers 63330 and 87746, respectively.

## PREPARATION OF THE EXTRACT

A dry powder of the *P. microphyllum* and *P. mucronatum* (30 g) leaves was extracted at room temperature for 30 minutes three times consecutively by maceration in an ultrasonic bath (Uniqu USC - 1400) using solvents with different polarities: n-hexane (Hx), dichloromethane (DCM), chloroform (CF) and ethyl acetate (EtOAc). Then it was filtered and the crude extracts were obtained after evaporation of the solvents under reduced pressure at 40 °C. Ten mg of the extracts was dissolved in 2 mL of ethyl acetate for analysis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS).

## GC-MS ANALYSIS

Analysis of compounds from extracts of *P. microphyllum* and *P. mucronatum* was performed at the Research Center of Natural and Synthetic Products, University of São Paulo (USP-Ribeirão Preto), using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, Shimadzu, model QP 2010. Separation of the chemical constituents was carried out using a DB-5MS column [(5% -Phenyl)-methylpolysiloxane] brand Agilent J&W GC Columns, 30 m long, 0.25 mm internal diameter, thickness of the film 0.25 µm. The carrier gas was helium. The operating conditions of the gas chromatograph were: column internal pressure of 97.4 kPa, column flow of gas at 1.3 ml min<sup>-1</sup> column, injector temperature 260 °C, detector temperature at the interface or (GC/MS) of 290 °C. The initial column temperature was 100 °C for 4 min, followed by an increase of 3 °C min<sup>-1</sup> up to 300 °C and kept constant for 90 min. The split ratio was 5:1. The mass spectrometer was programmed to perform readings in a range of 50 to 500 Da at intervals of 0.30 s, with ionization energy of 70 eV. One µl of the different extracts was injected (10 mg dissolved in 2 mL ethyl acetate). A mixture of linear hydrocarbons (C9-C20, C21-C40) was injected under the same conditions in order to identify the chemical constituents. The identification of the constituents was performed by analyzing and comparing the mass spectra based on data libraries (FFNSC1.3.lib, WILEY7.LIB, NIST08s.LIB, MY LIBRARY.lib) using a GC/MS instrument, whose indices showed a similarity of greater than or equal to 90%. Relative quantification of the components of each sample was obtained from the relative area of the peaks in the chromatograms.

## CYTOTOXIC ACTIVITY

The cytotoxic activity was performed using the MTT method, which consists of a dosage based on the colorimetric conversion of the salt 3-(4,5-dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyl-2-H bromide tetrazolium (MTT) which moved from a yellow color when insoluble [formazan crystals], moving to purple when precipitated due to the action of succinyl-dehydrogenase enzyme presente only in metabolically active cells of mitochondria (Alley et al, 1988; Mosmann, 1983). The human tumour cell lines used were NCI-H292 (lung mucoepidermoid carcinoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma) and HEp-2 (epidermoid carcinoma of the larynx) obtained from the section of cell cultures of Bank Cell in Rio de Janeiro and maintained in accordance with the protocol established by the Cell Culture Laboratory, Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco (UFPE). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic solution (penicillin and streptomycin) and *L*-glutamine, grown in culture plates with 96 wells at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/well, incubated at 37 °C in a humid atmosphere (5% CO<sub>2</sub>) for 24 hours (Butler and Dawson, 1992). Then the extracts Hx, DCM, CF and EtOAc leaves dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) (stock concentration 10 mg/ml) were added to the wells in a single concentration (50 µL/ml) and doxorubicin (5 mg/ml) was used as a positive control. This procedure was performed in triplicate. After 72 hours of plate reincubation, 25 µL of MTT (5 mg/ml) was added to each well. The culture medium with MTT was aspirated, after 3 hours incubation, 100 µL of DMSO was added to each well to dissolve the formazan crystals. The absorbance was measured in a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm. Cell growth inhibition percentage (CI%) was determined considering the mean of negative control as 100% proliferation. An intensity scale was used to assess the cytotoxic potential of the extracts which were as follows: samples without activity, with little activity (cell growth inhibition ranging from 1 to 50%), with moderate activity (cell growth inhibition ranging from 50 to 75%), and high activity (growth inhibition ranging 75 to 100%) (Fouche et al., 2008).

## RESULTS AND DISCUSSION

Analysis by GC/MS of the Hx, DCM, CF and EtOAc extracts from leaves of *P. microphyllum* and *P. mucronatum* detected 51 constituents (Table 1 and Figure 1). These

extracts contained a mixture of different compounds such as alkaloids, diterpenes, triterpenes, sterols, alcohols, aldehydes, fatty acids and hydrocarbons.

The constituents that showed relative larger areas (%), from the extracts of *P. microphyllum* leaves, were Lup-20(29)-en-3-one (Lupenona, 23.07%) and (3 $\beta$ )-Lup-20(29)-en-3-ol (Lupeol, 16.95%) in the Hx. In the DCM and CF extracts were Lupeol (18.53% and 16.19%), Lupenone (14.47% and 12.99%) and (3 $\beta$ )-Estigmast-5-en-3-ol ( $\beta$ -sitosterol, 9.74% and 9.45%), and *N,N*-dimethyl-1H-indole-3-ethanamine (Dimetiltryptamine 18.36%) in CF. In the EtOAc extract, the compounds that had higher percentages were Lupeol (20.86%) and Lupenone (18.69%).

Regarding the extracts of the leaves of *P. mucronatum*, the constituents with the highest percentages were: Lupeol (8.33%), Triacotane (8.71%), Pentacosane (11.37%) in Hx; in DCM, (*Z*)-11-Octadecenoic acid (*cis*-Vaccenic acid, 7.83%), Pentacosane (8.35%); the CF, *cis*-Vaccenic acid (8.35%), Tetracosane (7.85%) and EtOAc, Hexacosane (10.72%), Tetratetracontane (8.2%), Lupenone (10.21%) and Lupeol (22.8%).

Studies with ethanol extract of the aerial parts of *P. greggii* identified and isolated oleanolic acid (Dominguez et al., 1971). Rios et al. (2001) isolated a tetracyclic triterpene (3,4-seco-olean-18-ene-3,28-dioic acid) from the aerial parts of *P. reichenhachianum*. Lopez-Martinez et al. (2013) identified and isolated from the acetone extract of the leaves of *P. brachystachyum* morolico acid as the major component, and  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, triacotanol, squalene,  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin, lupeol, lupenone, betulin, oleanolic aldehyde, betulinic acid, betulonic acid, moronic acid, morolic acid, oleanolic acid.

Some of these compounds, such as  $\beta$ -sitosterol, squalene, lupeol and lupenone were detected in this study, indicating that various constituents are common among the different species of the genus *Phoradendron*. In addition, common constituents in different extracts of *P. microphyllum* and *P. mucronatum* were observed. These are: 7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1-hexadecene, (2*E*)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, (2*R*)-2,5,7,8-Tetramethyl-2-[(4*R*,8*R*)-4,8,12-trimethyltridecyl]-6-chromanol, 4,14-Dimethyl-9,19-cycloergost-24(28)-en-3-yl acetate and Stigmast-4-en-3-one.

Consistent with the diversity of compounds detected, extracts from the leaves of *P. microphyllum* and *P. mucronatum* showed cytotoxic activity against strains analyzed (Table 2). The percentages of inhibition of cell growth of extracts from *P. microphyllum* front line HEp-2 were 86.94% for DCM, 82.08% and 87.53% for EtOAc. The latter extract showed moderate activity (72.97%) against NCI-H292.

The extract Hx of *P. mucronatum* inhibited cell growth of NCI-H292 and Hep-2 at 83.19% and 93.40% respectively. The DCM extracts showed inhibitory effect on HEp-2 (85.47%) and MCF-7 (88.69%). The CF showed inhibition of 77.75% for NCI-H292, and 91.46% for HEp-2 and EtOAc to extract inhibited Hep-2 line (72.17%).

The cytotoxic activity of the *Phoradendron* genus has been reported. The ethanol and aqueous extracts of *P. crassifolium* (Polh) Eichler showed low toxicity in cultured HeLa cells (human cervix carcinoma) (Abad et al., 1999); the methanol extract of the leaves of *P. vernicosum* Greenm showed cytotoxic activity against cell line nasopharyngeal carcinoma (KB) (Caamal-Fuentes et al., 2011); the aqueous extract of the leaves of *P. serotinum* (Raf.) MC Johnston exerted toxic effects against cancer cells MCF-7 (adenocarcinoma human breast) (Jacobo-Salcedo et al., 2011); and the ethanol extract showed cytotoxic activity against TC-1 cells (derived from lung epithelium) (Alonso-Castro et al., 2012).

The percentage of inhibition of cell growth in different extracts may be related to the presence of certain groups of compounds such as alkaloids and triterpenes, known for their anticancer properties (Gupta et al., 2005).

The triterpene has been extensively studied, particularly in research involving the discovery of antitumor compounds (Salem, 2009). Some investigations have been carried out to evaluate the cytotoxic effects of Lupeol on tumour cell lines such as Vero (African Green Monkey kidney), B16F10 (low wall melanoma) and HEp-2 (Badami et al., 2003).

The extracts (Hx, DCM, CF and EtOAc) of *P. microphyllum* and *P. mucronatum* showed cell percentages inhibition above 70% in the HEp-2 strain. It was observed that the triterpene was present in all extracts, but in higher percentages in the extracts of *P. microphyllum*.

Indole alkaloids were found in the two species under study. In the DCM, CF and EtOAc extracts of *P. microphyllum* have 2-(1H-indol-3-yl)-*N,N*-dimethylethanamine, also called Dimethyltryptamine (DMT). In Hx, DCM, CF and EtOAc extracts from *P. mucronatum* Aspidospermine was found and Aspidospermidine in the latter two extracts.

Alkaloids with amine groups and indole rings have been studied and various activities have been found, among them: antitumor, antiviral, antifungal and anti-inflammatory (McNulty et al., 2007; Griffin et al., 2007; Bao et al., 2004; Dassonneville et al., 2000; Xu et al., 2006).

Other research has been carried out with the purpose of showing that the alkaloids have a significant antiproliferative activity for solid tumours. These compounds have also

selective cytotoxicity, a fact that stimulates a better investigation of their anticarcinogenic activity (Zhang et al., 2007; Wang et al., 2005).

Any of the extracts as well as the positive control (doxorubicin) presented an inhibition percentage above 75% (considered with high activity) against the MCF-7 line, except the DCM extract of the leaves of *P. mucronatum*. It is known that the breast cancer MCF-7 cells are resistant to chemotherapy, has low susceptibility to conventional drugs such as doxorubicin and cisplatin. This effect can be attributed to aberrant apoptotic pathway (Del Bufalo et al., 2002; Wesierska-Gadek et al., 2003).

## CONCLUSION

Analysis by GC/MS allowed detection of 51 constituents in extracts of leaves of *P. microphyllum* and *P. mucronatum*. The constituents with higher percentages were Lupenone (23.07%), Lupeol (18.53%) and Dimethyltryptamine (18.36%) for *P. microphyllum* and Pentacosane (11.37%), Hexacosane (10.72%) and Lupenone (10.21%) for *P. mucronatum*. The different extracts of *P. microphyllum* showed cytotoxic activity against cell lines NCI-H292 and Hep-2, while the extracts of the species *P. mucronatum* showed inhibitory action towards the cell lines of NCI-H292, MCF-7, HEp-2. The major cell growth inhibition percentages were observed in the species *P. mucronatum* possibly due to the wide variety of constituents detected.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to express their thanks for the grants and financial support received from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

## RESUMO

*Phoradendron mucronatum* e *P. microphyllum* (Viscaceae) são espécies que ocorrem em zonas tropicais e subtropicais, utilizadas na medicina tradicional e conhecidas popularmente como erva-de-passarinho. O objetivo desse trabalho foi identificar os constituintes químicos dos diferentes extratos das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* e avaliar a atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas. Extratos

hexano, diclorometano, cloroformio e acetato de etila das folhas foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) e a atividade citotóxica foi avaliada pelo método do MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)). As linhagens tumorais testadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) e HEP-2 (carcinoma de laringe humana). A análise por CG/EM dos extratos das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum*, possibilitou detectar 51 constituintes pertencentes a diferentes classes de compostos, como: alcaloides, diterpenos, triterpenos, esteroides, alcoois, aldeídos, ácidos graxos e hidrocarbonetos. Na avaliação citotóxica, os extratos hexano e acetato de etila das folhas de *P. microphyllum* inibiram o crescimento celular das linhagens NCI-H292 (72,97%) e HEP-2 (87,53%), respectivamente. Os extratos da espécie *P. mucronatum* apresentaram efeito inibitório frente NCI-H292 (83,19%/hexano), MCF-7 (88,69%/diclorometano) e HEP-2 (93,40%/hexano). Os extratos mostraram atividade citotóxica contra as linhagens testadas, especialmente a espécie *P. mucronatum*, que apresentou os maiores percentuais de inibição do crescimento celular.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade, cromatografia gasosa, *Phoradendron microphyllum*, *Phoradendron mucronatum*.

## REFERENCES

ABAD MJ, BERMEJO P, GONZALE E, IGLESIAS I, IRURZUN A, GENERAL LC. 1999.

Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *Pharmacology*. 32: 499–503.

ALLEN JD, DORT SCV, BUITELAAR M, TELLINGEN OV, SCHINKEL AH. 2005.

Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by p-glycoprotein. *Cancer Res*. 63: 1339–1344.

ALLEY MC, SCUDIERO DA, MONKS A, HURSEY ML, CZERWINSKI MJ, FINE DL, ABBOTT BJ, MAYO JG, SHOEMAKER RH, BOYD MR. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 48: 589- 601.

ALONSO-CASTRO AJ, VILLARREAL ML, SALAZAR-OLIVOD LA, GOMEZ-SANCHEZE M, DOMINGUEZ F, GARCIA-CARRANCA A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J.Ethnopharmacol.* 133: 945–972.

ALONSO-CASTRO AJ, JUAREZ-VAZQUEZ M DEL C, DOMINGUEZ F, GONZALEZSANCHEZ I, ESTRADA-CASTILLON E, LOPEZ-TOLEDO G, CHAVEZ M, CERBON MARCO A, GARCIA-CARRANCA A. 2012. The antitumoral effect of the American mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae) is associated with there lease of immunity-related cytokines. *J. Ethnopharmacol.* 142: 857–864.

BADAMI S, VIJAYAN P, MATHEW N, CHANDRASHEKHAR R, GODAVARTHI A, DHANARAJ SA, SURESH B. 2003. *In vitro* cytotoxic properties of *Grewia tiliaefolia* bark and lupeol. *Indian J. Pharmacol.* 35: 250-251.

BAO B, SUN Q, YAO X, HONG J, LEE CO, SIM CJ, IM KS, JUNG JH. 2004. Citotoxic bisindole alkaloids from a marine sponge *Spongosorites* sp. *J. Nat. Prod.* 68: 711-715.

BUTLER M., DAWSON MM. 1992. *Cell culture*. Oxford: Bios Scientific. 268 p.

CAAMAL-FUENTESA E, TORRES-TAPIAA LW, SIMA-POLANCOB P, PERAZASANCHEZA SR, MOO-PUCC R. 2011. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *J. Ethnopharmacol.* 135: 719–724.

CARVALHAES SF, COSTA DL, MAZZEI JL, TADDEI LEM, D'AVILA LA. 2002. Alternative extraction of alkaloid anticarcinogens from Brazilian "vinca rosea" using ion Exchange chromatography. *Rev. Bras. Farmacogn.* 12: 83-84.

CHOI HJ, CHO BC, SHIN SJ, CHEON SH, JUNG JY, CHANG J, KIM SK, SOHN JH, KIM JH, 2008. Combination of topotecan and etoposide as a salvage treatment for patients with recurrent small cell lung cancer following irinotecan and platinum first-line chemotherapy. *Cancer Chemoth. Pharm.* 61: 309–313.

COSTA-LOTUFO LV, MONTENEGRO RC, ALVES APNN, MADEIRA SVF, PESSOA C, MORAES MEA, MORAES MOA. 2010. Contribuicao dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Farmacos Anticancer: Estudos no Laboratorio Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceara. *Rev. Virtual Quim.* 2: 47-58.

CRAGG GM, SCHEPARTZ SA, SUFFNESS M, GREVER MR. 1993. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J. Nat. Prod.* 56: 1657–1668.

CRONQUIST A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press. 1262 p.

DASSONNEVILLE L, LANSIAUX A, WATTELET A, WATTEZ N, MAHIEU C, MIERT SV, PIETER, L, BAILLY C. 2000. Cytotoxicity and cell cycle effects of the plant alkaloids cryptolepine and neocryptolepine: relation to drug-induced apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* 409: 9-18.

DEL BUFALO D, BIROCCIO A, TRISCIUOGLIO D, BRUNO T, FLORIDI A, AQUINO A, ZUPI G, 2002. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used. *Eur. J. Cancer.* 38: 2455–2462.

DOMINGUEZ XA, ROJAS P, SANZ VR. 1971. Oleanolic acid from *Phoradendron greggii*. *Phytochemistry.* 10: 1692.

FOUCHE G, CRAGG GM, PILLAY P, KOLESNIKOVA N, MAHARAJ VJ, SENABE J. 2008. *In vitro* anticancer screening of South African plants. *J. Ethnopharmacol.* 119: 455-461.

GORDALIZA M. 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* 9: 767–776.

GRIFFIN C, SHARDA N, SOOD D, NAIR J, MCNULTY J, PANDEY S, 2007. Selective cytotoxicity of Pancratistatin-relates natural *Amaryllidaceae* alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. *Cancer Cell Int.* 7: 01-07.

GUPTA R, GABRIELSEN B, FERGUSON SM. 2005. Nature's medicine: Traditional knowledge and intellectual property management. Case studies from the National Institutes of Health (NIH), USA. *Curr. Drug. Discov. Technol.* 2: 203-219.

JACOBO-SALCEDO, M. DEL R, et al. 2011. Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Mexican Medicinal Plants. *Nat. Prod. Commun.* 6: 1925 – 1928.

JOHANSSON S, GULLBO J, LINDHOLM P, EK B, THUNBERG E, SAMUELSSON G, LARSSON R, BOHLIN L, CLAESON P. 2003. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 165–175.

JOHNSON IS, ARMSTRONG JG, GORMAN M, 1963. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res.* 23: 1390-1397.

KELLAND LR. 2005. Emerging drugs for ovarian cancer. *Expert. Opin. Emerg. Drugs.* 10: 413–424.

LOPEZ-MARTINEZ S, NAVARRETE-VAZQUEZ G, ESTRADA-SOTO S, LEON-RIVERA I, RIOS MY. 2013. Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae). *Nat. Prod. Res.* 27: 130–136.

MOSMANN T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55–63.

MCNULTY J, NAIR JJ, BASTIDA J, PANDEY S, GERASIMOFF J, GRIFFIN C. 2007. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Photochemistry.* 68: 1068-1074.

PEREIRA CP, XAVIER HS, PIMENTEL RMM. 2007. Estudo Morfoanatomico Foliar de *Phoradendron mucronatum* (D.C.) Krug. & Urb. *Rev. Bras. Bioci.* 5: 708-710.

RIOS MY, SALINAS D, VILLARREAL ML. 2001. Cytotoxic Activity of Moronic Acid and Identification of the New Triterpene 3,4-seco-Olean-18-ene-3,28-dioic Acid from *Phoradendron reichenbachianum*. *Planta Med.* 67: 443-446.

SALEEM M, 2009. Lupeol, a novel-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.* 285: 109-115.

WANG HK. 1998. Plant-derived anticancer agents currently in clinical use or clinical trials. *IDrugs.* 1: 92–102.

WANG Y, CHAN FL, LEUNG LK, 2005. The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. *Life Sci.* 77: 39-51.

WANI MC, TAYLOR HL, WALL ME, 1971. Plant antitumor agents. The isolation and structure of taxol, a novel leukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2325-2327.

WESIERSKA-GADEK J, GUEORGUIEVA M, HORKY M. 2003. Dual action of cyclin dependent kinase inhibitors: induction of cell cycle arrest and apoptosis. A comparison of the effects exerted by roscovitine and cisplatin. *Pol. J. Pharmacol.* 55: 895–902.

XU YK, YANG SP, LIAO SG, ZHANG H, LIN LP, YUE JM. 2006. Alkaloids from *Gelsemium elegans*. *J. Nat. Prod.* 69: 1347-1350.

ZHANG J, YU D, LIU D, LIU Z. 2007. Extraction and composition of three naturally occurring anticancer alkaloids in *Camptotheca acuminata* seed and leaf extracts. *Phytomedicine.* 14: 50-56.

**Figure 1.** Constituents identified in extracts of leaves of *P. mucronatum* by GC/MS with the highest similarity indices or equal to 90%.

RT (min)	MW	Compound	Molecular formula	Relative Amount%			
				Hx (1)	DCM (2)	CF (3)	ACOEt (4)
30,145 (4) 30,155 (1) 31,030 (2,3)	278	7,11,15-Trimethyl-3- methylene-1-hexadecene	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	0,15	0,64	0,78	0,56
31,585	278	7,11,15-Trimethyl-3- methylene-1-hexadecene	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	-	-	-	0,56
33,145 (4) 33,150 (1) 34,000 (2)	270	Methyl palmitate	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0,42	0,21	-	0,25
35,200 (2) 35,215 (3)	256	Palmitic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	-	6,15	7,25	-
38,365	294	Methyl (9 <i>E</i> ,12 <i>E</i> )-9,12- octadecadienoate	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0,27	-	-	-
38,590	296	Methyl (9 <i>E</i> )-9-octadecenoate	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	0,36
38,600	296	Methyl (11 <i>E</i> )-11- octadecenoate	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	0,55	-	-	-
38,885 (4) 38,910 (1)	296	(2 <i>E</i> )-3,7,11,15-Tetramethyl-2- hexadecen-1-ol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	0,35	-	-	0,36
39,315	302	5,8,11,14,17-Icosapentaenoic acid	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	0,16	-	-	-
40,395	280	(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> )-9,12-octadecadienoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	-	2,08	2,12	-
40,650	282	( <i>Z</i> )-11-Octadecenoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	-	7,83	8,35	-
41,380	284	Stearic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	-	0,89	0,94	-
48,195 (1) 48,210 (4) 48,940 (2,3)	292	12-Hydroxy-14-methoxy-3- methyl-3,4,5,6,7,8,9,10- octahydro-1 <i>H</i> -2- benzoxacyclododecin-1-one	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	1,43	4,51	4,37	5,87
55,320 (1,2,4) 56,175 (3)	354	Aspidospermine	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,52	1,22	1,20	1,30
57,455 (1,4) 58,370 (2,3)	410	2,6,10,15,19,23-Hexamethyl- 2,6,10,14,18,22-tetracosahexene	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	4,46	3,25	3,51	3,86
57,820 (4) 58,680 (3)	384	Aspidospermidine	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	2,92	2,59
59,630	366	Hexacosane	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	-	-	-	10,72
59,640	352	Pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	11,37	-	-	-
60,530	338	Tetracosane	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	-	-	7,85	-
60,535	352	Pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	-	8,35	-	-
61,830	394	Octacosane	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	0,92	-	-	-
63,995 (4) 64,900 (3)	619	Tetratetracontane	C <sub>44</sub> H <sub>90</sub>	-	-	6,36	8,02
64,005	422	Triacontane	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	8,71	-	-	-

64,205 (4) 64,210 (1) 65,085 (2)	430	((2 <i>R</i> )-2,5,7,8-Tetramethyl-2- [(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i> )-4,8,12- trimethyltridecyl]-6-chromanol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	0,32	0,23	-	0,52
64,905	366	Hexacosane	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	-	7,20	-	-
67,720 (4) 67,735 (1) 68,625 (2,3)	414	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	5,85	5,61	5,08	6,48
68,740 (4) 69,655 (2,3)	424	Lup-20(29)-en-3-one	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	-	7,46	7,19	10,21
69,120 (3) 69,125 (2)	410	1-Octacosanol	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O	-	0,84	0,75	-
69,315 (4) 69,320 (1) 70,230 (2,3)	426	(3β)-Lup-20(29)-en-3-ol		8,33	5,63	5,59	8,22
69,975 (1,4) 70,885 (3) 70,895(2)	468	4,14-Dimethyl-9,19-cycloergost- 24(28)-en-3-yl acetate	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	3,21	2,19	1,95	2,54
70,225 (1) 70,230 (4) 70,885 (3) 71,120 (2)	412	Stigmast-4-en-3-ona	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	5,62	3,97	3,92	5,64
70,970	268	Stearaldehyde	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	0,53	-	-	-

RT: retention time; MW: molecular weight; Hx: hexane (1), DCM: dichloromethane (2), CF: chloroform (3) and EtOAc: ethyl acetate (4).

**Table 1.** Constituents identified in extracts of leaves of *P. microphyllum* by GC/MS with the highest similarity indices or equal to 90%.

RT (min)	MW	Compound	Molecular formula	Relative Amount%			
				Hx (1)	DCM (2)	CF (3)	AcOEt (4)
28,535 (2) 28,505 (3) 28,660 (4)	188	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)- N,Ndimethylethanamine	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	-	8,21	18,36	3,60
30,160 (2,3) 30,165 (4)	278	7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1- hexadecene	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	-	0,29	0,62	0,39
37,025	328	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> Si	-	-	-	0,33
38,895 (1,2,4) 38,890 (3)	296	(2 <i>E</i> )-3,7,11,15-Tetramethyl-2- hexadecen-1-ol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	7,20	6,61	6,33	7,26
49,945	254	Octadecane	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	0,56	-	-	-
52,495	268	Nonadecane	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	0,60	-	-	-
54,955	394	Octacosane	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	1,49	-	-	-

57,325	338	Tetracosane	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	1,59	-	-	-
57,460 (1) 57,465 (2,3,4)	410	2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	2,46	2,73	2,07	2,62
59,625 (1) 59,630 (2,3,4)	408	Nonacosane	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	5,32	3,02	3,00	2,85
61,840	310	Docosane	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	1,06	-	-	-
63,995	352	Pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	0,91	-	-	-
64,220 (1,2,3) 64,225 (4)	430	(2 <i>R</i> )-2,5,7,8-Tetramethyl-2-[(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i> )-4,8,12-trimethyltridecyl]-6-chromanol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	1,16	1,35	1,42	1,20
67,735 (2,3) 67,730 (4)	414	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	-	9,74	9,45	8,37
68,730 (1) 68,735 (2) 68,740 (3,4)	424	Lup-20(29)-en-3-one	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	23,07	14,47	12,99	18,69
69,310 (1) 69,320 (2) 69,315 (3) 69,325 (4)	426	(3β)-Lup-20(29)-en-3-ol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	16,95	18,53	16,19	20,86
69,985 (2,3) 69,975 (4)	468	4,14-dimethyl-9,19-cycloergost-24(28)-en-3-yl acetate	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	-	3,51	2,77	4,06
70,230 (1) 70,235 (2,3,4)	412	Stigmast-4-en-3-one	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	8,72	6,75	5,68	8,53
73,100 (2,3) 73,105 (4)	278	7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1-hexadecene	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	-	5,17	4,82	4,25

RT: retention time; MW: molecular weight; Hx: hexane (1), DCM: dichloromethane (2), CF: chloroform (3) and EtOAc: ethyl acetate (4).

**Table 2.** Cell growth inhibition percentage (%) of the extracts from leaves of *P. microphyllum* and *P. mucronatum* in three tumor cell lines at a concentration of 50 µg/ml by MTT method after 72 hours incubation.

<i>Phoradendron mucronatum</i> Extracts	% inhibition		
	NCI-H292 <sup>a</sup>	HEp-2	MCF-7
Hx	83,19 ± 3,86	93,40 ± 0,52	58,89 ± 4,53
DCM	62,25 ± 3,72	85,47 ± 2,40	88,69 ± 5,66
CF	77,75 ± 4,50	91,46 ± 0,97	40,93 ± 4,28
EtOAC	36,29 ± 2,99	72,17 ± 5,87	48,38 ± 2,19
Doxorubicina <sup>b</sup> (5 µg/ml)	89,80 ± 0,32	86,64 ± 3,48	56,19 ± 5,32
DMSO (10 mg/ml)	0.0	0.0	0.0

<i>Phoradendron microphyllum</i> Extracts	% inhibition		
	NCI-H292	HEp-2	MCF-7
Hx	0	37,79 ± 0,50	44,86 ± 5,26
DCM	38,48 ± 3,77	86,94 ± 2,23	52,54 ± 0,77
CF	62,98 ± 6,14	82,08 ± 8,43	58,11 ± 5,22
EtOAC	72,97 ± 7,41	87,53 ± 2,38	57,52 ± 5,87
Doxorubicina <sup>b</sup> (5 µg/ml)	89,80 ± 0,32	86,64 ± 3,48	56,19 ± 5,32
DMSO (10 mg/ml)	0.0	0.0	0.0

<sup>a</sup>Human tumor cells lines: NCI-H292 (human pulmonary mucoepidermoid carcinoma); MCF-7 (human breast carcinoma) and HEp-2 (human larynx carcinoma); <sup>b</sup>Positive control (Doxorubicine - 5 µg/ml); Hx: hexane extract; DCM: dichloromethane extract; CF: chloroform extract and EtOAC: ethyl acetate extract; DMSO: dimethylsulfoxide (Negative control - 10 mg/ml).

**Capítulo 2** – Avaliação das atividades biológicas *in vitro* dos extratos metanólicos de duas espécies do gênero *Phoradendron* (viscaceae)

Bastos, I.V.G.A<sup>1</sup>; Castro, V.T.N.A.<sup>2</sup>; Corrêa, A.J.C.<sup>2</sup>; Melo, J.G.S.<sup>1</sup>; Araújo, L.C.C.<sup>1</sup>;  
Amorim, E.L.C.<sup>2</sup>; Militão, G.C.G.<sup>3</sup>; Silva, T. G.<sup>1</sup>; Melo, S.J.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> – Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); <sup>2</sup> – Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); <sup>3</sup> – Departamento de Farmacologia e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi realizar a triagem fitoquímica, determinar o teor de compostos fenólicos e avaliar as atividades antioxidante, hemolítica, citotóxica e microbiana dos extratos metanólicos das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum*. O perfil fitoquímico dos extratos foi realizado por cromatografia em camada delgada, com diferentes fases móveis e reveladores. O conteúdo de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. O teor de flavonóides totais e taninos também foram avaliados. A atividade antioxidante dos extratos foi determinado pelo método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Para a realização dos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens celulares HEP-2, NCI-H292, MCF-7 e eritrócitos de camundongos para verificar o potencial hemolítico dos extratos. A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em Ágar. O perfil fitoquímico evidenciou: açúcares redutores, flavonóides, alcalóides, triterpenos/esteróides, monoterpênos, sesquiterpenos e diterpenos, proantocianidinas e leucoantocianidina. O conteúdo fenólico total foi  $479,64 \pm 44,07$  e  $139,42 \pm 10,78$  mg equivalente de ácido tânico/g dos extratos de *P. mucronatum* e *P. microphyllum*, respectivamente. O extrato de *P. mucronatum* apresentou atividade antioxidante. Os extratos se mostraram inativos frente à hemólise das hemácias e apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem HEP-2. Não foi evidenciada atividade antimicrobiana frente às linhagens testadas, exceto para o levedura *Candida albicans*. Os resultados obtidos mostram que *P. microphyllum* e *P. mucronatum* podem ser uma fonte de metabólitos secundários além de apresentarem atividades biológicas significativas.

**Palavras-chave:** Fitoquímica, compostos fenólicos, antioxidante, citotoxicidade, antimicrobiana.

## INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas popularmente para tratar várias doenças; em particular, a família Viscaceae com grande utilização terapêutica. Espécies do gênero *Phoradendron* são conhecidas como “erva-de-passarinho” ou “enxerto de passarinho” devido à importância dos pássaros na disseminação das sementes. A grande maioria vive em climas tropicais e subtropicais, sendo escassas em climas temperados (KISSMANN; GROTH, 1995).

Algumas espécies de *Phoradendron* foram estudadas em relação às atividades biológicas como *P. robinsonii* - atividade antimicrobiana (RIVERO-CRUZ et al., 2005); *P. liga* – atividade imunomodulatória (VARELA et al., 2004); *P. tomentosum* – atividade antitumoral (JOHANSSON et al., 2003); *P. reichenhachianum* – atividade citotóxica (RIOS et al., 2001); *P. crassifolium* – atividade citoprotetora (GONZALES et al., 2000); *P. juniperinum* – atividade anti-HIV (KASHIWADA et al., 1998); *P. piperoides* – atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (CAVALCANTI et al., 2003).

Estudos fitoquímicos deste gênero relatam vários tipos de constituintes dentre eles, lectinas (VARELA et al., 2004); phoratoxinas (JOHANSSON et al., 2003); triterpenos (RIOS et al., 2001) e flavonóides (RIVERO-CRUZ et al., 2005). Esses metabólitos apresentam grande importância em decorrência de suas aplicações terapêuticas e biotecnológicas.

Diante das atividades atribuídas aos metabólitos secundários e da ausência de informações sobre a composição química e atividade biológica de *P. mucronatum* e *P. microphyllum*, o objetivo deste trabalho foi realizar o screening fitoquímico dos extratos metanólicos das folhas e avaliar a atividade antioxidante, citotóxica, hemolítica, antimicrobiana bem como determinar o teor de compostos fenólicos, taninos e flavonóides.

## MATERIAIS E MÉTODO

### Material vegetal

A espécie *P. mucronatum* foi coletada no município de Buíque – Pernambuco (08°37'23''S 37°09'21'' W) e *P. microphyllum* foi coletada na Fazenda Canto dos Pássaros no município de São José dos Espinharas – Paraíba (06°52'56''S e 37°17'12'' W). Um exemplar de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* foi identificado pelas curadoras Rita Pereira e Olivia Cano, respectivamente e depositados no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob números de registros 63.330 e 87.746.

## **Preparo dos extratos**

As amostras (folhas) de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* foram estabilizadas em estufa durante 3 dias a  $45^{\circ} \pm 5^{\circ}$  C, pulverizadas em moinho de facas (795 g e 135 g, respectivamente) e em seguida foram submetidas à maceração exaustiva a frio em metanol PA (Merck®) a temperatura ambiente e protegido da luz. As extrações foram realizadas em intervalos de 5 dias entre cada extração. Foram feitas 3 extrações, até o completo esgotamento do material vegetal. A solução extrativa filtrada foi submetida à destilação do solvente em evaporador rotatório (TE 120, Tecnal®, Brasil) sob pressão reduzida a uma temperatura média de 40 °C.

## **Avaliação fitoquímica preliminar**

Para execução da triagem fitoquímica preliminar, alíquotas (1 mg) dos extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando-se como fase estacionária placas cromatográficas de gel de sílica (ALUGRAM® SIL G/UV254, Ref: 818133). As fases móveis e reveladores foram selecionados de acordo com o grupo de moléculas a ser pesquisado com base nos estudos de Harbone (1998) e Wagner; Bladt (1996).

## **Determinação do teor fenólico total (TFT) e do teor de tanino total (TTT)**

A determinação espectrofotométrica dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e o teor de fenóis residuais foi obtido pelo método de precipitação de caseína seguido do reagente Folin-Ciocalteu, onde o TTT é a diferença entre os níveis de fenóis totais e residuais (AMORIM et al., 2008). O TFT foi calculado utilizando alíquotas de 0,2 mL dos extratos metanólicos brutos (EMB) das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* diluídos (1 mg/mL, p/v) e transferido para tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu (10%, v/v), 1 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%, p/v) e 10 mL de água destilada. As amostras permaneceram em repouso no escuro durante 30 minutos a temperatura ambiente e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 760 nm contra um branco preparado com água destilada. A curva de calibração foi obtida fazendo-se uso de oito diluições de ácido tânico (0,5 – 10 µg/mL) e submetida ao mesmo procedimento que os extratos. Para calcular o conteúdo fenólico residual, 15 mL de extrato diluído (1 mg/mL, p/v) foi agitado

constantemente durante 3 horas com 1 g de caseína. Após filtração, o volume foi ajustado a 25 mL com água destilada. Em seguida, 1 mL do filtrado foi adicionado a 500 µL de Folin-Ciocalteu, 1 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5% , p/v) e 7,5 mL de água destilada. O TFT e TTT foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido tânico por grama de extrato (mg EAT/g). As amostras foram avaliadas com seis repetições. A equação de calibração do ácido tânico foi  $y = 0,0661x + 0,634$  ( $R^2 = 0,9689$ ).

### **Determinação do teor de flavonóides totais (TFLT)**

O TFLT dos extratos foi estimado pelo método colorimétrico baseado na formação de um complexo entre o flavonóide e o cloreto de alumínio (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008). O TFLT foi calculada usando 0,2 mL dos EMB diluídos (1 mg/mL, p/v), 0,12 mL de ácido acético glacial, 2 mL de piridina em metanol (20%, v/v), 0,5 mL de cloreto de alumínio em metanol (5%, p/v) e 7,18 mL de água destilada. A solução foi deixada em repouso no escuro durante 30 min e a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 420 nm. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de rutina por cada grama do extrato (mg RU/g). As amostras foram avaliadas com seis repetições. A curva de calibração foi obtida fazendo-se uso de oito diluições de rutina (0,5 – 20 µg/mL) e submetida ao mesmo procedimento dos extratos. A equação de calibração de rutina foi  $y = 0,0167x + 0,0242$  ( $R^2 = 0,969$ ).

### **Atividade de sequestro de radicais livres (método DPPH•)**

O ensaio de sequestro do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi efetuado em triplicata, com base no método descrito por Sousa et al. (2007) e modificado por Saraiva et al. (2011). Em tubos de ensaio, 5 mL do EMB em diferentes concentrações (25 a 500 µg/mL) foram adicionados 3 mL de solução metanólica de DPPH (50 µg/mL, p/v). A solução foi deixada em repouso durante 30 min sob abrigo da luz e, em seguida, a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. As medições foram comparadas com o controle negativo preparado a partir de 0,5 mL da solução de DPPH (50 µg/mL) em 3 mL de metanol. Foi preparado um branco (1mL metanol + 2,5 mL do extrato) para cada concentração testada O ácido ascórbico (500 µg/mL) foi utilizado como padrão. A atividade de remoção de radicais livres foi expressa como a porcentagem de inibição utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{ABS_{cn} - (ABS_{amostra} - ABS_{branco})}{ABS_{cn}} \times 100$$

Onde:  $ABS_{cn}$  é a absorbância do controle negativo;  $ABS_{amostra}$  é a absorbância da amostra;  $ABS_{branco}$  é a absorbância das concentrações da amostra diluída em metanol.

O resultado final do ensaio de DPPH foi calculado a partir de uma curva de calibração obtida pela percentagem de atividade de sequestro de radicais DPPH contra as concentrações dos extratos e do controle negativo, e esta atividade foi expressa como  $CE_{50}$ , ou seja, a concentração de amostra requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH•.

### **Atividade Antimicrobiana**

As culturas microbianas (bactérias e leveduras) pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE foram inoculadas em Ágar Muller-Hinton ou Sabouraud Ágar (SAB) e após 24 horas de incubação a  $37 \pm 1$  °C foram suspensas em 5 mL de solução fisiológica estéril e padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland que correspondente a uma concentração de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL para bactérias e  $10^7$  UFC/mL para leveduras. O inóculo foi realizado com swab estéril na superfície das placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura, procedendo subsequentemente à perfuração asséptica dos poços (perfurador de 6,0 mm de diâmetro). A seguir, os poços foram completamente preenchidos com auxílio de pipeta automática na razão de 50 µL do EMB das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* utilizando intervalos de 12,5 mg/mL a 100 mg/mL (fator 2), além do antibiótico Gentamicina (100 µg/mL), Cetoconazol (50 µg/mL) como anti-microbiano e o dimetilsufóxido (DMSO) à 30% como controle negativo. Em seguida, as placas foram incubadas à  $37$  °C  $\pm 1$  por 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata. As medidas dos halos de inibição e seus resultados foram avaliados conforme os seguintes parâmetros: halos < 9 mm, inativo; 9-12 mm, pouco ativo; 13-18 mm, ativo; > 18 mm, muito ativo (ALVES, 2000).

### **Atividade Citotóxica**

A atividade citotóxica foi realizada pela dosagem colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difenil-2-H-brometo tetrazólio (MTT) de cor amarela a formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita devido à ação da enzima succinil-desidrogenase presente somente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram: HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama) obtidas da seção de culturas celulares do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e L-glutamina, cultivadas em placas de cultura com 96 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço, incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida (5% de CO<sub>2</sub>) durante 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992). Em seguida, os EMB das folhas dissolvidos em DMSO (concentração estoque de 10 mg/mL) foram adicionados aos poços em concentração única (50 µg/mL) e a doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Após 72 horas de reincubação das placas foi adicionado em cada poço 25 µL do MTT (5 mg/mL). O meio de cultura com MTT foi aspirado após 3 h de incubação e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro de placas no comprimento de onda de 540 nm.

O percentual de inibição do crescimento celular (IC%) foi determinado considerando a média do controle negativo como 100% de proliferação. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico dos extratos. Amostras sem atividade, com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com moderada atividade (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com alta atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%) (FOUCHE et al., 2008).

### **Atividade Hemolítica**

Os extratos foram avaliados quanto ao potencial em causar lesões na membrana plasmática das células, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. O sangue foi

coletado de camundongos swiss (*Mus musculus*), previamente anestesiados, por punção cardíaca (n=3). Os eritrócitos foram lavados em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10 mM) e centrifugados (3000 rpm/5 min), o sobrenadante foi descartado e então as células foram ressuspensas em solução salina para se obter uma solução de eritrócitos (SE) a 2 %. Em seguida, os EMB na concentração de 500 µg/mL foram incubados com eritrócitos em placa de 96 poços. Após 1 hora de incubação sob agitação constante e temperatura ambiente, e repouso pelo mesmo período de tempo, o sobrenadante foi analisado. A leitura óptica foi realizada em leitor automático de placas (450 nm). Neste ensaio, a concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e o respectivo intervalo de confiança 95 % (IC95%) foram determinados. Apenas os extratos que apresentarem valores de CE<sub>50</sub> < 200 µg/mL foram considerados citotóxicos (COSTA LOTUFO et al., 2005).

### **Análise estatística**

Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão e avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de *t*-student com intervalos de confiança de 95 %, utilizando o software *Graph Pad Prism 5.0*. Valores de “p” menores que 0,05 (p < 0,05) foram considerados significativos.

### **Resultados e Discussão**

#### **Avaliação fitoquímica preliminar**

Os EMB das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* apresentaram as mesmas classes de metabólitos secundários, dentre elas: Açúcares redutores, Alcalóides, Monoterpenos e Sesquiterpenos, Triterpenos e Esteróides, Flavonóides, Leucoantocianidina e Proantocianidinas condensadas. Não foram observados saponinas em nenhum dos dois extratos.

Algumas espécies do gênero *Phoradendron* têm sido estudadas quanto ao perfil fitoquímico. Cortez e colaboradores (1988) realizaram ensaios com o extrato etanólico das folhas de *P. latifolium* (SW) Griseb e verificaram a presença de fenóis, taninos condensados, flavonóides, saponinas, triterpenos e esteróides. O screening fitoquímico das folhas em diferentes extratos (hexano, diclorometano, etanol e aquoso) de *P. crassifolium* Eichl. demonstrou a presença de saponinas, flavonóides e taninos (GONZALES, 2000). Estudos

realizados com o extrato aquoso das folhas e do caule de *P. liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. constatou a presença de proantocianidinas e flavonóides (VARELA et al., 2004).

Diante dos dados apresentados na literatura, diferentes classes de metabólitos secundários foram identificadas para o gênero *Phoradendron*. Alguns em concordância com o presente estudo para as espécies *P. microphyllum* e *P. mucronatum* como flavonóides, proantocianidinas condensadas, triterpenos e esteróides, e outros não identificados como as saponinas. Esses resultados divergentes podem estar relacionados aos diferentes solventes utilizados na extração e/ou reveladores distintos, ou ainda por fatores como local e período da coleta.

### Compostos fenólicos e atividade antioxidante

O teor de fenóis totais bem como de flavonóides e taninos totais estão mostrados na Tabela 1. O EMB das folhas de *P. mucronatum* foi o que apresentou maior conteúdo de fenóis totais  $479,64 \pm 44,07$  mg EAT/g e de taninos  $422,68 \pm 49,62$  mg EAT/g, enquanto que o EMB das folhas de *P. microphyllum* apresentou maior teor de flavonóides totais  $106,19 \pm 26,46$  (mg RU/g).

Observa-se também na tabela 1, maior nível de atividade antioxidante para o EMB das folhas de *P. mucronatum* com  $CE_{50} = 38,13 \pm 7,09$   $\mu$ g/mL.

**Tabela 1.** Teor de fenóis totais (TFT), teor de taninos totais (TTT), teor de flavonóides totais (TFLT) e atividade antioxidante dos extratos metanólicos de duas espécies do gênero *Phoradendron*.

Amostra	TFT (mg EAT/g)	TTT (mg EAT/g)	TFLT (mg RU/g)	Sequestro do radical livre DPPH $CE_{50}$ ( $\mu$ g/mL)
<i>P. mucronatum</i>	$479,64 \pm 44,07$	$422,68 \pm 49,62$	$21,69 \pm 4,03$	$38,13 \pm 7,09$
<i>P. microphyllum</i>	$139,42 \pm 10,78^{****}$	$81,76 \pm 12,37^{****}$	$106,19 \pm 26,46^{**}$	$388,23 \pm 15,45^{****}$
Ácido ascórbico	-	-	-	$12,43 \pm 1,16^{*/****}$

Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=6) e (n=3) para o ensaio com DPPH. \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . EAT = equivalente de ácido tânico; RU = equivalente de rutina.  $CE_{50}$  = concentração efetiva 50%.

Conforme Melo et al., 2010, a atividade antioxidante pode ser classificada em comparação com o padrão utilizado: 1) elevada atividade ( $CE_{50} < 68,88 \mu\text{g/ml}$ , até três vezes a concentração inibitória do padrão); 2) atividade moderada ( $68,88 \mu\text{g/ml} < CE_{50} < 160,72 \mu\text{g/ml}$ , entre três e sete vezes a concentração inibitória do padrão); 3) baixa atividade ( $CE_{50} > 160,72 \mu\text{g/ml}$ , sete vezes superior a concentração inibitória do padrão). Usando esta classificação, o EMB das folhas de *P. mucronatum* apresentou elevada atividade para eliminar os radicais de DPPH utilizando a  $CE_{50}$  do ácido ascórbico ( $12,43 \pm 1,16 \mu\text{g/ml}$ ) enquanto que o EMB das folhas de *P. microphyllum* apresentou baixa atividade antioxidante pelo método do DPPH•.

Os compostos fenólicos, representados principalmente por taninos e flavonóides, destacam-se como o principal grupo de antioxidantes naturais. Eles atuam como sequestradores eficientes de radicais livres e, devido à sua capacidade de doar hidrogênio, eles interrompem reações oxidativas em cadeia (DELAZAR et al, 2006; HIGDON , 2003; FREI, 2003). De acordo com os resultados apresentados o conteúdo fenólico foi maior para o EMB das folhas de *P. mucronatum* o que poderia justificar uma maior capacidade antioxidante em relação ao EMB das folhas de *P. microphyllum*.

Estudos tem demonstrado uma significativa relação entre o conteúdo fenólico nos extratos de plantas e a capacidade antioxidante. Por exemplo, uma pesquisa realizada por Soleh e Hammed (2009) com seis espécies de *Ficus* (Moraceae) mostrou que as frações butanólicas e de acatato de etila apresentam forte associação entre a TFT e TFLT, sugerindo que esses grupos são responsáveis pela capacidade antioxidante das amostras.

### **Atividade antimicrobiana**

Os resultados da atividade antimicrobiana dos EMB das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* estão apresentados na Tabela 2.

Os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos diferentes tipos de microorganismos testados através do método de difusão em ágar, com exceção para *C. albicans* cujos halos de inibição nas doses de 50 e 100 mg/mL foram 17 e 18 mm para o EMB de *P. microphyllum* e de 18 e 22 mm para o EMB *P. mucronatum*, respectivamente.

O extrato diclorometano do caule de *P. obtusissimum* (Miq.) Eichl apresentou atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* (GRAHAM, et al., 2003) e o extrato aquoso das folhas de *P. longifolium* Eichler ex. Trel. apresentou alto potencial antimicrobiano contra *Acinetobacter lwoffii* (JACOBO-SALCEDO et al., 2011). A parte aérea

de *P. amplifolium* apresentou atividade contra o fungo *Penicillium oxalicium* e ausência de atividade nos ensaios anti-bacterianos (FREI et al., 1998), o que corrobora com o presente estudo, pois os extratos foram eficaz apenas contra o fungo *C. albicans*.

Tratando-se da atividade antimicrobina dos EMB das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* os resultados deste trabalho sugerem a realização de novos ensaios com outras cepas de origem fúngica.

**Tabela 2** – Atividade antimicrobiana do extrato metabólico bruto das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* através do método de difusão em agar.

Micro-organismos	Extrato de <i>P. microphyllum</i> (mg/mL)				Extrato de <i>P. mucronatum</i> (mg/mL)				Gentamicina (µg/mL)	Cetoconazol (µg/mL)	DMSO
	100	50	25	12,5	100	50	25	12,5	100	50	(30%)
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02	-	-	-	-	-	-	-	-	43	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 86	-	-	-	-	-	-	-	-	39	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> UFPEDA 100	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
<i>Escherichia coli</i> UFPEDA 224	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> UFPEDA 396	-	-	-	-	-	-	-	-	35	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i> UFPEDA 71	-	-	-	-	-	-	-	-	48	-	-
<i>Candida krusei</i> UFPEDA 1002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	-
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007	18	17	15	9	22	18	18	15	-	35	-
<i>Malassezia furfur</i> UFPEDA 1320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	-

Os valores foram expressos como média (n=3). Os halos de inibição foram medidos em mm. DMSO: dimetilsufóxido.

### Atividade Citotóxica

A citotoxicidade frente às linhagens tumorais foi avaliada pelo método do MTT e os resultados estão dispostos na tabela 3. Segundo o critério de classificação proposto por Fouche et al. (2008), os EMB das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* foram considerados com pouca atividade citotóxica (inibição menor que 50 %) frente as células NCI-H292 e MCF-7. No entanto, os referidos extratos apresentaram alta atividade citotóxica (inibição variando entre 75 a 100 %) para a linhagem tumoral HEp-2 com percentual de inibição celular de  $93,18 \pm 0,25$  e  $93,66 \pm 0,24$ , respectivamente.

**Tabela 3.** Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos EMB das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* em três linhagens tumorais na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.

AMOSTRAS	Linhagens Celulares (IC %)		
	NCI-H292 <sup>a</sup>	HEp-2	MCF-7
<i>P. mucronatum</i>	$35,98 \pm 0,80$	$93,66 \pm 0,24$	$37,27 \pm 1,79$
<i>P. microphyllum</i>	$28,27 \pm 6,65$	$93,18 \pm 0,25$	$40,26 \pm 0,71$
Doxorrubicina <sup>b</sup> (5 µg/mL)	$89,80 \pm 0,32$	$86,64 \pm 3,48$	$57,36 \pm 6,70$

<sup>a</sup>NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) e HEp-2 (carcinoma de laringe humana); <sup>b</sup> Doxorrubicina foi usado como controle positivo. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Diversos trabalhos relatam a atividade citotóxica das espécies do gênero *Phoradendron*. O extrato metanólico das folhas de *P. vernicosum* Greenm apresentou moderada atividade frente a linhagem celular de carcinoma de nasofaringe (KB) (CAAMAL-FUENTESA et al., 2011), o extrato etanólico das folhas de *P. serotinum* (Raf.) M. C. Johnst apresentou atividade citotóxica frente a células TC-1 (células epiteliais derivadas de câncer de pulmão murino) (ALONSO-CASTRO et al., 2012).

O extrato aquoso das folhas de *P. serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. exerceu efeitos tóxicos frente a célula MCF-7 (JACOBO-SALCEDO et al., 2011). Diferente do que foi observado para os EMB das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* esse efeito pode estar relacionado com a polaridade do extrato (aquoso) que possibilita a extração de constituintes mais ativos, ou ainda por se tratar de extratos brutos cujo sinergismo entre os compostos químicos pode modificar ou alterar sua ação.

Alcalóides e triterpenos são conhecidos por possuir propriedades anticancerígenas (GUPTA et al., 2005). Embora os extratos das espécies estudadas apresentem esses constituintes químicos, sua ação frente às linhagens NCI-H292 e MCF-7 não tem ação antineoplásica.

### Atividade Hemolítica

A fim de verificar se a atividade citotóxica está relacionada com o dano causado na membrana plasmática das células, extratos de plantas são testadas quanto à sua capacidade de induzir lise em eritrócitos de camundongos. Os resultados do ensaio hemolítico dos EMB das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* estão representados na tabela 4.

Considera-se um produto ativo aquele que apresenta  $CE_{50} < 200 \mu\text{g/ml}$  (COSTA-LOTUFO et al., 2005). De acordo com os dados obtidos os EMB das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* não apresentaram ação hemolítica. Desta forma, os resultados negativos obtidos neste modelo sugerem que a citotoxicidade dos extratos não está relacionados aos danos da membrana.

**Tabela 4.** Valores da concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ ) e o intervalo de confiança (IC 95%) dos EMB das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* referente a atividade hemolítica.

Variáveis	<i>Phoradendron mucronatum</i>	<i>Phoradendron Microphyllum</i>
$CE_{50}$	820,6	870,0
IC 95%	(636,6 – 1058)	(798,2 - 948,2)
Coefficiente de regressão	0,8857	0,9783

O  $CE_{50}$  e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos por meio de regressão não-linear.

A atividade biológica das plantas está associada a metabólitos secundários. Entre estes, existem as saponinas. Esta classe de compostos se dissolve em água dando origem a soluções afrógenas (espumantes), devido à sua ação tensoativa. Também são capazes de emulsionar óleos e produzir hemólise. Embora o mecanismo exato de lise das hemácias por saponinas ainda não seja claramente elucidado. A principal hipótese considera que as

saponinas interagem com membranas lipídicas de células e formam complexos insolúveis com o colesterol levando à formação de poros, permeabilização das células e da subsequente perda de hemoglobina no meio extracelular (GAUTHIER et al., 2009).

O screening fitoquímico dos EMB das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* não apresentou saponinas. Logo, sugere-se que a ausência em causar dano/lise nos eritrócitos pode está relacionado com essa classe de metabólito.

## Conclusão

O perfil fitoquímico dos extratos metanólicos de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* evidenciou: açúcares redutores, flavonóides, alcalóides, triterpenos/esteroides, monoterpênos, sesquiterpenos e diterpenos, proantocianidinas e leucoantocianidina.

O conteúdo fenólico total foi  $479,64 \pm 44,07$  e  $139,42 \pm 10,78$  mg EAT/g dos extratos de *P. mucronatum* e *P. microphyllum*, respectivamente. O extrato de *P. mucronatum* apresentou atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH.

Os extratos não provocaram hemólise nas condições testadas e apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem HEp-2. Não foi evidenciada atividade antimicrobiana frente às linhagens testadas, porem foi ativo contra o fungo *Candida albicans*.

Os resultados aqui apresentados mostram o potencial das espécies, sendo necessária a realização de outros estudos fitoquímicos, isolamento e identificação de compostos ativos, como também os possíveis mecanismos de ação pelos quais os extratos metanólicos de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* atuam.

## Referências

ALLEY, M. C.; SCUDIÈRE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, n.3, p. 589-601, 1988.

ALONSO-CASTRO, A. J.; JUÁREZ-VÁZQUEZ, M. del C.; DOMÍNGUEZ, F.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, I.; ESTRADA-CASTILLÓN, E.; LÓPEZ-TOLEDO, G.; CHÁVEZ, M.; CERBÓN, M. A.; GARCÍA-CARRANCA, A. The antitumoral effect of the American mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. (Viscaceae) is associated

with there lease of immunity-related cytokines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 857–864, 2012.

ALVES, T. M. A.; SLVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-73, 2000.

AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J .M.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems Communities**. v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.

BUTLER, M.; DAWSON, **Cell culture**. Oxford: Blackwell, 1992. 247 p.

CAAMAL-FUENTES, E.; TORRES-TAPIA, L. W.; SIMÁ-POLANCO, P.; PERAZA-SÁNCHEZ, S. R.; MOO-PUC, R. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms, **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, p. 719–724, 2011.

CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCAL, R. M.; NUNES, R. S. TRINDADE, R. C.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Isolamento, síntese e relação estrutura-atividade de compostos obtidos da *Phoradendron piperoides*. **Seminário de Pesquisa FAP-SE**, p. 1-3, 2003.

CORTEZ, D.A.G.; NETO, A.Q.; HÜBNER, D.V.; MELITO, I. Contribuição ao estudo fitoquímico do *Phoradendron latifolium* (SW) Griseb. (erva-de-passarinho). **Acta Amazônica**, v. 18, n. 1-2, p. 433-438, 1988.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231–1234, 2002.

DELAZAR, A.; TALISCHI, B.; NAZEMIYEH, H.; REZAZADEH, H.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 3, p. 286-290, 2006.

FOUCHE, G.; CRAGG, G. M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V. J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 455-461, 2008. FREI, B.; HEINRICHLH, M.; BORK, P. M.; HERRMANN, D.; JAKI, B.; KATO, T.; KUHN, M.; SCHMITT, J.; SCHUHLY, W.; VOLKEN, C.; STIEBER, O. Multiple screening of medicinal plants from Oaxaca, Mexico: ethnobotany and bioassays as a basis for phytochemical investigation. **Phytomedicine**, v. 5, n. 3, p. 177-186, 1998.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; GIRARD-LALANCETTE, K.; MSHVILDADZE, V.; PICHETTE, A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semisynthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2002-2008, 2009.

GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 329-333, 2000.

GRAHAM, J. G.; PENDLAND, S. L.; PRAUSE, J. L.; DANZINGER, L. H.; SCHUNKE VIGO, J.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N. R. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 528-535, 2003.

GUPTA, R.; GABRIELSEN, B.; FERGUSON, S. M. Nature's medicine: Traditional knowledge and intellectual property management. Case studies from the National Institutes of Health (NIH), USA. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 2, n. 4, p. 203-219, 2005.

HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**. 3 ed. London: Chapman & Hall, 1998. 228 p.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 89-143, 2003.

JACOBO-SALCEDO, M. R.; ALONSO-CASTRO, A. J.; SALAZAR-OLIVO, L.A.; CARRANZA-ALVAREZ, C.; GONZÁLEZ-ESPÍNDOLA, L. A.; DOMÍNGUEZ, F.; MACIEL-TORRES, S. A.; GARCÍA-LUJAN, C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M.D.R.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, M.; ESTRADA-CASTILLÓN, E.; ZAPATA-BUSTOS, R.; MEDELLIN-MILÁN, P.; GARCÍA-CARRANCA, A. Antimicrobial and Cytotoxic Effects of

Mexican Medicinal Plants, **Natural Product Communications**, v. 6, n. 12 p. 1925 – 1928, 2011.

JOHANSSON, S.; GULLBO, J.; LINDHOLM, P.; EK, B.; THUNBERG, E.; SAMUELSSON, G.; LARSSON, R.; BOHLIN, L.; CLAESON, P.; Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly, selective cytotoxicity to human breast cancer cells. **Journal Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 1, p. 165-175, 2003.

KASHIWADA, Y.; WANG, H.K.; NAGAO, T.; KITANAKA, S.; YASUDA, I.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; COSENTINO, L.M.; KOZUKA, M.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C.Q.; YEH, E.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal Natural Products**, v. 61, n. 9, p. 1090-1095, 1998.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 1ed. São Paulo: BASF, 1995. Tomo III. 62 p.

MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. A.; CABRAL, D. L. V.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v.15, p. 8534-8542, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.,; MONTEIRO, J .M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. Brazilian **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

RIOS, M. Y.; SALINAS, D.; VILLARREAL, M. L. Cytotoxic Activity of Moronic Acid and Identification of the New Triterpene 3,4-seco-Olean-18-ene-3,28-dioic Acid from *Phoradendron reichenbachianum*. **Planta Medica**, v. 67, n. 5, p. 443-446, 2001.

RIVERO-CRUZ, I.; ACEVEDO, L.; GUERRERO, J. A.; MARTINEZ, S.; BYE, R.; PEREDA-MIRANDA, R.; FRANZBLAU, S.; TIMMERMANN, B. N.; MATA, R. Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 9, p. 1117-1126, 2005.

RODRIGUES, O. G.; LIMA, E. Q.; SOUSA, M. R. Q.; MEDEIROS, P. L.; NASCIMENTO, S. C. Caracterização morfológica e cinética de crescimento das células de carcinoma epidermóide de laringe humano - HEp2. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 43-50, 2009.

SARAIVA, A. M.; CASTRO, R. H. A.; CORDEIRO, R. P.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; CASTRO, V. T. N. A.; AMORIM, E. L. C.; XAVIER, H. S.; PISCIOTTANO, M. N. C. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1724-1731, 2011.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BREÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

VARELA, B. G.; FERNÁNDEZ, T.; RICCO, R. A.; ZOLEZZI, P. C.; HAJOS, S. E.; GURNI, A. A.; ALVAREZ, E.; WAGNER, M. L. *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 109–116, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Berlin: Springer Verlag, 1996. 384 p.

**Capítulo 3** – Avaliação da toxicidade aguda, anti-inflamatória e cicatrizante do extrato das folhas de duas espécies do gênero *Phoradendron*

Bastos, I.V.G.A.<sup>1</sup>; Oliveira, T.B.<sup>1</sup>; Barbosa, J.A.P.<sup>1</sup>; Neto-Jr, J.C.S.<sup>2</sup>; Neves, W.W.<sup>3</sup>; Silva T. G.<sup>1</sup>; Melo, S.J.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> – Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); <sup>2</sup> – Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); <sup>3</sup> – Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi estimar a toxicidade aguda, avaliar a atividade anti-inflamatória e o efeito do tratamento tópico do extrato metanólico bruto (EMB) das folhas de *Phoradendron mucronatum* e *Phoradendron microphyllum*. Para determinar a toxicidade foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), nos quais foram administrados uma dose de 2.000 mg/kg por via oral. A atividade anti-inflamatória foi analisada pelos métodos de bolsão de ar subcutâneo e permeabilidade vascular induzida por ácido acético. O processo de cicatrização de feridas no tecido cutâneo foi realizado em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) por uma aplicação tópica dos cremes a base dos extratos. No ensaio de toxicidade aguda, os animais apresentaram algumas reações, porém não letais na dose administrada. Os extratos reduziram a migração celular assim como inibiram o aumento da permeabilidade vascular em camundongos com o tratamento por via oral. O creme contendo os extratos das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* mostrou efeito cicatrizante, reduzindo a área de contração da ferida. Conclui-se que sob condições aguda de exposição, os EMB das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* apresentaram indícios de toxicidade na dose de 2.000 mg/kg, apresentaram atividade anti-inflamatória aguda diante dos modelos experimentais utilizados assim como teve um efeito significativo na cura de feridas cutâneas sobre a pele de ratos.

**Palavras – chave:** toxicidade, anti-inflamatória, cicatrização, *P. microphyllum*, *P. mucronatum*

## Introdução

A busca por alívio e cura de doenças através dos vegetais, foi uma das primeiras formas de uso dos produtos naturais, que contribuem de forma significativa na divulgação das propriedades terapêuticas (BUTLER, 2008; KINGSTON, 2011).

Os efeitos medicinais das plantas sobre os processos doloroso, anti-inflamatório e cicatrizante, são relevantes, porém, a comprovação científica ainda é incipiente. Desta forma, se faz necessário que novos estudos continuem sendo realizados no sentido de buscar medicamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

O gênero *Phoradendron* apresenta indicação popular para tratar dor de cabeça, cólica renal, fraturas e como anti-inflamatório (STEIN et al., 1998). Várias espécies deste gênero possuem em geral atividade antitumoral (BRAUN et al., 2002, ENDO et al., 1989, JOHANSON et al., 2003, RIOS et al., 2001, JACOBO-SALCEDO et al., 2011). Na medicina popular brasileira, algumas espécies desse gênero são utilizadas em desordens gastrointestinais, reumatismo, analgésico, gripe e como vermífugo (AGRA et al., 2007; DIAS et al., 2007).

Diversas plantas deste gênero têm sido estudadas tanto do ponto de vista fitoquímico quanto farmacológico. A análise fitoquímica de *Phoradendron liga* mostrou que esta espécie produz C-glicosilflavonas e 3-desoxiproantocianidina (VARELA et al., 2004). *Phoradendron classifolium* exerce atividade citoprotetora comparável à atropina e *P. latifolium* causa contração no ducto deferente de cobaios (QUEIROZ-NETO; MELITO, 1990; GONZALES et al., 2000). Atividade antitumoral foi detectada para *P. liga* e *P. tomentosum*, anti-HIV para *P. juniperinum* e miorelaxante e antiespasmódico para *Phoradendron piperoides* (KASHIWADA et al., 1998; LI et al., 2002; JOHANSSON et al., 2003; DIAS et al., 2007).

Considerando a variedade de atividades biológicas estudadas sobre o gênero *Phoradendron*, o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade aguda, a atividade anti-inflamatória e cicatrizante do extrato metanólico das folhas de *Phoradendron mucronatum* e *Phoradendron microphyllum*.

## Materiais e Métodos

### Coleta do material botânico

A espécie *P. mucronatum* foi coletada no município de Buíque – Pernambuco (08°37'23''S 37°09'21'' W) em julho de 2012. *P. microphyllum* foi coletada em março de

2012 na Fazenda Canto dos Pássaros no município de São José dos Espinharas – Paraíba (06°52'56''S e 37°17'12'' W). Um exemplar de cada espécie foi depositado e identificado pelas curadoras Rita Pereira e Olivia Cano do Herbário Dárdano de Andrade Lima, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob números de registros 63330 e 87746, respectivamente.

### **Preparo dos extratos**

As amostras (folhas) de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* foram estabilizadas em estufa durante 3 dias a  $45^{\circ} \pm 5^{\circ}$  C, pulverizadas em moinho de facas (795 g e 135 g, respectivamente) e em seguida foram submetidas à maceração exaustiva, a frio, em metanol PA (Merck) a temperatura ambiente e protegido da luz. As extrações foram realizadas em intervalos de 5 dias entre cada extração. Foram feitas 3 (três) extrações, até o completo esgotamento do material vegetal. A solução extrativa filtrada foi submetida à destilação do solvente em evaporador rotatório (TE 120, Tecnal®, Brasil) sob pressão reduzida a uma temperatura média de 40 °C.

### **Animais**

Camundongos albinos swiss machos (25-35 g/ 60 dias) e ratos wistar machos (200-250 g/ 90 dias) foram obtidos do Biotério de Antibióticos e Farmácia, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno à temperatura de  $22 \pm 3$  °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração balanceada e água à vontade. Os animais foram submetidos a jejum de 4 horas antes da realização da toxicidade aguda e anti-inflamatória. O protocolo de experimentação foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (n° 23076.056734/2012-15).

### **Toxicidade Aguda**

Para a avaliação deste ensaio foi empregado o Guia da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)-423/2001 “Toxicidade Aguda de Classe” (OECD, 2001), que determina as doses a serem utilizadas no estudo e o número de animais por dose (três animais). A dose selecionada foi de 2.000 mg/kg por via oral dos extratos metanólicos

brutos (EMB) das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum*. Essa dose foi testada duas vezes e, finalmente, foi estimada a categoria toxicológica, segundo as especificações do Guia. O extrato foi diluído em solução salina (veículo) e administrado aos animais por gavagem. Administrou-se o veículo (controle - 1 mL/100 g de peso vivo) pela mesma via. Os animais foram avaliados aos 30 minutos, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h e, a partir de então, diariamente, até o 14º dia após os tratamentos. Foram avaliados os seguintes sinais seguindo o *screening* hipocrático: atividade geral, estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso e morte (MALONE & ROBICHAUD, 1962; MALONE, 1977). Os animais foram pesados diariamente, durante os 14 dias de tratamento, para avaliar a variação do peso corpóreo. Foi determinado também o consumo de água e ração. Ao final do experimento, todos os animais foram pesados e sacrificados.

Para análise histopatológica, foram obtidos fragmentos do fígado, rim e baço que depois de fixados em formol a 10% por 24 horas, foram mantidas em álcool etílico (70%), até a inclusão em parafina por meio da metodologia convencional. Cortes de 5 µm de espessura foram colhidos em lâminas sinalizadas, coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e então observados ao microscópio de luz.

### **Atividade Anti-inflamatória**

#### **Bolsão de ar subcutâneo**

A atividade anti-inflamatória dos extratos metanólico de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* foi avaliada pela formação de uma bolsa de ar na região dorsal de camundongos pela injeção subcutânea de 2,5 mL de ar estéril coletado de fluxo laminar no dia 0, seguida pela segunda injeção de 2,5 mL de ar estéril coletado de fluxo laminar três dias depois. No sexto dia, os animais receberam via oral os extratos brutos (100, 200 e 400 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo. As doses foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos na toxicidade aguda. Uma hora após a administração oral, a inflamação foi induzida pela injeção de 1 mL de um solução de carragenina (1% em solução salina) dentro do bolsão de ar. Após 6 h, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, as bolsas foram lavadas com 3 mL de PBS contendo 3 µMol de EDTA. Com o auxílio de uma pipeta o lavado foi coletado, através de uma incisão na bolsa. A contagem de leucócitos polimorfunucleares foi realizada em contador hematológico ABX Micros 60 (GUERRA et al., 2011).

### **Permeabilidade vascular induzida por ácido acético**

Os efeitos dos extratos no aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético foram determinados de acordo com o método descrito por Whittle et al. (1964). Os camundongos receberam via oral os extratos brutos (100, 200 e 400 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo. Trinta minutos após, os animais receberam no plexo-orbital 0,2 mL de solução de Evans blue a 1% (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Dez minutos após a injeção do corante, 0,5 mL de ácido acético a 1% foi injetada por via intraperitoneal. Após trinta minutos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de solução salina. Os exsudatos foram centrifugados e os sobrenadantes foram distribuídos em microplaca de 96 poços em triplicata. As absorbâncias foram medidas a 630 nm e a concentração de Evans blue extravasada para a cavidade peritoneal foi determinada usando uma curva padrão.

### **Atividade Cicatrizante**

Esse ensaio foi realizado para avaliar o efeito dos extratos em lesões de pele. Os animais (ratos) após o período de adaptação foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas individuais e divididos em 4 grupos: Controle negativo (CN) - tratado com o creme base (Polowax); Controle positivo (CP) – tratado com Dexpanthenol 50 mg/g; Teste 1 (T1) – EMB das folhas 5%, tratados topicamente com creme do extrato de *P. mucronatum* na concentração de 50 mg/g; Teste 2 (T2) – EMB das folhas 5%, tratados topicamente com creme do extrato de *P. microphyllum*, na concentração de 50 mg/g. Os grupos por sua vez foram divididos em 4 subgrupos de acordo com o período de observação (4 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias) com n=5. Para todos os procedimentos cirúrgicos, foi administrada anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de quetamina (60 mg/kg), por via intramuscular. Após a contenção dos animais em decúbito ventral, realizou-se a tricotomia da região dorsolombar e antissepsia com solução de Diglucolato de clorexidrina 2%, seguida de demarcação e excisão da área da ferida, com punch de biópsia estéril de doze milímetros com lâmina cortante na borda, que se estendeu até a fáscia muscular. A hemostasia foi realizada por compressão digital, utilizando gaze estéril. Os tratamentos foram aplicados imediatamente após o procedimento cirúrgico com auxílio de hastes plásticas estéreis.

As feridas foram tratadas diariamente, uma vez ao dia, durante 21 dias. Após anestesia e contenção dos animais, foi realizado debridamento das áreas lesionadas e assepsia com

solução fisiológica a 0,9% e gazes estéreis, para que as áreas das feridas fossem registradas fotograficamente e medidas com auxílio do paquímetro digital (LEETOOLS-684132®), nos dias 0, 3, 7, 14, e 21 pós-cirúrgico. Em seguida, excisões abrangendo a área da lesão e a pele íntegra, de dois milímetros, foram realizadas em cada grupo, a cada dia de análise, e encaminhadas para análise histopatológica.

### **Formulação do creme Polowax e dos cremes com os extratos**

Inicialmente, os componentes da fase 1 (110 g de álcool cetosteárico; 28 de álcool cetosteárico etoxilado e 70 g de vaselina líquida) foram aquecidos sem atingir o ponto de fervura. Em seguida, dissolveu-se 1,5 g de nipagim (metilparabeno); 0,5 g de nipazol, 30 g de propilenoglicol - em 760 mL de água destilada (Fase 2). A fase 2 foi acrescentada na fase 1 sob agitação mecânica. O processo foi finalizado após formação de um creme homogêneo a temperatura de 40° C.

Os cremes do EMB das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* a 5% foram produzidos diluindo-se os extratos em água, e a este foi incorporado o creme Polowax, aos poucos, através de uma homogeneização sincronizada, a fim de se obter a concentração final de 50mg/g. Essas formulações foram realizadas pela Fiel Farma Manipulação.

### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  D.P. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA – one way), seguida pelo teste de Bonferroni (anti-inflamatório) e teste *t* de Student (toxicidade e cicatrizante). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 e \*\*\*\**p* < 0.0001. As análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0.

### **Resultados e Discussão**

#### **Toxicidade Aguda**

Todo produto natural usado na terapêutica deveria ser submetido a testes rigorosos de eficácia e segurança. Por motivos éticos, morais e legais, a obtenção de dados toxicológicos

em seres humanos é bastante limitada. Com isso, as informações toxicológicas sobre compostos químicos são obtidas basicamente a partir de testes toxicológicos pré-clínicos, ou seja, com animais de laboratórios em condições previamente padronizadas (MORTON, 1998; BOELSTERLI, 2003).

Durante avaliação comportamental, os animais apresentaram reações semelhantes, das quais nos primeiros 30 minutos houve prevalência de agitação, tremores finos, resposta ao toque, movimentos estereotipados e circulares, caracterizando reações excitatórias e estimulantes. Após esse período, foram observadas também reações depressoras, tais como: abaixamento do trem posterior e estiramento. Além dessas, também foram evidenciados piloereção, diurese e excreção fecal.

Não foram observadas mortes dos animais na dose de 2.000 mg/kg no período de 14 dias. Com os resultados obtidos observa-se que os extratos são enquadrados na categoria 5, pois a estimativa da DL<sub>50</sub> foi superior a 2.000 mg/kg, sendo considerado de baixa toxicidade segundo os critérios do protocolo experimental adotado pelo Guia OECD 423 (OECD, 2001). A dose seguinte a ser testada seria a de 5.000 mg/kg; no entanto, o estudo dessa dosagem somente é recomendado em casos excepcionais que justifiquem a sua necessidade. Afinal, alterações em doses muito elevadas poderiam ocorrer por descompensação do organismo avaliado e não necessariamente por uma ação tóxica específica.

Foram avaliados também o consumo de água, ração e peso corporal (Tabela1). Todos os grupos (controle e tratados) apresentaram ganho de peso, ao final do período analisado. O consumo de ração foi menor para os grupos tratados com os extratos quando comparados ao grupo controle. Ainda assim, o ganho de peso obtido foi semelhante ao grupo controle, evidenciando a não influência dos extratos nesse parâmetro.

**Tabela 1.** Efeito dos extratos metanólicos das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* sobre parâmetros fisiológicos de camundongos Swiss (n=6 animais/grupo).

Grupos	Dose/v.o mg/kg	Nº Animais	Nº Mortes	Cosumo Ração (g/dia)	Consumo Água (mL/dia)	Peso corporal (g) Inicial	Final
Controle <i>P.</i> <i>mucronatum</i>	2000	6	-	29,12±3,8	37,5±1,8	35,3±3,5	40,5±2,9
<i>P.</i> <i>microphyllum</i>	2000	6	-	24,74±0,8**	38,0±1,3	43,8±1,3****	44,7±1,1**
	2000	6	-	14,75±1,8****	33,5±0,8**	35,3±3,5	36,2±2,6**

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão e a diferença entre os grupos foram determinados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste t de Student. \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,0001

A análise macroscópica dos órgãos, não evidenciou alterações quanto ao aspecto e coloração.

Na análise histológica do fígado (Figura 1), foram identificados em ambos os extratos, vacuolizações citoplasmáticas dos hepatócitos e sinusóides preservados. Atividade mitótica dos hepatócitos foi verificada no grupo tratado com o EMB das folhas de *P. mucronatum*. Enquanto que o grupo controle apresentou veia centrolobular, hepatócitos e capilares sinusóides preservados. As alterações evidenciadas nos grupos tratados são indicativas de hepatotoxicidade aguda.

Na análise histológica do rim (Figura 2) foi observado para o grupo tratado com EMB das folhas de *P. mucronatum* a presença de glomérulos renais e vaso sanguíneo congestionado de sangue como também infiltrado linfocitário permeando os túbulos coletores na região medular. No grupo tratado com EMB das folhas de *P. microphyllum* não foram encontradas alterações nos espaços subcapsulares e túbulos coletores. O grupo controle apresentou glomérulos renais na cortical com espaços subcapsulares preservados e túbulos coletores sem alterações na região medular. Mediante resultado histológico do rim para os grupos tratados, foi observado alterações a nível renal mais proeminente no *P. mucronatum*.

A análise histológica do baço (Figura 3) os grupos tratados com EMB das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum*, identificou nódulos linfáticos centralizados, migrando para a periferia. O grupo controle apresentou nódulos linfáticos preservados na periferia e de forma agrupada no interior do órgão.

Espécies do gênero *Phoradendron* são conhecidas por sua alta toxicidade. Atribui os efeitos à presença de proteínas e lectinas tóxicas como as encontradas em *Phoradendron flavescens* Nutt. produzindo distúrbios gastrointestinais, sonolência leve, irritação nos olhos e ataxia, *Phoradendron seratinum*, e *Phoradendron tomentosum* produzem distúrbios gastrointestinais leves, mas no Sistema Nervoso Central (SNC) pode provocar tremores e alucinações (SPILLER et al., 1996, CALZADO-FLORES et al., 2002; COURTEMANCHE; PETERSON, 2006).

### **Atividade anti-inflamatória**

O pré-tratamento dos EMB das folhas de *Phoradendron* demonstraram significativa redução na migração celular com o tratamento por via oral (Tabela 2).

O EMB das folhas de *P. microphyllum* reduziu em todas as doses a migração celular para o local da inflamação quando comparados ao grupo controle, porém foi observado que

com o aumento da dose ocorreu uma redução na eficiência do extrato. As doses de 100 e 200 mg/kg não foram estatisticamente diferentes entre si, mas somente a dose de 100 mg/kg apresentou inibição semelhante a indometacina. O EMB das folhas de *P. mucronatum* reduziu a migração de polimorfonucleares para o bolsão de ar quando comparado ao grupo controle. A dose de 200 mg/kg apresentou maior inibição na migração celular.

O reconhecimento do importante papel dos leucócitos nos processos inflamatórios agudos e crônicos tem sido atribuída a modelos animais de inflamação aguda que permitam a quantificação estimativa da migração desses leucócitos. Esses modelos envolvendo cavidades como a pleural, a peritoneal, e também o bolsão de ar permitem que a migração celular, mediadores inflamatórios e extravasamento plasmático sejam quantitativamente mensurados após um processo inflamatório agudo, induzido por diferentes agentes irritantes aplicados no interior da cavidade (SEDGWICK; LEES, 1986).

O modelo de inflamação de bolsa de ar induzido por carragenina é caracterizado pela elevação da permeabilidade vascular com produção de mediadores inflamatórios incluindo prostaglandinas além do influxo de leucócitos polimorfonucleares no exsudato (JAIN; PARMAR, 2001).

**Tabela 2.** Efeito dos extratos metanólicos das folhas de *Phoradendron mucronatum* e *Phoradendron microphyllum* sobre a migração celular para o bolsão de ar.

Grupos	Dose (mg/kg)	Migração celular ( $10^3 / \text{mm}^3$ )	Inibição %
Controle	-	13,3 ± 1,31	-
<i>P. microphyllum</i>	100	4,0 ± 0,57 ****#	70
	200	5,5 ± 0,74****	59
	400	7,2 ± 0,68****	46
<i>P. mucronatum</i>	100	5,5 ± 0,59****	59
	200	4,9 ± 0,44****	63
	400	8,3 ± 0,4****	37
Indometacina	10	2,9 ± 0,54****	78

Dados representam média ± DP (N=5); \*\*\*\*P < 0,0001 Vs. Controle. # - não significativo vs. indometacina. ANOVA, teste de Bonferroni.

O teste de permeabilidade vascular se baseia na quantificação do aumento da permeabilidade induzida pelo ácido acético, medindo-se o extravasamento do corante azul de Evans a partir do compartimento vascular para dentro da cavidade peritoneal (ROCHA, 2010).

O EMB das folhas de *P. microphyllum* reduziu a permeabilidade vascular nas doses de 200 e 400 mg/kg quando comparados ao grupo controle. Essas doses não foram estatisticamente diferentes entre si, e ambas apresentaram inibição semelhante a indometacina. O EMB das folhas de *P. mucronatum* reduziu a permeabilidade vascular apenas na dose de 100 mg/kg quando comparados ao grupo controle. Foi observado que as doses de 200 e 400 mg/kg do extrato de *P. mucronatum* aumentaram a permeabilidade vascular (Tabela 3).

O aumento da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético é conhecido por induzir uma inflamação exsudativa estimulada pelo aumento de mediadores químicos tais como a prostaglandina E2 (PGE2), a histamina e serotonina no fluido peritoneal (CHOI et al., 2006). Esse aumento da permeabilidade permite o extravasamento de mediadores inflamatórios para os tecidos, com consequente estimulação e sensibilização dos nociceptores de terminais nervosos, além de acarretar o escape de proteínas do plasma para o líquido intersticial, desencadeando a formação do edema característicos dos processos inflamatórios (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

**Tabela 3.** Efeito dos extratos metanólicos das folhas de *Phoradendron mucronatum* e *Phoradendron microphyllum* sobre a permeabilidade vascular.

Grupos	Dose (mg/kg)	Permeabilidade vascular ( $\mu\text{g/mL}$ )
Controle	-	223 $\pm$ 12,26
<i>P. microphyllum</i>	100	235 $\pm$ 21,21
	200	159 $\pm$ 25,77**#
	400	113 $\pm$ 12,82***#
<i>P. mucronatum</i>	100	151 $\pm$ 16,04***#
	200	251 $\pm$ 26,63
	400	422 $\pm$ 45,27***
Indometacina	10	121 $\pm$ 9,97***

Dados representam média  $\pm$  DP (N=5); \*\*\* $P < 0,01$  \*\* $P < 0,001$  Vs. Controle. # - não significativo vs. indometacina. ANOVA, teste de Bonferroni.

Os EMB das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* reduziu a migração celular assim como inibiu o aumento da permeabilidade vascular em camundongos o que sugere um efeito anti-inflamatório agudo.

A triagem fitoquímica preliminar dos EMB das folhas dessas espécies vegetais revelou a presença de alcalóides, flavonóides, triterpenos. A ação desses metabólitos secundários deve estar relacionada com os possíveis efeitos anti-inflamatórios observados no presente estudo.

## Atividade Cicatrizante

A recuperação da arquitetura e da funcionalidade do tecido lesionado envolve a sobreposição de processos complexos, tais como inflamação, contração da ferida, angiogênese, deposição de matriz e remodelação tecidual. Todos estes eventos são integrados e ocorrem durante as fases inflamatória, proliferativa e de remodelação no processo de cicatrização de feridas (VELNAR et al., 2009).

As feridas foram avaliadas macroscopicamente em relação ao percentual da área de contração. A figura 4 ilustra a comparação do percentual de contração das feridas nos dias 3, 7, 14 e 21 dias após os diferentes tratamentos (CP, CN, T1 e T2). Os dados indicam que nos três primeiros dias não houve diferença estatística significativa entre os grupos CP, T1 e T2 e nem entre o CN. No sétimo dia, o grupo T1 destaca-se quando comparado aos demais grupos apresentando diferenças estatisticamente significativas. Os percentuais de contração das feridas foram  $55,43 \pm 2,322$ ;  $43,79 \pm 4,275$  ( $p < 0,001$ );  $43,43 \pm 3,132$  ( $p < 0,001$ );  $35,96 \pm 3,932$  ( $p < 0,0001$ ) para T1, T2, CP e CN, respectivamente. Os percentuais de contração no 14º e no 21º dia pós-tratamento, para os grupos T1, T2, CP e CN foram respectivamente ( $69,46 \pm 5,556$ ;  $64,09 \pm 3,31$ ;  $64,806 \pm 5,6665$ ;  $66,386 \pm 2,8899$ ) e ( $77,9 \pm 6,458$ ;  $75,37 \pm 5,63$ ;  $76,393 \pm 5,4125$ ;  $71,1 \pm 5,559$ ). Esses valores se apresentaram maiores quando comparados com os de sete dias, no entanto a área de contração foi semelhante entre si. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos T1, T2, CP e CN.

A diminuição da área lesionada ocorre por mecanismo de contração e movimento centrípeto dos limites da ferida em direção ao centro, com o intuito de diminuir a área a ser recoberta pelo epitélio em proliferação, caracterizando a cicatrização por segunda intenção (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). Em todos os grupos e nos diferentes períodos de análise foi observado esse mecanismo de contração que se tornou mais evidente no 7º dia.

Os resultados da análise histológica observou que no 3º dia pós-operatório, o processo inflamatório agudo foi intenso em todos os grupos, caracterizado pela presença de células mononucleares (predominante) e polimorfonucleares (Figura 5). Nenhum dos grupos apresentou feridas repitelizadas, houve moderada formação do tecido de granulação e todos os grupos apresentaram pouca quantidade de fibroblastos.

Os grupos T1 e T2 apresentaram reação inflamatória semelhante ao grupo CP que utilizou dexpanthenol, um medicamento útil para prevenir e tratar doenças da pele e das mucosas. Faz desaparecer as irritações e favorece a cicatrização de feridas. A resposta inicial dos tecidos é denominada inflamação aguda ou reação inflamatória aguda. O exsudato

inflamatório agudo é constituído de muitos neutrófilos, poucos macrófagos e alguns linfócitos, sendo uma resposta relativamente inespecífica, e suas funções mais importantes são eliminar os tecidos mortos, proteger contra infecção local e permitir o acesso do sistema imune à área danificada (BUCH et al., 2008).

A partir do 7º dia, a diferença entre os grupos apresenta-se de forma discreta, sendo que todos os grupos já apresentam inflamação crônica, ou seja, predominância de células mononucleares. As feridas apresentaram repitelização de forma descontínua (Figura 6), acentuada formação do tecido de granulação em todos os grupos (Figura 7) e grande quantidade de fibroblasto nos grupos T1, T2 e CP, exceto o CN.

No 14º e 21º dia, houve ausência de reação inflamatória. Rепitelização quase que completa no 14º dia e completa no 21º dia. Não foram observadas diferenças entre os grupos T1, T2 e o CP. O tecido de granulação foi reduzido gradativamente entre os dias 14 e 21 e a quantidade de fibroblastos foram intensa no 14º dia para os T1, T2 e CP e moderado para o grupo controle (Figura 8).

O extrato metanólico das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* revelou a presença de taninos, flavonóides e alcalóides na triagem fitoquímica preliminar. Os taninos auxiliam o processo de cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacárido) sobre a pele ou mucosa lesionada. Por baixo desta camada o processo natural curativo de feridas pode, então, ocorrer (MELLO; SANTOS, 2001). Um processo similar ocorre provavelmente em casos de úlcera gástrica, onde o complexo tanino/ proteína protege a mucosa do estômago (HASLAM, 1996).

A ação dos cremes do EMB 5% das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* no processo de cicatrização pode ser explicada pela sua composição rica em compostos fenólicos, que são substâncias com atividades farmacológicas em plantas e que são utilizadas para melhorar a eficácia do processo de cicatrização em feridas e úlceras. Agem como antioxidantes, combatendo os radicais livres, possuem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune (VIEIRA et al., 2008).

## Conclusões

Embora os extratos metanólicos das folhas de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* não tenham ocasionado óbito dos animais por via oral, sendo classificada na categoria 5

(toxicidade letal aguda maior que 2.000 mg/kg), conforme preconiza a OECD 423, foi observado indícios de toxicidade aguda nas análises histopatológicas do fígado e rim.

Os resultados encontrados sugerem que os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória aguda diante dos modelos de bolsão de ar subcutâneo e permeabilidade vascular induzida por ácido acético. Além de demonstrar efeitos cicatrizantes no tratamento tópico de lesões na pele.

No entanto, serão necessários estudos complementares sobre tais atividades para garantir sua ação biológica e o estabelecimento da sua eficácia terapêutica sem o acometimento de efeitos colaterais.

## Referências

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASILIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p. 383-395, 2007.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 267-284, 2009.

BOELSTERLI, U. A. Animal models of human disease in drug safety assessment. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 109-121, 2003.

BRAUN, J. M.; KO, H. L.; SCHIERHOLZ, J. M.; BEUTH, J. Standardized mistletoe extract augments immune response and down-regulates local and metastatic tumor growth in murine models. **Anticancer Research**, v. 22, p. 4187-4190, 2002.

BUCH, D. R.; ARANTES, A. B.; CAMPELO, P. M. S. Verificação da atividade cicatrizante do exsudato de folhas de *Jatropha multifida* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 142-145, 2008.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: Natural product – derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CALZADO-FLORES, C.; HURTADO-RAMIREZ, M. B.; FLORES-VILLANUEVA, Z.; VERDE-STAR, M. J.; SEGURA-LUNA, J. J.; LOZANO-GARZA, G.; AGUILAR-

CUESTAS, G. Preliminary chronic toxicological study of aqueous extract of *Phoradendron tomentosum*. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 45, p. 162-163, 2002.

CHOI, J. H.; JUNG, B. H.; KANG, O. H.; CHOI, H. J.; PARQUES, P. S.; CHO, S.H.; KIM, Y. C.; SOHN, D. H.; PARQUE, H.; LEE, J. H.; KWON, D. Y. The Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of Ethyl Acetate Fraction of *Cynanchi Paniculati* Radix. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 5, p. 971-975, 2006.

COURTEMANCHE, J.; PETERSON, R.G. Beware the mistletoe. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, p. 1523-1524, 2006.

DIAS, K. S.; ALMEIDA, D. S.; SILVA, A. B. L.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A. C.; SANTOS, T. C.; MELLO, I. C. M.; CARVALHO, A. C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; MARÇAL, R. M. Avaliação dos efeitos miorelaxante, antiespasmódico e antinociceptivo do extrato aquoso da *Phoradendron piperoides* (Kunt.) Trel. (Viscaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 373-377, 2007.

ENDO, Y.; OKA, T.; TSURUGI, K.; FRANZ, H. The mechanism of action of the cytotoxic lectin from *Phoradendron californicum*: the RNA N-glycosidase activity of the protein. **FEBS Letters**, v. 248, p.115-118, 1989.

GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 329–333, 2000.

GUERRA, A. S. H. S.; MALTA, D. J.; LARANJEIRA, L. P.; MAIA, B. M.; COLAÇO, N. C.; LIMA, M. C.; SILVA, T. G. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1816-22. 2011.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Product**, v. 59, n. 2, p. 205-15, 1996.

JACOBO-SALCEDO, M. R.; ALONSO-CASTRO, A. J.; SALAZAR-OLIVO, L.A.; CARRANZA-ALVAREZ, C.; GONZÁLEZ-ESPÍNDOLA, L. A.; DOMÍNGUEZ, F.; MACIEL-TORRES, S. A.; GARCÍA-LUJAN, C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M.D.R.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, M.; ESTRADA-CASTILLÓN, E.; ZAPATA-BUSTOS, R.; MEDELLIN-MILÁN, P.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. Antimicrobial and Cytotoxic Effects of

Mexican Medicinal Plants, **Natural Product Communications**, v. 6, n. 12 p. 1925 – 1928, 2011

JAIN, M.; PARMAR, H. S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. **Inflammation Research**, v. 60, p. 483–491, 2011.

JOHANSSON, S.; GULLBO, J.; LINDHOLM, P.; EK, B.; THUNBERG, E.; SAMUELSSON, G.; LARSSON, R.; BOHLIN, L.; CLAESON, P.; Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly, selective cytotoxicity to human breast cancer cells. **Journal Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 1, p. 165-175, 2003.

KASHIWADA, Y.; WANG, H.K.; NAGAO, T.; KITANAKA, S.; YASUDA, I.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; COSENTINO, L.M.; KOZUKA, M.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C.Q.; YEH, E.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal Natural Products**, v. 61, n. 9, p. 1090-1095, 1998.

KINGSTON, D.G. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 456-511, 2011.

LI, S. S.; GULLBO, J.; LINDHOLM, P.; LARSSON, R.; THUNBERG, E.; SAMUELSSON, G.; BOHLIN, L.; CLAESON, P. Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turnhelix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. **Biochemical Journal**, v. 366, p. 405-413, 2002.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: WAGNER H.; WOLF P. **Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**, Berlin: Springer-Verlag, p. 23-53, 1977.

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

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Taninos**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento; SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P. Porto Alegre: UFSC; 3ª ed., p. 527-554, 2001.

MORTON, D. M. Importance of species selection in drugtoxicity testing. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 545-550, 1998.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2011.

OLIVEIRA-JÚNIOR, M. X. **Caracterização dos frutos do maracujazeiro-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.) e superação de dormência de sementes**. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia.

QUEIROZ-NETO, A.; MELITO, I. Changes in sensitivity of the isolated guinea-pig vas deferens induced by a lyophilized *Phoradendron latifolium* leaf infusion. **Journal Ethnopharmacology**, v. 28, p. 183-189, 1990.

RIOS, M. Y.; SALINAS, D.; VILLARREAL, M. L. Cytotoxic Activity of Moronic Acid and Identification of the New Triterpene 3,4-seco-Olean-18-ene-3,28-dioic Acid from *Phoradendron reichenbachianum*. **Planta Medica**, v. 67, n. 5, p. 443-446, 2001.

ROCHA, M. L. **Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do monoterpeno  $\alpha$ ,  $\beta$ -epoxi-carvona e seu efeito sobre a neurotransmissão glutamatergica**. Tese de doutorado. 2010. 111 f. – Universidade federal da Paraíba. João Pessoa.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions**, 18, n. 3-4, 439-46, 1986.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanism of the inflammation response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SPILLER, H. A.; WILLIAS, D.B.; GORMAN, S.E.; SANFTLEBAN, J. Retrospective study of mistletoe ingestion. **Journal of Toxicology-Clinical Toxicology**, v. 34, p. 405-408. (1996).

STEIN, G.M.; SCHIETZEL, M.; BUSSING, A. Mistletoe in immunology and the clinic (short review). **Anticancer Research**, v. 18, p. 3247-3249, 1998.

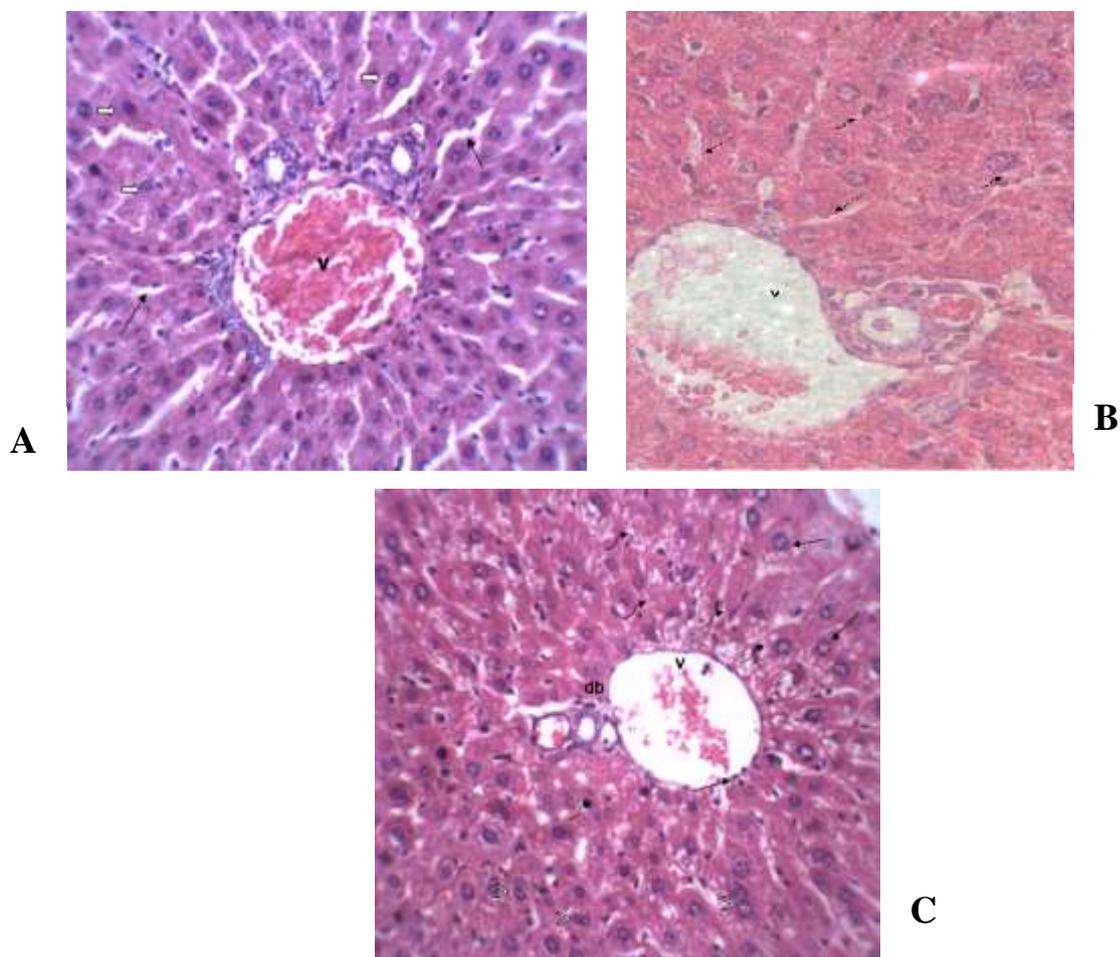
VARELA, B. G.; FERNÁNDEZ, T.; RICCO, R. A.; ZOLEZZI, P. C.; HAJOS, S. E.; GURNI, A. A.; ALVAREZ, E.; WAGNER, M. L. *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 109–116, 2004.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, p. 1528-1542, 2009.

VIEIRA, A. P.; SANTOS, N.R.; BORGES, J.H.S.; VINCENZI, M.P.A.; SCHMITZ, W.O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n.1, p. 65-74. 2008.

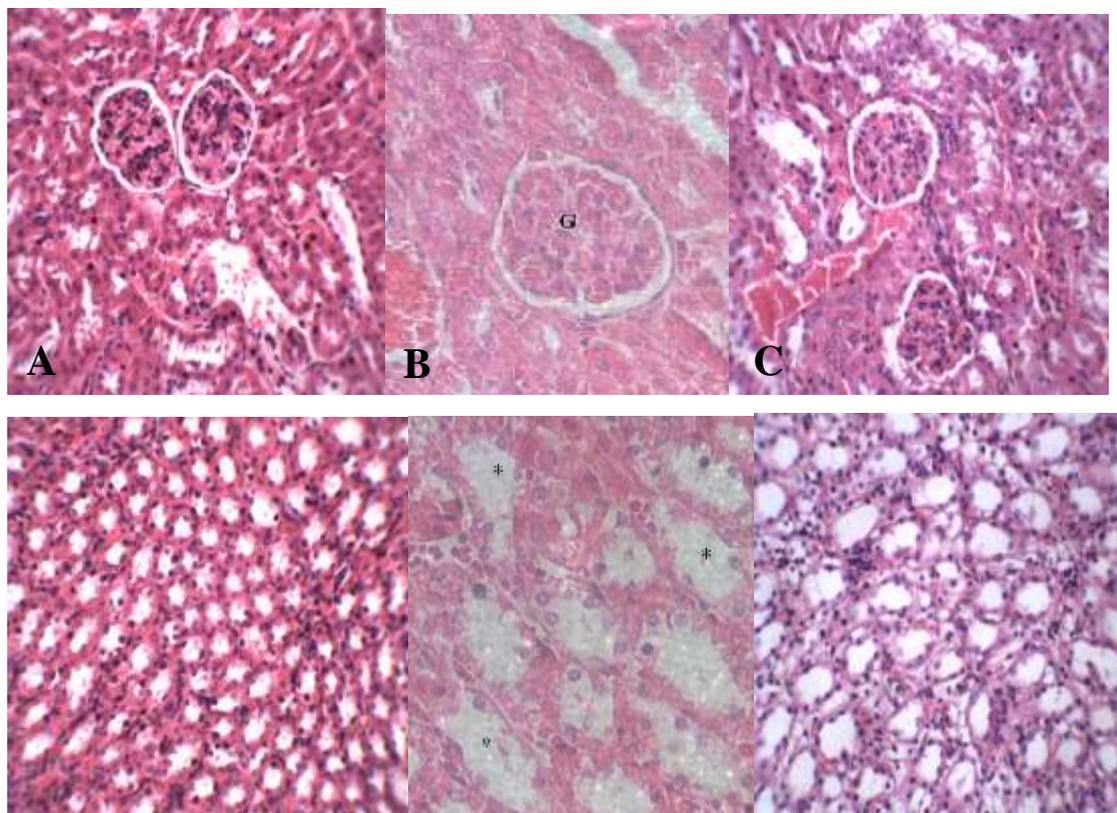
WHITTLE, B. A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology Chemotherapy**, v. 22, p. 246–253. 1964.

**Figura 1:** Fotomicrografia do fígado dos grupos Controle - Salina (**A**), *P. microphyllum* (**B**) e *P. mucronatum* (**C**). HE: 100x.



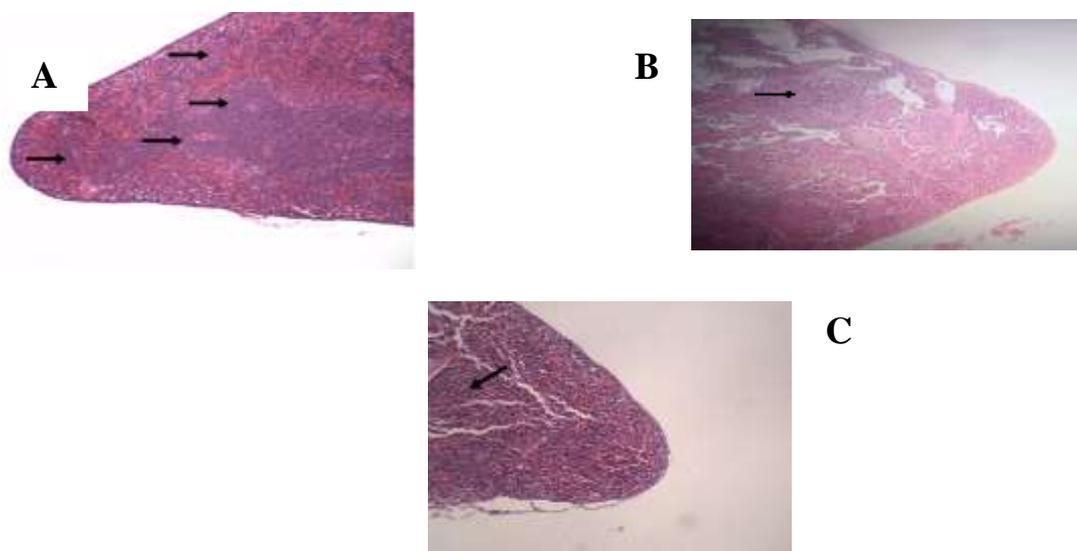
**A** – Observa-se veia centrolobular (v), hepatócitos (**setas brancas curtas**) e capilares sinusóides preservados (**setas retas finas**). H.E.: 400X. **B** - Observa-se veia centrolobular (v) e vacuolizações no citoplasma nos hepatócitos (**setas finas e curvas**). Presença de capilares sinusóides preservados (**setas retas finas**). H.E.: 400X. **C** – Observa-se veia centrolobular (v), atividade mitótica nos hepatócitos (**cabeças de seta**), e vacuolizações citoplasmáticas em vários hepatócitos (**setas finas e curvas**). Presença de ducto biliar (db) e capilares.

**Figura 2-** Fotomicrografias do rim dos grupos Controle - Salina (**A**), *P. microphyllum* (**B**) e *P. mucronatum* (**C**). H.E.: 400X.



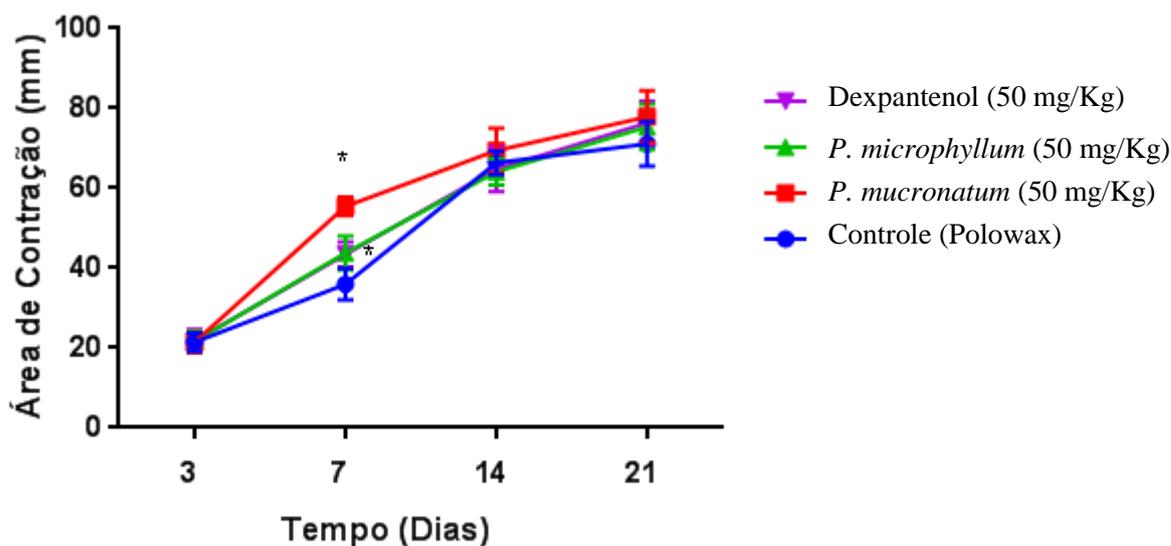
**A** - Nota-se glomérulos renais na cortical (**G**) com espaços subcapsulares preservados e túbulos coletores (**asterisco**) sem alterações na região medular. H.E.: 400X. **B** - Observa-se presença de glomérulos renais, espaços urinários conservados (**G**) e túbulos coletores conservados na região medular do rim (**asterisco**). H.E.: 400X. **C** - Observa-se presença de glomérulos renais (**G**) e vaso sanguíneo (**vs**) congestionado de sangue, espaços urinários conservados e presença de infiltrado linfocitário (**I**) permeando os túbulos coletores na região medular do rim (**asterisco**).

**Figura 3:** Fotomicrografia do baço dos grupos Controle - Salina (A), *P. microphyllum* (B) e *P. mucronatum* (C). HE: 100x.



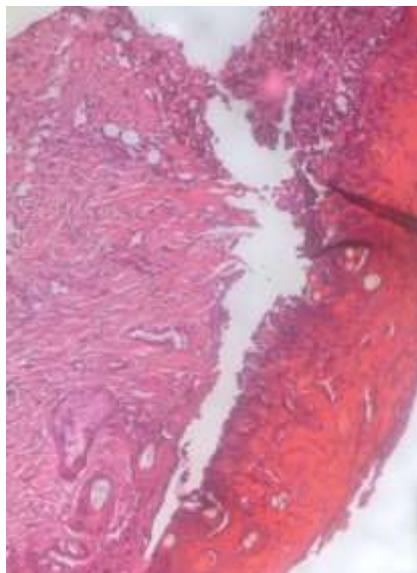
**A** – Observa-se presença de nódulos linfáticos preservados na periferia e de forma agrupada no interior do órgão linfóide (**setas longas**). H.E.: 100X. **B e C** – Nota-se nódulos linfáticos centralizados (**setas retas**), espalhando-se para a periferia. H.E.: 100X.

**Figura 4:** Comparação do percentual da área de contração das feridas nos dias 3, 7, 14 e 21 após tratamento com creme base Polowaz (CN), creme do EMB 5% das folhas de *P. mucronatum* (T1) e creme do EMB 5% das folhas de *P. microphyllum* (T2) e Dexpanthenol (50 mg/g) (CP).

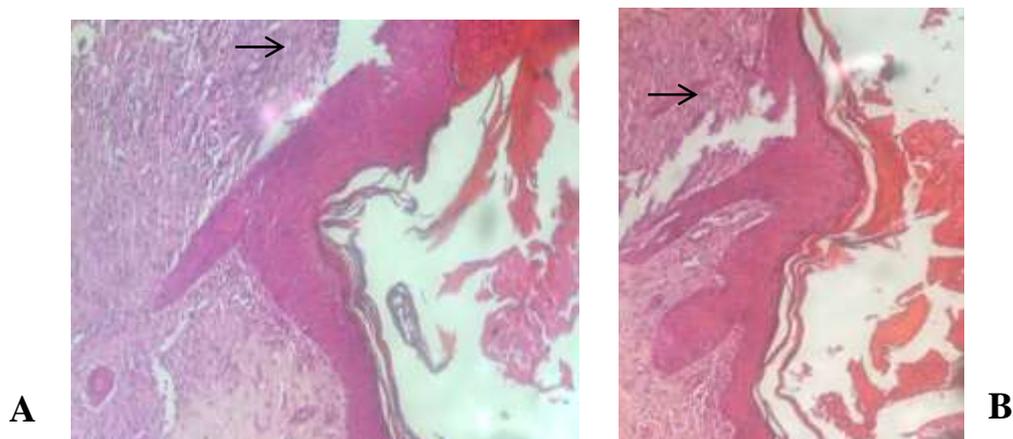


Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=5) e a diferença entre os grupos foi determinada por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste *t* de Student, considerando \*\*\*\*p < 0,0001.

**Figura 5** - Fotomicrografia da reação inflamatória no 3º dia (grupo CN). A reação inflamatória foi intensa, com células mononucleares e polimorfonucleares. HE: 100x.

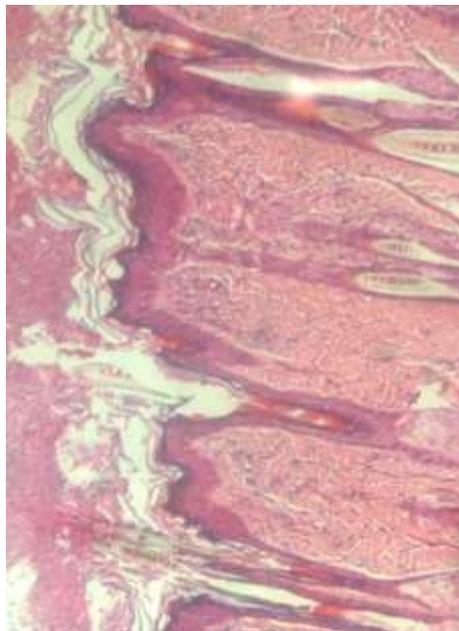


**Figura 6** - Fotomicrografias de feridas cutâneas no 7º dia de tratamento. HE: 100x.

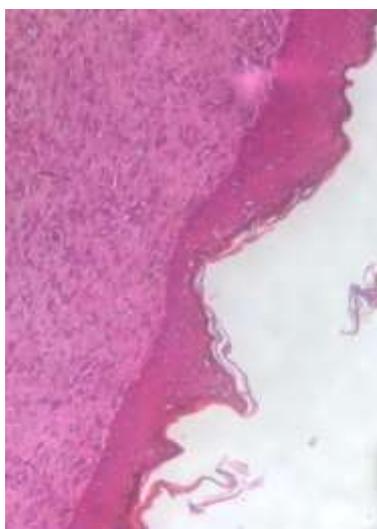


HE: ampliações 100x (todas as imagens). **A:** representa o grupo controle negativo (CN). **B:** representa o creme do EMB 5% das folhas de *P. microphyllum* (T2) na dose de 50 mg/kg. Cada grupo de animais (n = 6 ratos). Os asteriscos representam o tecido normal e a seta pequena revela a área de lesões da pele.

**Figura 7** - Fotomicrografia da presença do tecido de granulação e neovascularização no 7º dia. Os animais foram tratados com o creme do EMB 5% das folhas de *P. microphyllum* (T2) na dose de 50 mg/kg. HE: 100x.



**Figura 8** - Fotomicrografia da presença de fibroses no 14º dia do grupo tratado com o creme do extrato metanólico de *P. mucronatum*. Observa-se fibras de colágeno, sob a nova epiderme (avaliação de reepitelização). Secções coradas com HE: 100x.



## CONCLUSÕES

- A análise por CG/EM possibilitou a detecção de 51 constituintes nos extratos das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum*, distribuídos em diversos grupos de compostos. Os constituintes com maiores percentuais foram Lupenona, (23.07%), Lupeol (18.53%) e Dimetilriptamina (18.36%) para *P. microphyllum* e Pentacosane (11,37%), Hexacosane (10.72%) e Lupenona (10.21%) para *P. mucronatum*.
- O perfil fitoquímico dos extratos metanólicos das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* revelou a presença de flavonóides, alcalóides, monoterpénóides, sesquiterpenóides e diterpenóides, triterpenos/esteroides, açúcares redutores e leucoantocianidinas e proantocianidinas condensadas.
- Os extratos apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens testadas, destacando-se a espécie *P. mucronatum* por apresentar os melhores resultados. No geral, foram observados que os extratos n-hexano e diclorometano exibiram as maiores atividades.
- O conteúdo fenólico total dos extratos MeOH de *P. mucronatum* e *P. microphyllum* foi  $479,64 \pm 44,07$  e  $139,42 \pm 10,78$  mg EAT/g, respectivamente. O extrato MeOH de *P. mucronatum* apresentou atividade antioxidante significativa pelo método do sequestro do radical livre DPPH•.
- Os extratos MeOH das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados, exceto para o fungo *Candida albicans*.
- Os extratos MeOH das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* não promoveram lise nas hemácias de camundongos mas mostraram atividade citotóxica frente a linhagem tumoral humana HEP-2.
- No ensaio da toxicidade aguda, os extratos não causaram letalidade nos animais na dose de 2.000 mg/Kg quando administrado por via oral. No entanto, foram observados efeitos excitatórios e inibitórios na avaliação comportamental.

- O extrato MeOH das folhas de *P. microphyllum* e *P. mucronatum*, administrado por via oral reduziu a migração celular no modelo de bolsão de ar subcutâneo e inibiu o aumento da permeabilidade vascular em camundongos.
- Os cremes a base dos extratos MeOH de *P. microphyllum* e *P. mucronatum* auxiliaram no processo de cicatrização de feridas cutâneas no dorso de ratos, reduzindo o diâmetro das lesões ao longo do experimento.

**APÊNDICE A** – Tabela com os micro-organismos utilizados na atividade antimicrobiana.

<b>CÓDIGO</b>	<b>MICRO-ORGANISMO</b>
<b>Bactérias Gram-positivas</b>	
UFPEDA 02	<i>Staphylococcus aureus</i> (gram-positiva)
UFPEDA 86	<i>Bacillus subtilis</i> (gram-positiva)
UFPEDA 100	<i>Micrococcus luteus</i> (gram-positiva)
UFPEDA 138	<i>Enterococcus faecalis</i> (gram-positiva)
<b>Bactérias Gram-negativas</b>	
UFPEDA 224	<i>Escherichia coli</i> (gram-negativa)
UFPEDA 396	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (gram-negativa)
UFPEDA 416	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (gram-negativa)
<b>Bactéria Álcool-Ácido Resistente</b>	
UFPEDA 71	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (bactéria álcool-ácido resistente)
<b>Leveduras</b>	
UFPEDA 1002	<i>Candida krusei</i>
UFPEDA 1007	<i>Candida albicans</i>
UFPEDA 1320	<i>Malassezia furfur</i>

UFPEDA (Coleção de culturas microbianas do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco).

**APÊNDICE B** – Resultado do perfil fitoquímico do extrato MeOH das folhas de *P. mucronatun* e *P. microphyllum*.

<b>Metabólitos Secundários</b>	<b>Extrato MeOH <i>P. mucronatun</i></b>	<b>Extrato MeOH <i>P. microphyllum</i></b>
Açúcares Redutores	+	+
Alcalóides	+	+
Antraquinonas	-	-
Cumarinas	-	-
Monoterpenóides	e +	+
Sesquiterpenóides		
Triterpenóides	e +	+
Esteróides		
Flavonóides	+	+
Proantocianidinas condensadas	e +	+
Leucoantocianidinas		
Saponinas	-	-
Derivados Cinâmicos	-	-
Fenilpropanoglicosídeos	-	-

(+) presença do metabólito secundário, (-) ausência do metabólito secundário.

**ANEXO – A:** Tabela com os sistemas cromatográficos empregados na prospecção fitoquímica dos extratos MeOH das folhas de *P. micrphyllum* e *P. mucronatum*.

<b>METABÓLITOS</b>	<b>FASE MÓVEL</b>	<b>REVELADOR</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Açúcares Redutores	n-BuOH-Me <sub>2</sub> CO-TPPO <sub>4</sub> (40:50:10, v/v)	Cloreto de trifeniltetrazólio	METZ, 1961
Alcalóides	AcOEt-AF-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:11:11:26 v/v)	Dragendorff	WAGNER, 1996
Antraquinonas	AcOEt-MeOH - H <sub>2</sub> O (100:13,5:10)	Bornstragen	WAGNER, 1986
Cumarinas	Tolueno- AcOEt -AF (6:4:1 v/v)	U.V. 365nm	WAGNER, 1996
Monoterpenóides e Sesquiterpenóides	Benzeno-AcOEt (97:03)	Vanilina em ácido sulfúrico	WAGNER, 1996
Triterpenóides e Esteróides	AcOEt-AF-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:0,5:0,5:0,5)	Lieberman/Burchard	HARBONE, 1998
Flavonóides	AcOEt-AF-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:11:11:26)	NEU	XAVIER, 1988
Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	AcOEt-AF-AcOH-H <sub>2</sub> O (100:11:11:26)	Vanilina em ácido clorídrico	ROBERTSON, 1957
Saponinas	-	Afrogenicidade	SCHENKEL, GOSMANN, ATHAYDE (2000)

n-BuOH = n-butanol; Me<sub>2</sub>CO = acetona; TPPO<sub>4</sub> = tampão fosfato; AcOEt = Acetato de etila; AcOH = ácido acético; H<sub>2</sub>O = água; AF = ácido fórmico; MeOH = metanol; ; NEU = ácido etilborilaminoéster a 1% em etanol; UV = ultravioleta; Et<sub>2</sub>O-Tolueno; AcOH = Etóxi etano

## ANEXO B – Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Ciências Biológicas  
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife - PE - Brasil  
 Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
 Fax: (55 81) 2126 8350  
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 03 de abril de 2013.

Ofício nº 556/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
 Para: **Prof. Sebastião José de Melo**  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Departamento de Antibióticos-CCB  
 Processo nº 23076.056734/2012-15

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "*Phoradendron mucronatum* (DC.) Krug & Urb. e *Phoradendron microphyllum* (Pohl ex DC.) Trel.: Componentes Químicos e Bioatividade".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de Antibióticos do Departamento de Antibióticos/UFPE. Animais: camundongos Swiss e ratos Wistar; Peso: 25-35g/ 200-250g; sexo: machos/ machos; idade: 60 dias/90 dias; nº total de animais: 84 camundongos/ 75 ratos.

Atenciosamente,