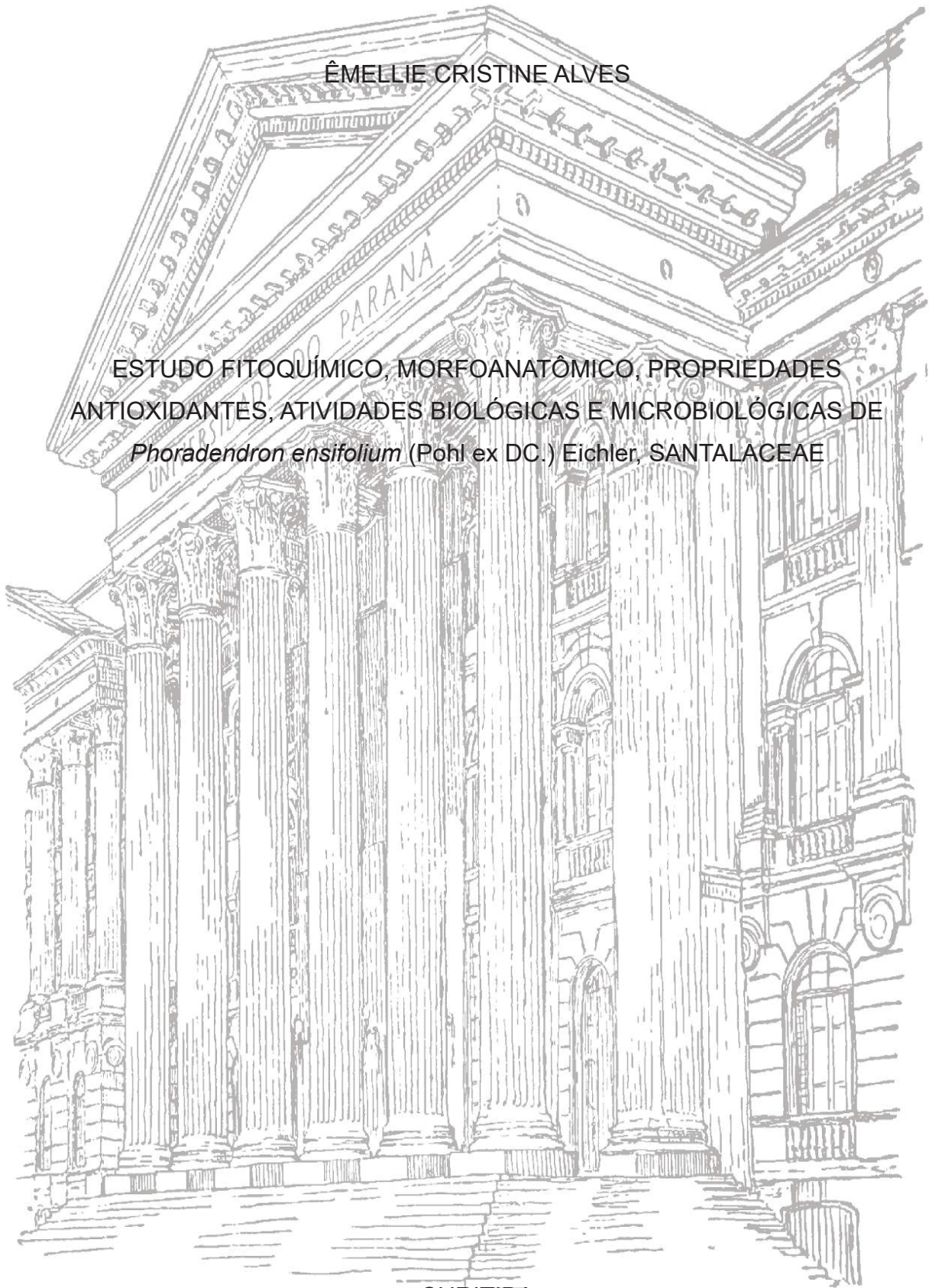


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ÊMELLIE CRISTINE ALVES

ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO, PROPRIEDADES  
ANTIOXIDANTES, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E MICROBIOLÓGICAS DE  
*Phoradendron ensifolium* (Pohl ex DC.) Eichler, SANTALACEAE



CURITIBA

2023

ÊMELLIE CRISTINE ALVES

ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO, PROPRIEDADES  
ANTIOXIDANTES, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E MICROBIOLÓGICAS DE  
*Phoradendron ensifolium* (Pohl ex DC.) Eichler, SANTALACEAE

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Farmacêuticas, no curso de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da  
Saúde, da Universidade Federal do Paraná.  
Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2023

Alves, Êmellie Cristine

Estudo fitoquímico, morfoanatômico, propriedades antioxidantes, atividades biológicas e microbiológicas de *Phoradendron ensifolium* (Pohl ex DC.) Eichler, Santalaceae [recurso eletrônico] / Êmellie Cristine Alves – Curitiba, 2023.

1 recurso online : PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientador: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

1. Santalaceae. 2. *Phoradendron*. 3. Compostos fenólicos. 4. Alelopatia. 5. Hemólise. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.85



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **EMELLIE CRISTINE ALVES** intitulada: **ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E MICROBIOLÓGICAS DE PHORADENDRON ENSIFOLIUM (Pohl ex DC.) EICHLER, SANTALACEAE.**, sob orientação do Prof. Dr. **OBDULIO GOMES MIGUEL**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.


A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Maio de 2023.

  
OBDULIO GOMES MIGUEL  
Presidente da Banca Examinadora

  
DEISE PREHS MONTRUCCHIO  
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA (UFPR))

  
MILENA KALEGARI  
Avaliador Externo (FACULDADES PEQUENO PRÍNCIPE)

  
CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
LUCIANE DALARMI  
Avaliador Externo (CENTRO DE ENSINO SUPERIOR DE MARINGÁ -  
CURITIBA)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio e incentivo na busca pelo conhecimento

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por tantas bênçãos concedidas.

Agradeço meus amados pais por não medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus sonhos.

Ao meu irmão Guilherme, pela grande amizade e cuidado em todos os momentos

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao meu orientador Obdulio Gomes Miguel e Coorientadora Marilis Dallarmi Miguel, pela paciência, por compartilharem seus conhecimentos, sua sabedoria e pela amizade construída.

Aos professores do Núcleo de Estudos em Produtos Naturais e Farmacotécnica da Universidade Federal do Paraná pelos conselhos e momentos de confraternização.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pela espectros de ressonância nuclear magnética

Ao Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná e a prof.<sup>a</sup> Cleusa Bona Sartor pelas análises morfoanatômicas.

Aos técnicos de laboratório Paulo e Graça, pelo auxílio nas atividades desenvolvidas.

Aos amigos mestrandos e doutorandos, em especial à Elisiane, Gustavo e Larissa pela troca de experiências, incentivo e parceria em todos os momentos.

Aos servidores Gustavo e Edneia, pelos serviços que contribuíram nesta jornada.

As demais pessoas que estiveram envolvidas nos processos de construção desta tese.

## EPÍGRAFE

O começo de todas as ciências é o  
espanto das coisas serem o que são

**Aristóteles**

## RESUMO

A caracterização fitoquímica de plantas da biodiversidade brasileira é uma importante ferramenta na descoberta de novas moléculas bioativas, neste sentido, espécies endêmicas no Brasil constituem um importante campo de pesquisa. *Phoradendron ensifolium* (Pohl ex DC.) Eichler, Santalaceae, popularmente conhecida como erva-de-passarinho está amplamente distribuída na região Sul do país. Considerada em alguns momentos como uma planta daninha devido a sua ação hemiparasita. A escassez de estudos motivou o desenvolvimento do trabalho que teve como objetivo principal o estudo fitoquímico, morfoanatômico, propriedades antioxidantes, atividades biológicas e microbiológicas da espécie. O extrato hidroalcólico foi obtido por Soxhlet, o extrato aquoso foi obtido por maceração a quente. Foram pesquisados metabólitos secundários da classe dos alcaloides, leucoantocianidinas, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, esteroides e triterpenos, antocianinas, saponinas, heterosídeos cianogênicos e taninos. Foram realizados ensaios biológicos in vitro *Artemia salina*, atividade alelopática para as sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* e atividade hemolítica. Teor de fenólicos e flavonoides totais, propriedades antioxidantes e atividade antimicrobiana. O screening fitoquímico foi positivo para a presença de alcaloides, flavonoides, cumarinas, esteroides e triterpenos, antocianinas, saponinas e taninos. Não foi observada toxicidade frente *Artemia salina*. Atividade hemolítica foi observada em concentrações da fração acetato de etila e fração remanescente. O extrato hidroalcólico mostrou ação alelopática frente as sementes monocotiledôneas e dicotiledôneas. A partir da fração acetato de etila foi possível isolar a flavona apigenina-C-glicosídica. Os extratos do fruto apresentaram uma importante capacidade antioxidante. As frações do fruto não demonstraram ação antimicrobiana. O potencial revelado por *P. ensifolium* motiva estudos futuros para completa elucidação e aplicabilidade da espécie.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos; apigenina-C-glicosídica; alelopatia; hemólise; erva-de-passarinho.

## ABSTRACT

The phytochemical characterization of plants from Brazilian biodiversity is an important tool in the discovery of new bioactive molecules, in this sense, endemic species in Brazil constitute an important field of research. *Phoradendron ensifolium* (Pohl ex DC.) Eichler, Santalaceae, popularly known as mistletoe, is widely distributed in the southern region of the country. Considered at times as a weed due to its hemiparasite action. The scarcity of studies motivated the development of the work whose main objective was the phytochemical, morphoanatomical study, antioxidant properties, biological and microbiological activities of the species. The hydroalcoholic extract was obtained by Soxhlet, the aqueous extract was obtained by hot maceration. Secondary metabolites of the class of alkaloids, leucoanthocyanidins, flavonoids, coumarins, anthraquinones, steroids and triterpenes, anthocyanidins, saponins, cyanogenic heterosides and tannins were researched. In vitro biological assays for *Artemia salina*, allelopathic activity for *Lactuca sativa* and *Allium cepa* seeds and hemolytic activity were carried out. Total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties and antimicrobial activity. Phytochemical screening was positive for the presence of alkaloids, flavonoids, coumarins, steroids and triterpenes, anthocyanidins, saponins and tannins. No toxicity was observed against *Artemia salina*. Hemolytic activity was observed at concentrations of the ethyl acetate fraction and remnant fraction. The hydroalcoholic extract showed an important allelopathy against monocotyledonous and dicotyledonous seeds. From the ethyl acetate fraction, it was possible to isolate the apigenin-C-glycosidic flavone. The fruit extracts showed an important antioxidant capacity. The fruit fractions did not demonstrate antimicrobial action. The potential revealed by *P. ensifolium* motivates future studies for complete elucidation and applicability of the species.

**Keywords:** phenolic compounds; apigenin-C-glycosidic; allelopathy; hemolysis, mistletoe.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE <i>Phoradendron ensifolium</i> POR REGIÃO .....	24
FIGURA 2:	ILUSTRAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS DE <i>P. ensifolium</i> .....	25
FIGURA 3:	FOTOGRAFIA DE <i>P. ensifolium</i> EM ATIVIDADE HEMIPARASITÁRIA .....	26
FIGURA 4:	FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....	28
FIGURA 5:	SECÇÕES ANATÔMICAS DAS FOLHAS DE <i>P. ensifolium</i> .....	49
FIGURA 6:	SECÇÕES TRANSVERSAIS DA FOLHA FRENTE AO CORANTE SAFRABLAU .....	50
FIGURA 7:	SECÇÕES TRANSVERSAIS DA FOLHA FRENTE AOS TESTES HISTOQUÍMICOS .....	51
FIGURA 8:	SECÇÕES ANATÔMICAS DO FRUTO DE <i>P. ensifolium</i> .....	52
FIGURA 9:	SECÇÕES ANATÔMICAS DO FRUTO DE <i>P. ensifolium</i> FRENTE AOS TESTES HISTOQUÍMICOS .....	53
FIGURA 10:	CURVA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DAS FOLHAS E CAULES DE <i>P. ensifolium</i> .....	56
FIGURA 11:	PRECIPITADO OBTIDO A PARTIR DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA .....	60
FIGURA 12:	ESTRUTURA QUÍMICA DA APIGENINA-C-GLICOSÍDICA .....	61
FIGURA 13:	MÉDIA ARITMÉTICA DE GERMINAÇÃO DE <i>L. sativa</i> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	66
FIGURA 14:	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>L. sativa</i> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	67
FIGURA 15:	CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	67

FIGURA 16:	CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>L. sativa</i> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	68
FIGURA 17:	MÉDIA ARITMÉTICA DE GERMINAÇÃO DE <i>A. cepa</i> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	70
FIGURA 18	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>A. cepa</i> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	71
FIGURA 19:	CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>A. cepa</i> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	72
FIGURA 20:	CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>A. cepa</i> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	72
FIGURA 21:	CURVA DE DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS FRENTE AO ÁCIDO GÁLICO .....	74
FIGURA 22:	CURVA DE DOSEAMENTO FLAVONOIDES FRENTE A CATEQUINA .....	75
FIGURA 23:	PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E FRUTOS DE <i>P. ensifolium</i> .....	76

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS PARTES AÉREAS DE <i>Phoradendron ensifolium</i> .....	54
TABELA 2:	COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DAS PARTES AÉREAS DE <i>Phoradendron ensifolium</i> .....	55
TABELA 3:	PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE <i>Phoradendron ensifolium</i> .....	56
TABELA 4:	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS DE <i>Phoradendron ensifolium</i> .....	57
TABELA 5:	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	57
TABELA 6:	CLASSES DE METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD) .....	59
TABELA 7:	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H DO COMPOSTO PAE032 .....	61
TABELA 8:	TAXA DE MORTALIDADE EM <i>Artemia salina</i> FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	63
TABELA 9:	CAPACIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	64

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: ANÁLISE DE GRUPOS QUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	38
QUADRO 2: DILUIÇÕES DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E FRUTO DE <i>P. ensifolium</i> PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

<sup>1</sup> H	Hidrogênio 1
<sup>13</sup> C	Carbono 13
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal 50%
cm	Centímetro
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EB	Extrato Bruto
EBF	Extrato bruto Folha
FAA	Formol, ácido acético glacial, e álcool etílico a 70% (v/v)
FAE	Fração Acetato de Etila
FR	Fração Remanescente
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
H <sub>2</sub> O	Água
MBM	Museu Botânico Municipal
mg	miligrama
mL	mililitro
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPM	Rotação por minuto
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TFC	Teor de Flavonóides Totais
TPC	Teor de Fenólicos Totais
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos específicos.....	19
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1	FAMÍLIA Santalaceae.....	21
2.2	GÊNERO <i>Phoradendron</i> .....	22
2.3	ESPÉCIE <i>Phoradendron ensifolium</i> .....	23
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	26
3.1.1	Morfoanatomia.....	28
3.1.1.1	Testes Histoquímicos.....	28
3.1.1.2	Preparo das lâminas semipermanentes.....	29
3.2	ENSAIO SISTEMÁTICO DO PERFIL FITOQUÍMICO.....	29
3.2.1	Preparo do extrato aquoso a 20%.....	29
3.2.1.1	Pesquisa de heterosídeos antociânicos.....	29
3.2.1.2	Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....	30
3.2.1.3	Pesquisa de heterosídeos cianogênicos.....	30
3.2.1.4	Pesquisa de taninos.....	30
3.3	ENSAIO TERMOGRAVIMÉTRICO.....	34
3.4	ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	35
3.4.1	Determinação do teor de umidade.....	35
3.4.2	Determinação do teor de cinzas.....	35
3.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	36
3.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO.....	36
3.7	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO.....	36
3.8	PESQUISA DE CLASSES DE METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	37
3.9	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.....	38

3.9.1	Hexano.....	38
3.9.2	Clorofórmio.....	39
3.9.3	Acetato de etila.....	39
3.10	ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....	40
3.10.1	Atividade tóxica em <i>Artemia Salina</i> .....	40
3.10.2	Atividade hemolítica.....	41
3.10.3.1	Atividade alelopática.....	42
3.10.3.2	Avaliação da atividade alelopática em <i>Lactuca sativa</i> .....	42
3.11	Avaliação da atividade alelopática em <i>Allium cepa</i> .....	43
3.11.1	Determinação do teor de fenólicos totais.....	44
3.11.2	Determinação do teor de flavonoides totais.....	44
3.11.3	Propriedade antioxidante.....	45
3.11.3.1	Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila.....	45
3.11.3.2	Determinação da propriedade antioxidante pelo método FRAP.....	45
3.11.3.3	Determinação da capacidade antioxidante frente ao método ABTS.....	46
3.12	ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA.....	47
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
4.1	Morfoanatomia.....	49
4.1.2	CARACTERIZAÇÃO DO FRUTO.....	51
4.2	ENSAIO SISTEMÁTICO DO PERFIL FITOQUÍMICO.....	53
4.3	ENSAIO TERMOGRAVIMÉTRICO.....	55
4.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E CINZAS.....	56
4.5	ESTUDOS QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. ensifolium</i> .....	57
4.5.1	Teor de sólidos solúveis e rendimento do extrato bruto e frações.....	57
4.6	PESQUISA DE CLASSES DE METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD).....	58
4.7	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO.....	59
4.7.1	Fração hexano.....	59
4.7.2	Fração clorofórmio.....	60

4.7.3	Fração acetato de etila.....	60
4.7.3.1	Apigenina-C-glicosídica.....	62
4.8	ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO.....	62
4.8.1	Atividade tóxica em <i>Artemia salina</i> .....	62
4.8.2	Atividade hemolítica.....	63
4.8.3	Atividade alelopática.....	64
4.8.3.1	Avaliação da atividade alelopática em <i>Lactuca sativa</i> .....	65
4.8.3.2	Avaliação da atividade alelopática em <i>Allium cepa</i> .....	69
4.9	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>P.</i> <i>ensifolium</i> .....	73
4.9.1	Determinação do teor de fenólicos totais.....	73
4.9.2	Determinação do teor de flavonoides totais.....	74
4.9.3	Propriedade antioxidante.....	76
4.10	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	78
5.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
	<b>ANEXO 1</b>	87

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo do perfil fitoquímico de espécies vegetais e a elucidação de novas moléculas bioativas tem sido uma importante ferramenta na valorização da biodiversidade brasileira, estimulando a preservação do bioma, o desenvolvimento rural, o manejo da agricultura sustentável, além de direcionar a descoberta de potenciais medicamentos e compostos terapêuticos, inclusive de espécies menos estudadas (RODRIGUES, et al., 2016; BIAZOTTO et al., 2019).

A família Santalaceae possui cerca de quarenta gêneros espalhados pelas regiões de clima tropical e temperado. As espécies se apresentam sob a forma de árvores, arbustos ou ervas (KUIJT, 2015). Um exemplo é o *Santalum album* Linn, conhecido como sândalo, espécie comum na região da Indonésia e importante fonte econômica pelo fornecimento de madeira e óleo essencial (INDRIOKO, 2015). Em relação às propriedades medicinais conhecidas em Santalaceae podemos citar o *Viscum album*, extensamente estudado quanto a sua ação imunomoduladora e antitumoral (VARELA et al, 2004).

Dentre as formas de vida presentes em Santalaceae, observamos o hemiparasitismo, onde a planta encontra-se associada a um hospedeiro para a retirada de água e nutrientes, obtendo fotossintatos a partir de suas próprias estruturas (NICKRENT et al, 2010; DETTKE & WAECHTER, 2014).

Neste sentido destaca-se o gênero *Phoradendron*, distribuído principalmente no continente americano, considerado um dos gêneros mais comuns e prejudiciais, uma vez que parasita espécies economicamente importantes, como espécies frutíferas e espécies utilizadas na indústria madeireira (RIGON, 2011). Devido a interação planta-hospedeiro ser mediada por metabólitos secundários a composição fitoquímica de *Phoradendron* pode variar em função das características do meio e do hospedeiro (FURLAN et al., 2019).

Apesar das propriedades atribuídas a *Phoradendron*, algumas espécies são pouco estudadas em relação ao seu conteúdo fitoquímico, apresentando relato apenas em relação ao seu hábito de vida, como é o caso de *Phoradendron ensifolium*.

*P. ensifolium* está presente em países da América do Sul como Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai. Nativa no Brasil encontra-se bem adaptada e distribuída no estado do Paraná, sendo observada desde ambientes como a Floresta Ombrófila

Mista até áreas urbanas. É observada em diversos hospedeiros sendo comum em *Lauraceae*. Apresenta frutos globosos, lisos, de coloração branca a rosada de acordo com o estágio de maturação (RIGON, 2011; ROTTA, et al., 2005).

Desta forma, considerando o uso de plantas como potenciais fontes de compostos bioativos e tendo em vista a escassez de informações sobre o perfil fitoquímico de *P. ensifolium*, a pesquisa em questão busca conhecer as potencialidades da espécie a partir da caracterização das classes de seus compostos fitoquímicos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil fitoquímico, morfoanatômico, propriedades antioxidantes, atividades biológicas e microbiológicas de *Phoradendron ensifolium* (Pohl ex DC.) Eichler, SANTALACEAE.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a morfoanatomia e histoquímica das folhas e frutos;
- Realizar o screening fitoquímico das partes aéreas da espécie;
- Proceder o estudo termogravimétrico das partes aéreas da planta;
- Realizar o estudo do perfil físico-químico das partes aéreas da espécie;
- Obter o extrato bruto alcoólico e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólico das folhas e frutos da espécie;
- Isolar compostos presentes nas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila da planta;
- Realizar identificação de substâncias por meio de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;
- Proceder os testes de toxicidade in vitro frente à *Artemia salina*,
- Pesquisar a atividade hemolítica do extrato bruto e frações;
- Analisar a atividade alelopática do extrato bruto e frações frente as sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*;

- Determinar o teor de compostos fenólicos totais;
- Determinar o teor de flavonoides totais;
- Estudar a propriedade antioxidante do extrato bruto e frações partir dos testes de DPPH, ABTS, FRAP;
- Investigar a atividade microbiológica do extrato bruto e frações.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA Santalaceae

A família Santalaceae possui cerca de 40 gêneros e 550 espécies mundialmente distribuídas desde áreas secas ou temperadas até biomas tropicais e úmidos. Como forma de vida, é possível notar a predominância de arbustos, árvores e ervas. Apesar do hemiparasitismo estar amplamente presente na família, não parecem haver hospedeiros específicos, sendo relatados desde casos de parasitismo dentro da própria família até episódios de auto parasitismo (DER & NICKRET, 2008). O hábito parasitário pode estar restrito a raízes e/ou caule, germinação parasita do caule e arbustos parasitas estritamente aéreos (DER & NICKRET, 2008; KUIJT et al., 2015).

Um dos exemplares mais conhecidos da família é o *Viscum album*, popularmente conhecido como visco ou visco europeu, cujo uso ganhou popularidade como planta medicinal devido a suas propriedades antitumorais atribuídas a viscotoxinas e lectinas presentes na espécie. Atualmente seu potencial farmacológico tem sido associado a ação anti-inflamatória, hipoglicemiante, antioxidante, antimicrobiana, sedativa e para doenças cardíacas (JAGER et al., 2021).

O gênero *Osyris* também apresenta um importante papel econômico e terapêutico nas regiões do sul da Europa, norte da África e sudoeste da Ásia. No Nepal, o uso das folhas está associado às suas propriedades terapêuticas, como exemplo, é possível citar a infusão das folhas secas de *O. wightiana* indicado para induzir o parto e estimular a produção de leite materno. Já a decocção das raízes de *O. lanceolata* é utilizada para tratamento de diarreia na região do Quênia. A partir da casca do caule de *O. compressa* são obtidos óleos essenciais empregados na fabricação de perfumes e velas aromáticas, seus frutos também são amplamente consumidos na região Sul-Africana (SHYAULA, 2012).

A ampla distribuição geográfica das espécies pertencentes a Santalaceae, bem como as variadas formas de vida em que se apresentam e os hospedeiros em que estão associadas permitem variações morfoanatômicas em suas estruturas, além de uma maior diversidade de constituintes químicos (DER & NICKRET, 2008).

No Brasil, Santalaceae pode ser observada em todas as regiões geográficas, sendo a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal seus

domínios fitogeográficos. Em todo o Brasil a família é representada por 7 gêneros e aproximadamente 54 espécies. Entre os gêneros podemos observar: *Acanthosyris* (Eichler) Griseb, *Antidaphne* Poepp. & Endl., *Dendrophthora* Eichler, *Eubrachion* Hook.f., *Jodina* Hook & Arn e. Meisn., *Osyris* L., *Phoradendron* Nutt., *Thesium* L., *Viscum* L. (KUIJT et al., 2015; DETTKE & CAIRES, 2020)

## 2.2 GÊNERO *Phoradendron*

O gênero *Phoradendron* Nutt. possui distribuição restrita ao continente americano ocorrendo preferencialmente em baixas e médias altitudes. Apresenta cerca de 230 espécies, todas com comportamento hemiparasita, popularmente conhecidas como “ervas de passarinho” (DETTKE & MILANEZE-GUTIERRE, 2009).

Plantas com hábito parasitário, como as espécies do gênero *Phoradendron*, apresentam relevância econômica pois estão entre as causas de doenças importantes em florestas ou áreas cultivadas, incluindo árvores frutíferas e as utilizadas na indústria madeireira. Como prejuízo decorrente da ação hemiparasita é possível observar a diminuição da taxa respiratória, diminuição na formação de frutos e sementes, morte de parte dos ramos, enfraquecimento da planta hospedeira, podendo leva-la à morte (SAUERBORN; MÜLLER-STÖVER & HERSHENHORN, 2007; RIGON, 2011).

Entretanto, apesar do potencial danoso para algumas espécies, o gênero *Phoradendron* está fortemente presente no ecossistema de algumas aves, sendo esta relação benéfica para ambas, pois os frutos produzidos por *Phoradendron* servem para a nutrição destes animais. Ao tornar-se um atrativo para as aves, estas se alimentam dos frutos e propagam suas sementes nas copas das árvores favorecendo a perpetuação da espécie (RIGON, 2011; ROJAS et al., 2021).

Cabe ressaltar que além dos fatores botânicos e ambientais, o uso terapêutico da *Phoradendron* merece especial atenção. Por estar amplamente difundida no continente americano, o seu uso popular ganhou diferentes aplicabilidades de acordo com sua distribuição geográfica, sendo empregada para amenizar quadros inflamatórios, doenças metabólicas, aliviar os sintomas da menopausa e controlar a hipertensão arterial. Tais possibilidades têm atraído a indústria farmacêutica, potencializando o surgimento de estudos científicos (VARELA, et al 2004).

Em seu estudo sobre as potencialidades terapêuticas da erva-de-passarinho Guimarães (2006) relacionou os principais gêneros de *Phoradendron* com seu uso popular, indicando sua aplicabilidade e forma de uso, desta forma, *Phoradendron sp.* foi relacionada ao tratamento de verrugas sob a forma de unguentos, e na forma de decocção para o tratamento de sarampo; *P. favencens* (Purch) popularmente conhecido como “*american mistletoe*” teve seu uso associado a ação antiespasmódica; *P. liga* foi utilizada como substituta ao *V. album* no tratamento anti-hipertensivo.

No Brasil, foram observadas 120 espécies distribuídas em todas as regiões do país. No estado do Paraná em 2010, foram citadas 24 espécies de *Phoradendron* (CAIRES & DETTKE, 2010), já Rigon & Cervi (2013) observaram a ocorrência de 14 espécies. Dentre as espécies conhecidas e amplamente distribuídas no estado do Paraná encontramos a espécie *Phoradendron ensifolium*.

### 2.3 ESPÉCIE *Phoradendron ensifolium*

A espécie pode ser encontrada em alguns países da América do Sul, como Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil, apresenta ocorrência confirmada nas regiões Norte (Pará), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), conforme esquematizado na figura 1. Como domínios fitogeográficos observa-se Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (DETTKE, 2014).

FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *Phoradendron ensifolium* POR REGIÃO



Fonte: Dettke & Caires, 2020

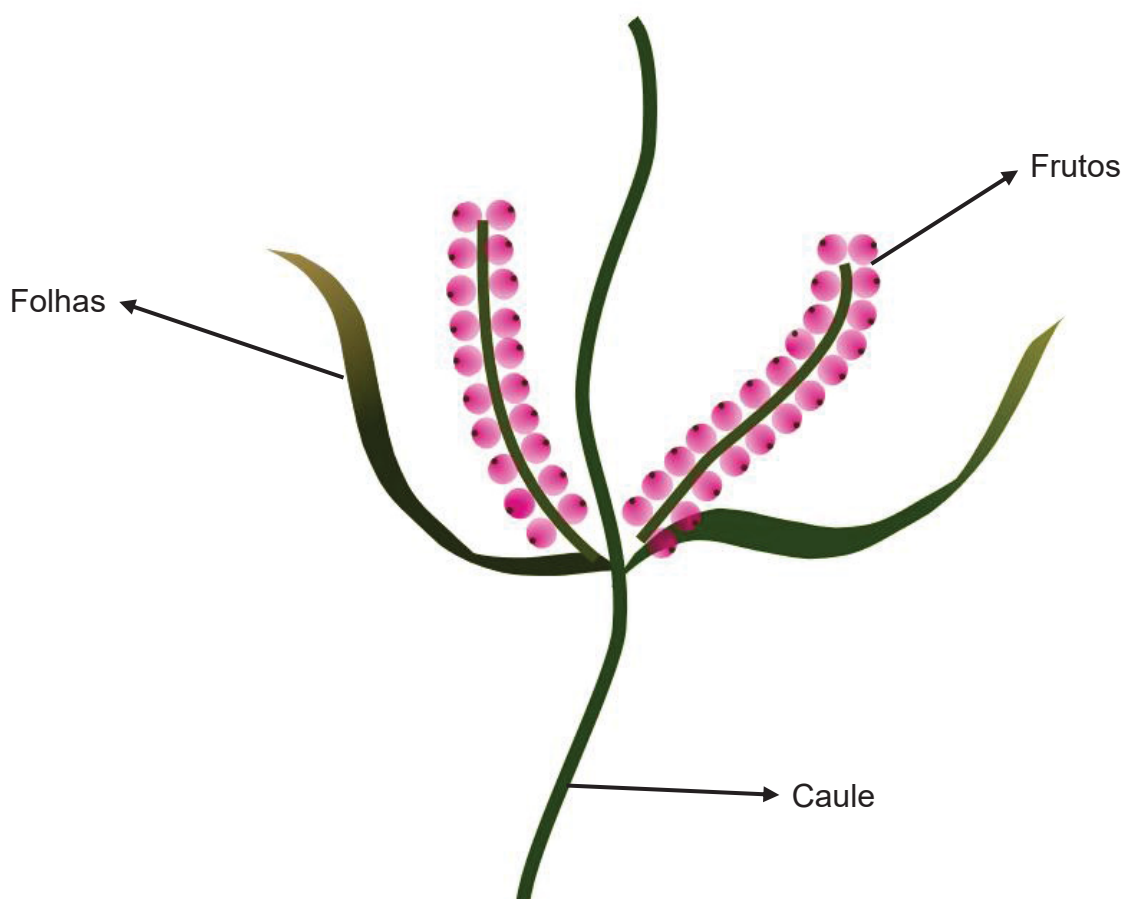
Em relação a sua nomenclatura podem ser encontradas algumas variações importantes: a planta apresenta como basiônimo *Viscum ensifolium* Pohle ex DC., indicando que esta era a nomenclatura anteriormente utilizada para a espécie. Como sinônimos observa-se *Phoradendron falcifrons* (Hook. & Arm.) Eichler, *Phoradendron linearifolium* Eichler e *Phoradendron interruptum* DC. Tais sinônimos estão relacionados as variações morfológicas apresentadas pela espécie. Entre as espécies Sul-brasileiras de *Phoradendron*, cabe ressaltar que *P. ensifolium* é a espécie que apresenta maior variação morfológica em relação ao comprimento e forma foliar que podem estar relacionadas ao grau exposição solar. Plantas que estão presentes no interior da mata ou entre os ramos do hospedeiro apresentam folhas compridas e frutos brancos enquanto espécies expostas ao sol tendem a apresentar folhas menores e frutos geralmente rosados (DETTKE, 2014).

A espécie apresenta hábito hemiparasita, caracterizando-se como monoica, com caules cilíndricos e levemente achatados nos ramos mais jovens, folhas ensiformes (em forma de espada) de coloração verde-escura até amarelada. As inflorescências apresentam-se em espigas articuladas, com flores de 0,08 a 0,15cm

de diâmetro. Frutos em bagas globosas com 0,3 – 0,6cm de diâmetro, lisas, alvas e translúcidas a levemente rosadas quando em estágio de maturação. As flores podem ser vistas de janeiro a junho, enquanto que os frutos de julho a dezembro (RIGON, 2011). As principais características da planta encontram-se ilustradas na figura 2, já a figura 3 apresenta a espécie em atividade hemiparasitária.

Amplamente adaptada e distribuída no estado do Paraná *P. ensifolium* pode ser encontrada desde ambientes como Floresta Ombrófila Mista até áreas urbanas. A ação hemiparasita é encontrada em diversos hospedeiros, sendo comum em Lauraceae e Ocotea (RIGON, 2011; ROTTA, et al., 2005).

FIGURA 2: ILUSTRAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS DE *P. ensifolium*



Fonte: a autora, 2023

FIGURA 3: FOTOGRAFIA DE *P. ensifolium* EM ATIVIDADE HEMIPARASITÁRIA



Fonte: a autora, 2023

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada em dois momentos, todas na cidade de Curitiba-PR. A primeira coleta ocorreu no bairro Campo Comprido em julho de 2017 nas coordenadas aproximadas 25° 26 '51.5 ``S 49° 20' 49.8"W, na ocasião *P. ensifolium* estava em atividade hemiparasitária em uma *Ocotea sp.* A segunda foi realizada no bairro Seminário dia 13 de outubro de 2019 nas coordenadas aproximadas 25°26'53.3"S 49°18'43.1"W, como planta hospedeira foi observada um exemplar de *Cinamomo sp.*

As espécies foram identificadas no Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba-PR, e tiveram suas respectivas exsicatas depositadas sob os números MBM-385268 e MBM-525497.

O estudo apresenta autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) sob o número A8AB244, para acesso a amostras do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico (em anexo).

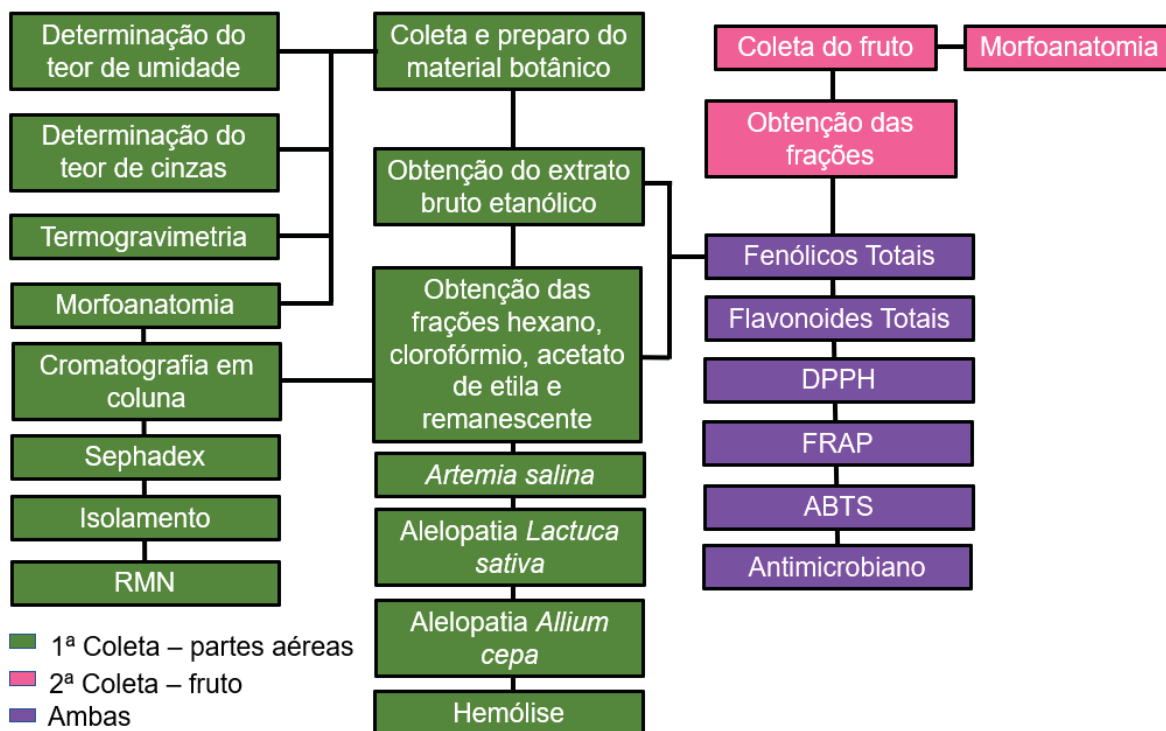
A figura 4 apresenta um fluxograma das principais atividades desenvolvidas durante a pesquisa. Cabe ressaltar que o estudo foi desenvolvido em dois momentos:

A partir da primeira coleta obteve-se uma amostra composta por folhas, caules e frutos, os quais foram secos e estabilizados em local seco, ventilado e livre de umidade. Após a completa secagem o material foi triturado com o auxílio de um moinho de facas e martelos. Foi obtido um total de 4000 g da planta, a qual foi armazenada ao abrigo da luz, para a posterior realização de testes.

A partir desta amostra foi realizada a obtenção do extrato bruto e frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e fração remanescente), *screening* fitoquímico preliminar e atividades biológicas *in vitro* (demonstrado em verde no fluxograma). À medida que a pesquisa avançou, e tendo como base os resultados obtidos até aquele momento, foi realizada uma nova coleta com o objetivo de investigar as potencialidades do fruto (representada na figura em rosa).

Na ocasião da segunda coleta, foram obtidos 35,3g de fruto. Estes foram separados, estabilizados, mantidos sob congelamento por 2 semanas e então liofilizados 2 vezes. O processo de liofilização consiste na secagem do produto a partir da retirada da água por sublimação. Após esta etapa foram obtidas 13,8g do fruto, os a amostra foi triturada para a obtenção do extrato bruto e suas frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e fração remanescente). Desta forma, a partir deste momento a pesquisa seguiu com as amostras das duas coletas.

Figura 4: FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS



Fonte: a autora, 2022

### 3.1.1 Morfoanatomia

Para a pesquisa das estruturas morfoanatômicas foram utilizadas amostras de folhas, caule e fruto de *P. ensifolium*. O material vegetal foi fixado em uma solução de Formaldeído 5mL, Ácido Acético Glacial 5mL e Etanol 70% 90 mL por 24 horas e após estocado em etanol 70% até a realização dos testes (JOHANSEN, 1940) (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

#### 3.1.1.1 Testes Histoquímicos

Os cortes nos planos transversal e longitudinal, foram realizados à mão livre e submetidos a reativos específicos de acordo com a classe de compostos pesquisados. Os cortes foram diafanizados com hipoclorito de sódio, lavados em água destilada e submetidos a reação com compostos específicos. Para a pesquisa de amido foi utilizado a reação com lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976), para a pesquisa de compostos fenólicos foi utilizado cloreto férrico 10% (JOHANSEN, 1940) e para verificar a presença de lipídios foi utilizada a reação com Sudan III (SASS, 1951)

### 3.1.1.2 Preparo das lâminas semipermanentes

O material vegetal foi seccionado, os cortes foram realizados à mão livre, compostos por secções transversais e longitudinais, deixado em vidro de relógio. Em seguida, clarificado em uma solução de hipoclorito de sódio 50% em placa de Petri por 24 horas. Após esse período o material foi lavado em água destilada. Os cortes foram corados em azul de Safranina (O'BRIEN, FEDER, McCULLY, 1964). Para a montagem das lâminas foi utilizada glicerina a 50% (BERLYN e MIKSCHE, 1976) e a lutagem com esmalte incolor (BEÇAK; PAULETTE, 1976). Os cortes foram então analisados em microscópio de luz em aumentos de 40, 100 e 400x.

## 3.2 ENSAIO SISTEMÁTICO DO PERFIL FITOQUÍMICO

O estudo qualitativo dos grupos fitoquímicos de *P. ensifolium* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003).

### 3.2.1 Preparo do extrato aquoso a 20%

Para o preparo do extrato aquoso foi utilizado 40g do material vegetal seco e 200mL de água destilada. A amostra foi levada à maceração em banho maria, a aproximadamente 60°C por 2 horas, com agitação manual.

#### 3.2.1.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

O extrato aquoso (5 mL) foi particionado em 3 tubos de ensaio. No primeiro adicionou-se ácido clorídrico 1 N até a atingir pH 1. No segundo, adicionou-se hidróxido de sódio 1% até atingir pH 10 e no terceiro, foi realizado o ajuste para neutralização do meio em pH 7. A reação foi considerada positiva em caso de formação da coloração avermelhada em meio ácido; azulada para o meio alcalino e violácea para meio neutro. Em caso de formação de coloração verde, a reação é considerada positiva para flavonoides.

### 3.2.1.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Os 3 tubos de ensaio utilizados no ensaio para heterosídeos antociânicos (item 3.2.1.1) foram agitados por 5 minutos e deixados em repouso por mais 30 minutos. A ocorrência de espuma com característica persistente, maior ou igual a um centímetro, indica a presença de heterosídeos saponínicos.

### 3.2.1.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Nesta análise, 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para um tubo de ensaio, seguido da adição de 1 mL de ácido sulfúrico 1N. Posteriormente, suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico no tubo e este foi levado ao banho-maria (60 °C) por 30 minutos. O aparecimento de cor vermelha na tira de papel indica a presença de heterosídeos cianogênicos.

### 3.2.1.4 Pesquisa de taninos

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de extrato aquoso, seguido de 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. O aparecimento de coloração azul é sugestivo da presença de taninos hidrolisáveis, a cor verde pode indicar taninos condensados e a cor marrom a presença de polifenóis.

### 3.2.1.5 Pesquisa de grupamento amino

Neste teste, 10 mL de extrato aquoso foram levados à concentração em banho-maria (60 °C) em cápsula de porcelana. Posteriormente em uma tira de papel de filtro, foram adicionadas 5 gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem do papel filtro, este foi nebulizado com solução de ninhidrina e levado à estufa à temperatura de 100 °C por um período de 15 minutos. A reação é considerada positiva, caso ocorra o aparecimento de coloração azul-violeta.

### 3.2.1.6 Pesquisa de ácidos fixos

Neste ensaio, adicionou-se 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1N em um balão que foi deixado sob refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, a solução foi acidificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e extraídas 3 porções de 10 mL, com éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativo, filtrados e evaporados em banho-maria (50 °C) até a secura. O resíduo foi levado a estufa por 10 minutos e adicionado de 5 mL de NH<sub>4</sub>OH 1N. O resíduo amoniacal foi impregnado em tira de papel filtro em 2 pontos principais. O papel foi seco em estufa e posteriormente o reativo de Nessler foi gotejado em um dos pontos. O aparecimento de cor marrom indica a presença de ácidos fixos.

### 3.2.1.7 Pesquisa de ácidos voláteis

Neste ensaio, 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para um tubo de ensaio e acidificados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Uma fita indicadora de pH foi suspendida no tubo e este levado ao banho maria (60 °C) por 30 minutos. O aparecimento de valores de pH abaixo de 7 indicam a presença desses ácidos.

### 3.2.2 Preparo do extrato hidroalcolico a 20%

Para o preparo do extrato hidroalcolico, 40 g das partes aéreas secas de *P. ensifolium* foram maceradas em 200 mL de álcool etílico a 70% (v/v), em banho-maria (70 °C) por 1 hora. A partir deste extrato realizou-se extrações consecutivas utilizando-se solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila). O processo de fracionamento foi realizado agitando-se o solvente em funil de separação, por 10 vezes com volumes de 20 mL. Ao final de cada extração, completou-se as porções extraídas resultantes para o volume de 200 mL com etanol.

#### 3.2.2.1 Pesquisa de alcaloides

Foram utilizados 50 mL de cada fração, levados à secura em banho-maria a 70 °C. Após a concentração, o extrato e frações foram ressolubilizados em 1 mL de etanol

e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Posteriormente, as soluções obtidas foram transferidas para tubos de ensaio e avaliadas quanto a presença de alcaloides, adicionando-se os seguintes reativos: Reativo de Mayer (precipitado ou turvação branca), Reativo de Dragendorff (precipitado cor vermelho-tijolo), Reativo de Bouchardat (precipitado alaranjado).

#### 3.2.2.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Neste teste, 10 mL do extrato hidroalcolico e frações foram transferidos para uma cápsula de porcelana e levados à secura em banho-maria (60 °C). O resíduo foi ressolubilizado em 5 mL de álcool etílico P.A., seguido da adição de 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e levados à ebulição. A reação caracteriza-se como positiva pelo aparecimento de coloração vermelha.

#### 3.2.2.3 Pesquisa de flavonoides

a) Heterosídeos flavônicos: Neste teste 20 mL do extrato hidroalcolico e frações foram levados à secura em banho-maria e ressolubilizados em 10 mL de etanol absoluto. As frações foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante. A reação foi considerada positiva para flavonas, em caso de formação da cor laranja. A formação da cor violeta indica a presença de flavanonas e a cor vermelha a presença de flavonois.

b) Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock: Em cápsula de porcelana, 10 mL de cada fração foram levados à secura em banho-maria (60 °C). Posteriormente, foram adicionados de 5 gotas de acetona (P.A), 30 mg de ácido bórico e ácido oxálico (1:1) e a cápsula foi levada a secura novamente. Por fim, adicionou-se 5 mL de éter etílico. A reação foi considerada positiva para flavonois, quando observado sob lâmpada ultravioleta, o aparecimento de fluorescência amarela esverdeada.

c) Ensaio de Pacheco: Neste teste, 10 mL do extrato e frações foram levados à secura, adicionados de cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético. Em seguida foram adicionados 0,1 mL de HCl concentrado. A reação foi considerada positiva para dihidroflavonois em caso de aparecimento da coloração roxa.

d) Ensaio com Zinco (Zn) em Ácido clorídrico (HCl). Neste teste, 10 mL do extrato e frações foram levados à secura e ressolubilizados em 10 mL de etanol. Posteriormente, 5 mL da solução foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados de pastilhas de Zn seguido da adição de HCl fumegante. A reação foi considerada positiva para dihidroflavonois em caso de formação da coloração roxa violeta.

#### 3.2.2.4 Pesquisa de cumarinas

Para a pesquisa por cumarinas foram utilizados 30 mL do extrato hidroalcólico e frações, foram acidificadas com ácido clorídrico 2 N até atingir pH 1 e levados à banho-maria (60 °C), até a concentração de 5 mL. A fração hidroalcólica foi transferida para um funil de separação, extraída duas vezes com 10 mL de éter etílico. Já a fração etérea resultante, foi levada diretamente à secura até a concentração de 5 mL. Os volumes obtidos foram transferidos para tubos de ensaio no volume e adicionados de 2 mL de hidróxido de sódio 1 N. Sob lâmpada ultravioleta (366 nm por 15 min) a formação de fluorescência de coloração azul ou verde-amarelada, torna a reação positiva para cumarinas. O extrato residual foi aplicado em papel filtro sob três pontos. A mancha 1 (coberta com papel alumínio) e mancha 2 (não coberta) foram tratadas com NaOH 1N. O papel filtro foi posto sob luz ultravioleta e a formação de fluorescência de cor azul ou verde-amarelada na mancha 2, também torna a reação positiva

#### 3.2.2.5 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Neste teste, 30 mL do extrato e frações foram transferidos para balões, adicionados de 5 mL de ácido sulfúrico a 10 % e deixados sob refluxo por 30 minutos. O volume final foi filtrado, adicionado de 30 mL de água destilada e a fração orgânica das frações foi extraída. O extrato hidroalcólico foi extraído 2 vezes com 10 mL de éter etílico. Os extratos resultantes foram concentrados em banho-maria (60 °C) até o volume de 5 mL e submetidos à reação de Bornträger, a qual adiciona-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio. O aparecimento da cor vermelha indica a reação positiva para naftoquinonas e/ou antraquinonas.

### 3.2.2.6 Pesquisa de esteroides e triterpenos

a) Reação de Liebermann-Bourchard: Neste teste, 30 mL do extrato e frações foram levados à secura em banho-maria (60 °C) e ressolubilizados em 5 mL de clorofórmio, seguido de filtração. Os extratos obtidos foram transferidos para tubos de ensaio em diferentes volumes (0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL) completando-se para 2 mL com clorofórmio. Posteriormente, realizou-se a reação de Liebermann-Bourchard, adicionando-se 1 mL de anidrido acético e 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, na qual a formação de cor rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. A formação de coloração verde indica a presença da função carbonila na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6, e a formação da cor amarela, indica a existência de uma metila no carbono 14.

b) Reação de Keller Kelliani: Para o teste, 2 mL do extrato e frações foram levados à secura em banho-maria (60 °C), adicionados de 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de cloreto férrico a 1%. Posteriormente, realizou-se a transferência para um tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A obtenção de cor na zona de contato dos sistemas líquidos e/ou coloração na fase acética, sugere a presença de desoxi açúcares, sendo azul indicativo de esteroides e verde para triterpenos.

## 3.3 ENSAIO TERMOGRAVIMÉTRICO

A termogravimetria é um teste relativamente rápido que fornece importantes informações sobre a temperatura segura de tratamento da planta, a fim de evitar a degradação de compostos relevantes ao estudo (CANEVAROLO JR., 2003).

O teste de termogravimetria foi realizado a partir de uma amostra de 10 mg da planta obtida a partir da amostra da primeira coleta, composta por folhas, caules e frutos. A amostra foi então seca, estabilizada, triturada e submetida ao aparelho LABSYS EVO TGA/STA-EGA (SETARAN) previamente calibrado com Índio (In; PF: 156,6°C;  $\Delta H_{\text{fusão}}$ : 28,54 J.g<sup>-1</sup>) como padrão.

O teste seguiu com uma taxa constante de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, com intervalos de aquecimento entre 30 e 600°C, sob fluxo de argônio (20 mL.min<sup>-1</sup>), em célula calorimétrica de alumina aberta.

### 3.4 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

#### 3.4.1 Determinação do teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade das partes aéreas de *P. ensifolium* foi adotada a metodologia proposta na Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (BRASIL, 2019).

O teste realizado em triplicata foi realizado a partir de amostras de 5g da planta pulverizada, acondicionada em cadinhos de porcelana previamente dessecados e levados à estufa a 100°C por 5 horas. Após, os cadinhos foram mantidos em dessecador. As pesagens foram realizadas até a obtenção de peso constante. O cálculo de teor de umidade foi realizado de acordo com a fórmula apresentada:

$$\% \text{ umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

$P_a$  = peso da amostra

$P_u$  = peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação

$P_s$  = peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação

#### 3.4.2 Determinação do teor de cinzas

Para o cálculo de cinzas totais, a amostra pulverizada foi pesada (3g), acondicionada uniformemente em cadinhos previamente dessecados e pesados, e levada a incineração em mufla a 600°C até que todo o carvão tivesse sido eliminado. Posteriormente os cadinhos foram levados ao dessecador e pesados até a estabilização do peso. Os dados foram anotados para o cálculo do percentual de cinzas (BRASIL, 2019).

$$\% \text{ cinzas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

$P_1$  = peso do cadinho após calcinação e resfriamento

$P_2$  = peso do cadinho com amostra após a calcinação e resfriamento em dessecador

$P_3$  = peso da amostra inicial

### 3.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

As partes de *P. ensifolium* (folhas, frutos e caule) obtidas a partir da primeira coleta foram secas em local fresco, arejado e protegido da umidade, triturada em moinho de facas e martelos. A obtenção do extrato vegetal foi realizada em duas etapas com 1800g da planta em cada uma. As extrações foram procedidas em aparelho de *Soxhlet* modificado patenteado sob número de registro: PI 0601703-7 A. A primeira etapa de extração durou dez dias com duração de 4 horas/dia, cada ciclo de extração durou cerca de 24 minutos, gerando cerca de 10 ciclos/dia. A extração da segunda porção durou 8 dias, por 4 horas/dia, resultando em média 10 ciclos de extração/dia. Para as duas extrações foram utilizados um total de 10 litros de etanol como líquido extrator. Após o esgotamento da droga vegetal foi obtido um volume total de 11.140 mL de extrato etanólico bruto a partir de 3584,3g de droga vegetal. Após o total esgotamento, os extratos brutos foram homogeneizados, filtrados à vácuo e concentrados em rotaevaporador até a obtenção de 500ml de extrato bruto.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

Para análise do teor de sólidos foi adotada a metodologia proposta pela Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (2019). O teste foi realizado em triplicada, para tanto, foram utilizadas placas de Petri previamente dessecadas e taradas, cada placa recebeu 5 mL do extrato bruto etanólico com o auxílio de uma pipeta volumétrica. As placas foram levadas à secura total em estufa a 105°C. Após foram resfriadas em dessecador. A diferença de peso entre cada placa antes e após a secagem possibilitou o cálculo do percentual do rendimento bruto.

### 3.7 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO

As frações da espécie vegetal foram obtidas através do sistema partição líquido-líquido, a partir do extrato bruto etanólico. Foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio, acetato de etila), foi adotado

como extrator o uso do aparelho Soxhlet modificado (PI 0601703-7) conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado sob refluxo por cerca de 6 horas. Após reserva de uma alíquota de 5 g do extrato bruto para a realização dos bioensaios, o particionamento foi realizado, ao fim das extrações, foi possível obter quatro frações: hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcolico. Ao final do processo, todas as frações foram submetidas à destilação para remoção do solvente e levadas à secura em banho-maria (40-50°C).

### 3.8 PESQUISA DE CLASSES DE METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A cromatografia em camada delgada pode ser considerada um método rápido e de fácil reprodutibilidade, desta forma, o método foi utilizado em diversos momentos da pesquisa a fim de investigar a presença de constituintes químicos através de reações de coloração e fluorescência características. Como fase estacionária foi adotada a placa de alumínio com sílica gel 60, as frações investigadas foram aplicadas em locais específicos da placa com o auxílio de um tubo capilar. As principais classes de constituintes químicos investigadas foram: esteroides e triterpenos, flavonoides e taninos, alcaloides e por fim cumarinas. Para cada um dos grupos descritos foi adotado o uso de uma fase móvel específica, bem como um respectivo revelador, conforme descritos no quadro 1:

QUADRO 1: ANÁLISE DE GRUPOS QUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Constituinte Químico	Fase Móvel	Revelador	Resultado esperado	Metodologia
Esteroides e Triterpenos	Tolueno: Acetato de Etila (93:7)	Vanilina Sulfúrica (1%)	Presença de banda azul violácea e/ou banda verde (olho nu). Presença de banda marrom escura (polifenóis)	Wagner, 1996
Flavonoides e Taninos	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Reativo de NEU (flavonoide)  Cloreto férrico (taninos e polifenóis)	Presença de banda verde e/ou amarela e/ou laranja fluorescente e/ou castanha (sob luz UV - 254nm)  Presença de banda azul (taninos hidrolisados) e/ou verde escura (taninos condensados). Presença de banda castanha escura a preta (polifenóis) a olho nu	Wagner, 1996
Alcaloides	Clorofórmio: MeOH (95:5) universo amônio	Dragendorff	Presença de banda de coloração tijolo (a olho nu)	Valente et al, 2006
Cumarinas	Tolueno: Acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e NaOH 1N	Presença de banda azul fluorescente sob luz UV (254nm) que se intensifica com a adição de NaOH	Miguel, 2003

Fonte: a autora, 2019

### 3.9 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

Para o isolamento e caracterização de substâncias químicas a partir das frações foi adotado o uso de cromatografia em coluna aberta, utilizando como fase estacionária sílica gel, e como fase móvel solventes em polaridade crescente.

#### 3.9.1 Hexano

Para a pesquisa de substância na fração hexano, foi utilizada uma coluna aberta (6 x 30cm), a pastilha foi preparada a partir de 19,12g da fração seca, ressuspensa em metanol, a sílica gel foi adicionada, até a obtenção de uma mistura homogênea. À coluna foi adicionado 90g de sílica gel como fase estacionária, a pastilha foi acomodada sobre a sílica, os solventes utilizados foram hexano e acetato

de etila (95:5) em forma crescente, até a proporção total de acetato de etila, posteriormente foi adotado o metanol como solvente. As alíquotas foram coletadas em frascos com capacidade para 10mL, numerados em ordem crescente. Ao fim da coluna foram obtidos 256 frascos. Os quais foram deixados em local arejado para a completa evaporação dos solventes. Após a secagem completa foi possível observar a precipitação de alguns compostos, estes foram submetidos a CCD para a classe de esteroides e terpenos, composta por tolueno : acetato de etila (93:7), como revelador foi utilizada vanilina sulfúrica (1%).

### 3.9.2 Clorofórmio

Para a pesquisa de substância na fração clorofórmio, foi utilizada uma coluna aberta (6 x 30cm), a pastilha foi preparada a partir de 18,21g da fração seca, ressuspensa em metanol, a sílica gel foi adicionada, até a obtenção de uma mistura homogênea. À coluna foi adicionado 90g de sílica gel como fase estacionária, a pastilha foi acomodada sobre a sílica, os solventes utilizados foram hexano e acetato de etila (95:5) em forma crescente, até a proporção total de acetato de etila, posteriormente foi adotado o metanol como solvente. As alíquotas foram coletadas em frascos com capacidade para 10ml, numerados em ordem crescente. Ao fim da coluna foram obtidos 256 frascos. Os quais foram deixados em local arejado para a completa evaporação dos solventes. Os frascos que apresentaram aspecto semelhante foram analisados através da CCD para alcaloides, utilizando clorofórmio : MeOH (95:5) em universo amônio, como revelador foi utilizado Dragendorf. A presença de banda de coloração tijolo indicou o teste positivo para a presença das substâncias, entretanto a amostra não foi suficiente para o isolamento do composto.

### 3.9.3 Acetato de etila

Para a pesquisa de substâncias na fração acetato de etila, foi utilizada uma coluna aberta (6 x 30cm), a pastilha foi preparada a partir de 2,18g da fração seca, ressuspensa em metanol, adicionada de sílica gel até a obtenção de uma mistura homogênea, aproximadamente 27,23g. À coluna foi adicionado 90g de sílica gel como fase estacionária, a pastilha foi acomodada sobre a sílica, os solventes utilizados

foram hexano e acetato de etila (40:60) em forma crescente, até a proporção total de acetato de etila, posteriormente foi adicionado metanol juntamente com o acetato de etila (5:95) em forma crescente, até a proporção total de metanol. As alíquotas foram coletadas em frascos de com capacidade para 10 mL, numerados em ordem crescente. Ao fim da coluna foram obtidos 266 frascos. Estes foram deixados em local arejado para a completa evaporação dos solventes. Após a secagem completa foi possível observar a precipitação de compostos nos frascos 88 à 255. Os quais foram analisados por CCD, utilizando a fase móvel destinada a identificação de flavonoides e taninos, composta por acetato de etila : ácido fórmico : ácido glacial acético : água (100:11:11:26), como revelador foi utilizado NEU (Difenolboriloxietilamino à 1% em metanol). Os frascos 129 e 199 apresentaram um precipitado amarelo-ouro, classificado como flavonoide quando submetido a cromatografia em coluna delgada. Foram coletadas 10 mg da amostra, diluídas em 500µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e enviados para análise por RMN, através do espectro de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H.

### 3.10 ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO*

#### 3.10.1. Atividade tóxica em *Artemia Salina*

Para o ensaio foi adotada a metodologia proposta por Meyer et al, (1982). Os ovos de *Artemia salina* foram eclodidos em solução salina preparada e mantida sob pH controlado entre 8,0 e 9,0. A solução foi ainda mantida sob constante agitação e aeração por um período de 48 horas. A partir do extrato e das frações foram preparadas soluções nas concentrações de 100µL/mL, 350µL/mL, 500µL/mL, 750µL/mL e 1000µL/mL, todos em triplicata. O solvente utilizado para suspensão das frações foi completamente evaporado em estufa, só então os crustáceos foram distribuídos, de modo que cada frasco recebeu 10 náuplios acomodados em 5ml de solução salina, onde permaneceram pelo período de 24h, só então foi avaliado o número de mortes frente às frações. Como parâmetro de controle positivo e negativo foram utilizados solução salina e sulfato de quinidina, também em triplicata. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística probitos.

### 3.10.2 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para a avaliação da atividade hemolítica (BANERJEE et al., 2008) por espectrometria foi adotado o uso de sangue de carneiro (Newprov®). Este foi levemente homogeneizado e retirado uma fração de 5ml para um tubo tipo Falcon com capacidade de 15ml, o sangue foi centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, e à papa de hemácia foram adicionados 3 mL de tampão fosfato salino (PBS) gelado. A lavagem da papa de hemácia com PBS foi repetida por três vezes, quando o sobrenadante obtido após a centrifugação apresentou aspecto incolor. Após, a papa de hemácias foi diluída com PBS gelado para a obtenção de uma solução a 2%. Para a realização do teste de hemólise foram utilizados os extratos brutos e frações nas concentrações de 1000, 750, 500, 200 e 100 µg/mL. A diluição das amostras foi realizada com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e PBS. Como controle negativo foi adotado 200 µL de PBS e 200 µL de solução de hemácia a 2%. Como controle positivo foi utilizado 200 µL de água em 200 µL de solução de hemácia a 2%. No controle solvente foram adicionados 10 µL de DMSO e 180 µL de PBS em 200 µL de solução de hemácia a 2%. Para o controle positivo foi realizada uma solução de saponina em PBS, assumindo as mesmas concentrações utilizadas para das frações. Para desconsiderar o valor de absorbância da amostra, foi utilizado o branco da amostra contendo 200 µL da concentração e 200 µL de PBS, de modo que cada concentração apresentou um branco da amostra. A análise foi preparada em eppendorfs contendo então alíquotas de 200 µL das amostras em diferentes concentrações, e 200 µL da suspensão hemácias a 2% todos em triplicata. As soluções em eppendorfs foram incubadas durante 3 horas em estufa a temperatura controlada de 37°C. Após a incubação as soluções foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. Uma alíquota de 200µL de cada sobrenadante foi retirada e transferida para uma microplaca de 96 poços de fundo redondo, onde procedeu-se a leitura por espectrofotometria, utilizando como comprimento de onda 540 nm.

### 3.10.3 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

#### 3.10.3.1 Avaliação da atividade alelopática em *Lactuca sativa*

O estudo alelopático com sementes de alface (*Lactuca sativa*) “Babá de verão” foi realizado segundo a metodologia proposta por Macias et al, (2000), Chon et al., (2005) e Dias et al., (2005). Os testes foram conduzidos em caixa gerbox nas dimensões 11x11x3cm. Cada caixa recebeu 2 papéis filtro Whatman nº 6,0. Para o preparo da solução mãe, 0,05g das amostras foram diluídas em metanol em balão volumétrico para a obtenção de 1000 µg/mL. O extrato bruto e suas frações foram utilizados nas concentrações de 100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 750µg/mL e 1000µg/mL. Cada caixa recebeu 6 mL de amostra de acordo com suas respectivas concentrações, as caixas foram mantidas sob fluxo laminar para completa evaporação do solvente utilizado. Após este período cada caixa gerbox recebeu 6 mL de água purificada, onde foram acomodadas 20 sementes divididas em 4 quadrantes em sentido horário. Como controle foram utilizados água destilada e metanol, tratados sob os mesmos moldes das frações. As amostras foram mantidas em câmara de germinação (BOD) sob temperatura controlada de 20°C, o teste foi realizado durante o período de 7 dias e dividido em duas etapas: germinação e crescimento.

Para o acompanhamento da germinação, as caixas foram observadas todos os dias no mesmo horário aproximado. As sementes foram consideradas germinadas quando houve protrusão de cerca de 3 mm da radícula. Para calcular o índice da velocidade de germinação (IVG), foram considerados o número de sementes germinadas a cada dia.

$$\frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{\text{Dia 1}} + \frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{\text{Dia 2}} + \dots + \frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{\text{Dia 7}} \rightarrow \text{Soma total} = \text{IVG}$$

Em relação ao crescimento das sementes, ao fim dos 7 dias, as caixas gerbox foram retiradas da BOD e o comprimento da radícula e do hipocótilo de cada plântula foi medido com o auxílio de papel milimetrado. As médias de crescimento foram submetidas ao teste de Scott-Knot.

### 3.10.3.2 Avaliação da atividade alelopática em *Allium cepa*

O teste para as sementes de cebola (*Allium cepa*), com grau de pureza 100%, sem uso de defensivos. Foi realizado seguindo a mesma metodologia de preparo das amostras adotada para os testes com *Lactuca sativa*. Entretanto os testes com *Allium cepa* foram realizados durante o período de 14 dias e dividido em duas etapas: germinação e crescimento.

Para o acompanhamento da germinação, as caixas foram observadas todos os dias no mesmo horário aproximado. As sementes foram consideradas germinadas quando houve protrusão da radícula. Para calcular o índice da velocidade de germinação (IVG), foram considerados o número de sementes germinadas a cada dia.

$$\frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{\text{Dia 1}} + \frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{\text{Dia 2}} + \dots + \frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{\text{Dia 7}} \rightarrow \text{Soma total} = \text{IVG}$$

Em relação ao crescimento das sementes, ao fim dos 14 dias, as caixas gerbox foram retiradas da BOD e o comprimento da radícula e do hipocótilo de cada plântula foi medido com o auxílio de papel milimetrado. As médias de crescimento foram submetidas ao teste de Scott-Knot.

### 3.11 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE *P. ensifolium*

Para os testes de determinação do teor de fenólicos totais, flavonoides totais, determinação da capacidade antioxidante frente ao radical livre 2,2 – difenil – 1-picril – hidrazila - DPPH●, *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) e determinação da capacidade de captação do radical livre 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS●, foram utilizadas amostras das coletas 1 e 2, desta forma foram avaliadas as capacidades da planta em sua totalidade e apenas do fruto separadamente. Para a realização dos testes as amostras foram previamente pesadas e diluídas em uma solução 50% metanol e água destilada. O quadro 2 apresenta a diluição utilizada para cada fração.

QUADRO 2: DILUIÇÕES DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E FRUTO DE *P. ensifolium* PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Amostras		Diluições (mg/ml)
Coleta 1	EBF	24,5
	HEXF	24
	FCLOF	25
	FAEF	24
	REMF	24
Coleta 2	FHEXB	24,6
	FCLOB	24,5
	FAEB	5,3
	REMB	4,6

Legenda: EBF – Extrato Bruto Folha, HEXF – Fração Hexano Folha, FCLOF Fração Clorofórmio Folha, FAEF – Fração Acetato de Etila Folha, REMF – Remanescente Folha, FHEXB – Fração Hexano Fruto, FCLOB, Fração Clorofórmio Fruto, FAEB – Fração Acetato de Etila Fruto, REMB – Remanescente Fruto  
 Fonte: a autora 2021

3.11.1 Determinação do teor de fenólicos totais

Para a determinação do teor de fenólicos totais (TPC) foi utilizado o método proposto por Singleton e Rossi (1965). Os testes foram conduzidos em quadruplicada em microplacas de 96 poços. Para cada teste foram utilizados 10µL das amostras previamente diluídas, 240 µL de água ultrapura e 15 µL de Folin-Ciocalteu 1N. Após três minutos foram adicionados 15 µL de solução de carbonato de sódio 20%. Os testes foram mantidos sob o abrigo da luz por uma hora. Após este período as leituras em espectrofotômetro foram realizadas a 720 nm. A curva padrão para a regressão linear e comparação dos resultados foi realizada a partir do ácido gálico nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL.

3.11.2 Determinação do teor de flavonoides totais

O teste para a obtenção dos níveis totais de flavonoides (TFC) foi realizado segundo a metodologia proposta por Jia et al., 1999. Para tanto foi o teste foi conduzido em microplaca de 96 poços em quadruplicada, cada teste foi constituído

por 20µL de amostra previamente diluída e 90µL de nitrito de sódio, o teste reagiu por 5 minutos e então foi adicionado 10µL de solução de Cloreto de Alumínio a 10%, reagindo novamente por 5 minutos. Foram então adicionados 90µL de solução de hidróxido de sódio a 1 mol.L<sup>-1</sup>. Os resultados foram mensurados com absorvância a 540nm. Como padrão para a regressão linear foi utilizada uma curva padrão de catequinas nas concentrações 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4mg/mL.

### 3.11.3 Propriedade antioxidante

A propriedade antioxidante é caracterizada pelo conjunto de reações que retardam a degradação oxidativa de uma substância. Para o extrato bruto e frações das coletas 1 e 2 de *P. ensifolium* foram realizados os testes descritos a seguir:

#### 3.11.3.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

Para a determinação da capacidade antioxidante frente ao radical livre 2,2 – difenil – 1-picril – hidrazila - DPPH● foi adotada a metodologia proposta por Brand-Williams et. al 1995. Foi o início do teste foi preparada uma solução metanólica de DPPH utilizando-se 0,0024g de DPPH/100 mL. Posteriormente foram adicionados 10µL da amostra previamente solubilizada, 190µL da solução de DPPH. O teste foi incubado ao abrigo da luz durante uma hora. Como controle positivo foi utilizado trolox. Após este período, a atividade antioxidante foi avaliada através da leitura da absorvância a 540nm. Os resultados foram obtidos a partir de uma regressão linear tendo em vista a curva padrão do trolox com concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL.

#### 3.11.3.2 Determinação da propriedade antioxidante pelo método FRAP

O teste FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) é um teste rápido e preciso que mede a capacidade de redução do ferro férrico (Fe<sup>3+</sup>). Para tanto, foi utilizado o método proposto por Benzie & Strain (1996). Para o preparo da solução tampão de

acetato 300mM com pH 3,63 foram utilizados 1,87g de acetato de sódio anidro, 16 mL de ácido acético glacial adicionados em balão volumétrico e adicionados com água destilada até o volume de 1 litro. Para a solução de ácido clorídrico (HCl) foram utilizados 3,31 mL de HCl concentrado, adicionado em balão volumétrico tendo seu volume completado até 1 litro com água destilada. Para a solução de Cloreto Férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 20 mM foram utilizados 0,135g de  $\text{FeCl}_3$  em um balão volumétrico de 25mL, tendo o restante do volume obtido a partir da adição de água destilada. A solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM em HCl 40 mM foram utilizados 0,01927 g de TPTZ-6mL de HCl e 0,03212 g de TPTZ/10 mL de HCl. Para a solução de FRAP foram então utilizados 100 mL de solução tampão, 10 mL de  $\text{FeCl}_3$  e 10 mL de TPTZ com HCl. Para a realização do teste foram então adicionadas 10 $\mu$ L da amostra previamente diluída e 300  $\mu$ L da solução de FRAP. Como padrão foi utilizado trolox nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mmol/mL. O teste foi incubado sob o abrigo da luz por 30 minutos, posteriormente os resultados foram lidos sob absorvância de 570nm. Os resultados foram comparados com a curva padrão por meio de regressão linear.

### 3.11.3.3 Determinação da capacidade antioxidante frente ao método ABTS

Como referência foi utilizada a metodologia proposta por Re et. al., 1999 para a determinação da capacidade de captação do radical livre 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS●, denominado também por TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) quando o padrão trolox é utilizado. Para o teste, foi previamente preparada uma solução estoque de ABTS a partir de 192mg de ABTS diluídos em 50 mL de água destilada, essa solução foi mantida sob o abrigo da luz. Separadamente foi preparada uma solução estoque de persulfato de potássio 2,45mmolL. Para esta solução foram utilizados 33,11 mg de ABTS/50mL de água destilada. A partir das duas soluções foi preparada a solução de ABTS reagente, esta foi mantida sob o abrigo da luz por 12 horas antes do início dos testes. Antes de iniciar os testes a solução foi previamente diluída em metanol para ajustar a absorvância a 690 nm. Para a realização do teste foram então utilizados 10  $\mu$ L das amostras previamente diluídas e 300  $\mu$ L da solução de ABTS reagente, o teste foi incubado por 30 minutos ao abrigo da luz, após este período os resultados foram mensurados com

absorbância de 690 nm. Para a análise dos resultados foi realizada regressão linear com base na curva obtida a partir do controle trolox nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL.

### 3.12 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

Para a avaliação do potencial antibacteriano de *P. ensifolium* foram utilizadas amostras da coleta 2, quem contém frações apenas do fruto. Foram preparadas soluções estoque das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e fração remanescente na concentração de 20.000 µg/mL diluídos em metanol:DMSO.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o método de micro diluição seriada em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (COCKERILL et al., 2012). As frações do fruto foram testados frente ao desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Os inócuos de *E coli*, *E faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram preparados em solução salina 0,85% a partir de uma cultura de placa com uma turbidez equivalente à escala McFarland 0,5 ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL). Essa suspensão foi então diluída 1:20 ( $\sim 5 \times 10^5$  UFC/mL). As amostras foram preparadas a partir da diluição seriada em 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha), em um intervalo de concentração de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL e 7,8 µg/mL em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de "U". As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica. Os testes ocorreram em quadruplicada.

Para a inoculação foi utilizado o volume de 10 µL de suspensão bacteriana nos poços. O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes foi realizado utilizando 100 µL de caldo e 10 µL de suspensão bacteriana, totalizando 110 µL. Para o controle positivo foram utilizados 90 µL de caldo, 10 µL do diluente (etanol 70%) e 10 µL de suspensão bacteriana totalizando 110 µL. A inoculação foi realizada em fluxo laminar. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados a olho nu. A formação de turbidez nos poços foi interpretada como ausência da atividade antibacteriana pela substância em

estudo, enquanto que a observação de meio límpido foi considerado como presença de atividade.

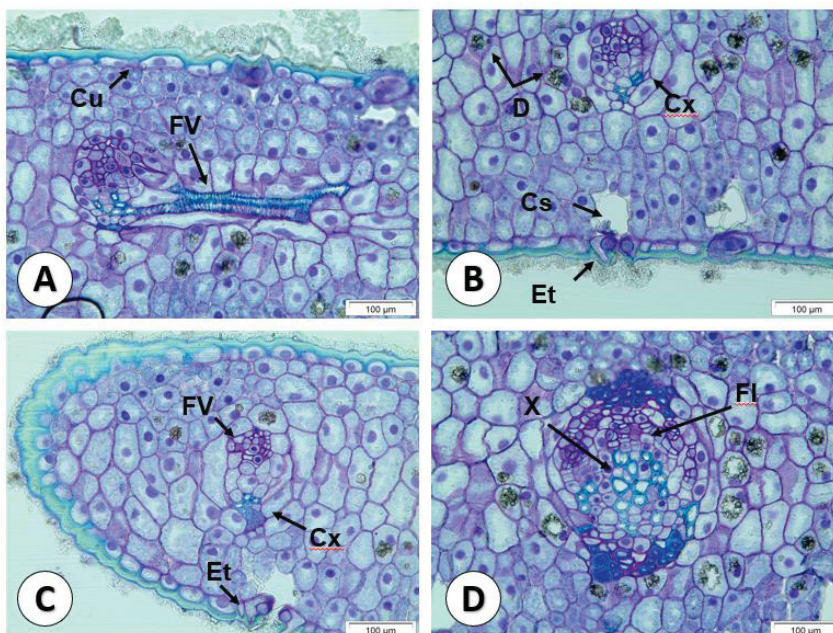
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Morfoanatomia

Os estudos morfoanatômicas das folhas de *P. ensifolium* apresentaram bainha cutinizada delgada em toda a extensão. Considerando que a espécie obtém água a partir da planta parasitada, a preservação da água em seu interior é um importante fator de sobrevivência, desta forma a camada impermeável auxilia a manutenção da hidratação foliar.

Os estômatos paracíticos mostraram-se presentes nas duas faces foliares e em maior número na face abaxial. Resultado semelhante foi encontrado por Dettke (2009) ao realizar o estudo morfoanatômico foliar de seis espécies de *Phoradendron*, observando que a localização dos estômatos permite a formação de uma câmara supraestomática. Em seu artigo, Dettke observou ainda que as células presentes no gênero são pouco alongadas, compostas principalmente por parênquima clorofiliano e aquífero. Os principais achados estão esquematizados na figura 5.

FIGURA 5: SECÇÕES ANATÔMICAS DAS FOLHAS DE *P. ensifolium*



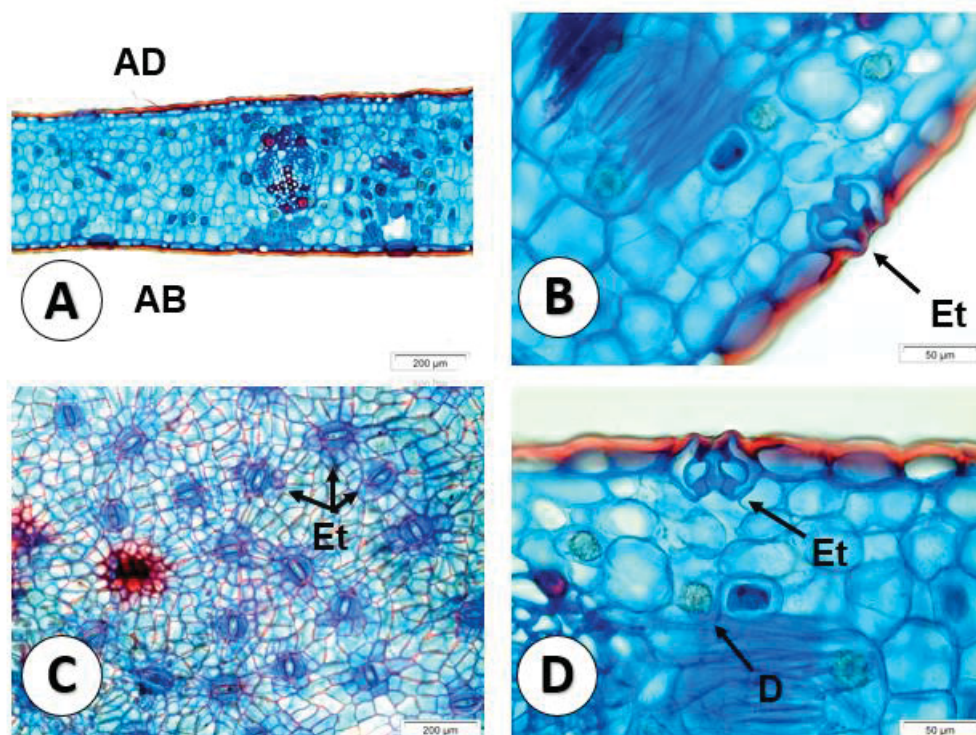
Nota 1: A – Corte longitudinal evidenciando o feixe vascular. B – Corte transversal adaxial evidenciando a presença de estômato. C – Corte transversal com bainha cutinizada. D – Corte transversal com feixe vascular.

Nota 2: Cu – Cutícula delgada, FV – Feixe vascular, D – Drusa, CX – Calota de fibras adjacentes ao floema, Cs – Câmara supraestomática, Et – Estômato, X – Xilema, FI – Floema.

Fonte, a autora, 2019

Os feixes vasculares constituem o sistema de transporte da planta, estes encontram-se cobertos por um feixe de fibras, o padrão encontrado em *P. ensifolium* tem sido observado em outras espécies do gênero (DETTKE, 2014). As fibras possuem impregnação de lignina, conforme é possível observar na reação com o corante safrablau (figura 6).

FIGURA 6: SECÇÕES TRANSVERSAIS DA FOLHA FRENTE AO CORANTE SAFRABLAU



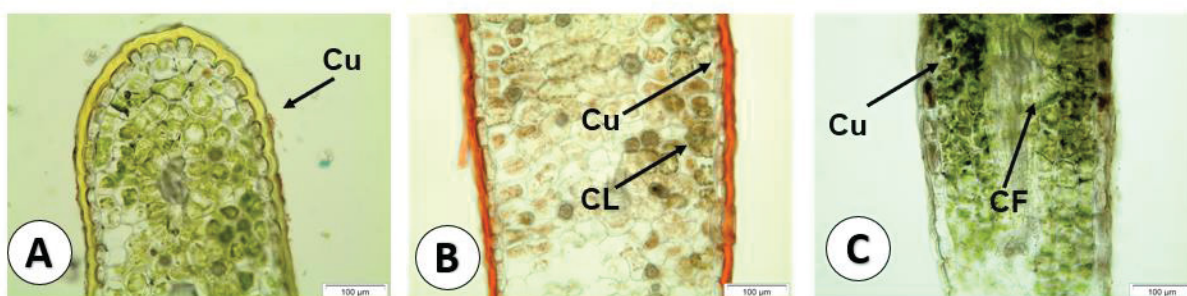
Nota 1: A – Corte transversal evidenciando a face adaxial e abaxial. B – Corte transversal adaxial evidenciando a presença de estômato. C – Corte paradérmico com estômato lignificado. D – Corte transversal abaxial.

Nota 2: AD – Adaxial, AB – Abaxial, ET – Estômato, DS - Drusa

Fonte: a autora, 2019

A partir dos testes histoquímicos (figura 7) foi possível observar a presença de compostos fenólicos nas folhas, o que corrobora com o resultado dos testes fitoquímicos. Frente a reação de Sudan III, observou-se a presença de compostos lipídicos no interior da folha e principalmente na bainha cutinizada. Tais achados corroboram com os estudos conhecidos sobre o gênero.

FIGURA 7: SECÇÕES TRANSVERSAIS DA FOLHA FRENTE AOS TESTES HISTOQUÍMICOS



Fonte: a autora, 2019

Nota 1: A – Corte transversal da folha sem sofrer reação química (controle). B – Corte transversal da folha Sudan III. C – Corte transversal da folha Cloreto Férrico.

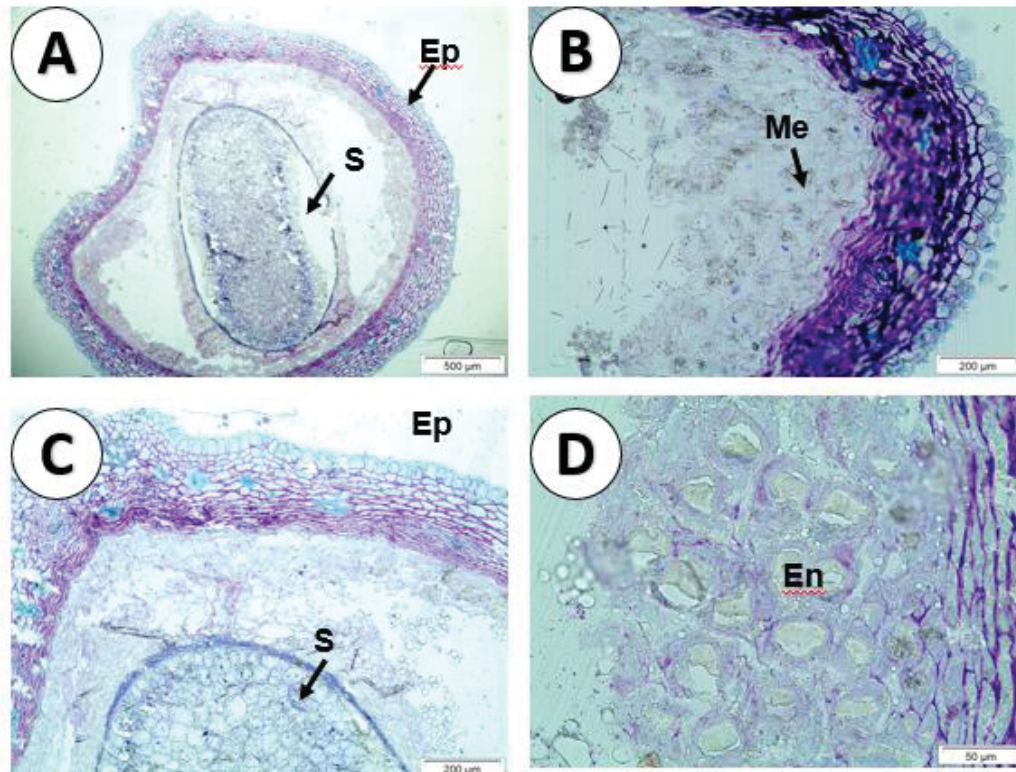
Nota 2: Cu – Cutícula delgada, CL – Compostos lipídicos, CF – Compostos fenólicos.

#### 4.1.2 CARACTERIZAÇÃO DO FRUTO

Os frutos das ervas-de-passarinho comumente se apresentam em forma de bagas, variando em relação ao tamanho, coloração e tamanho das sementes. Os frutos de *P. ensifolium* apresentam em torno de 0,5 cm de diâmetro e coloração branca ou rosada. De modo geral, os frutos maduros de *Phoradendron* apresentam epicarpo com camada cuticular espessa, as células apresentam-se papilosas e unisseriadas. O mesocarpo é a região mais ampla do fruto, constituído por diversas camadas celulares, com presença importante de viscina. A viscina consiste em uma substância rica em mucilagens, viscosa e translúcida, apresentando ação relevante na fixação das sementes à copa das árvores (DETTKE, 2013; POLLI, 2016). Os resultados encontrados nas análises morfoanatômicas corroboram com os demais autores, indicando que apesar das variações esperadas no gênero, o padrão de organização

tecidual se mantém entre as espécies. Os principais achados estão evidenciados na figura 8.

FIGURA 8: SECÇÕES ANATÔMICAS DO FRUTO DE *P. ensifolium*



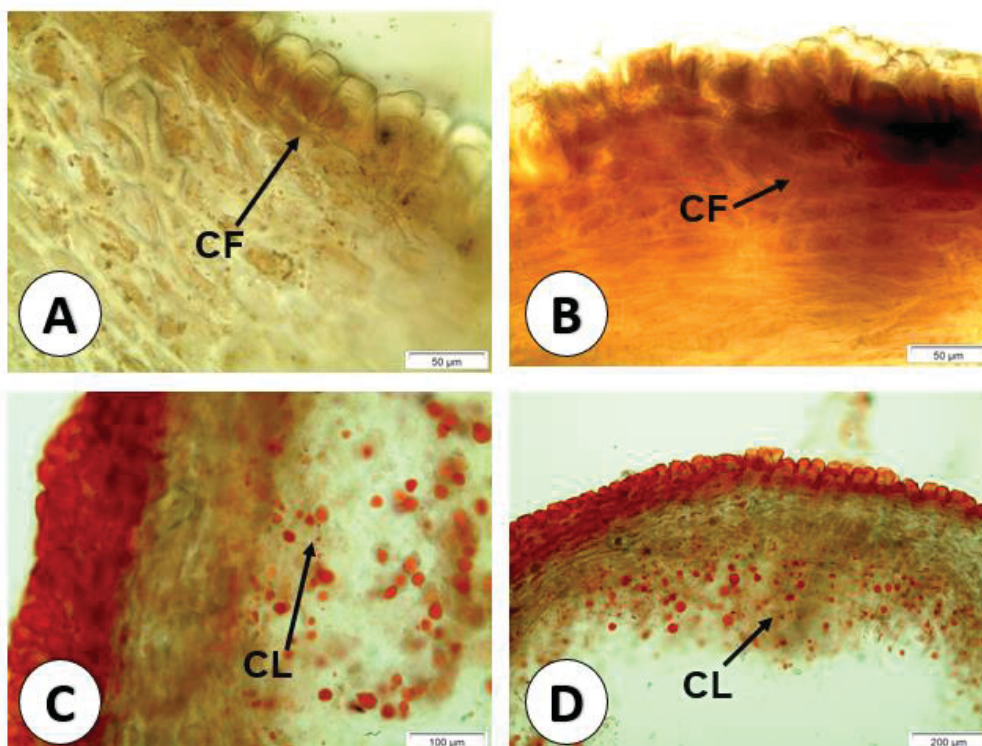
Nota 1: A – Corte transversal do fruto evidenciando a disposição da semente. B – Corte transversal do fruto evidenciando mesocarpo e epicarpo, C – Corte transversal do fruto, D – Corte transversal do fruto evidenciando o endocarpo

Nota 2: Ep – Epicarpo, S – Semente, Me – Mesocarpo, En - Endocarpo

Fonte: a autora, 2019

Quanto aos testes histoquímicos os frutos da espécie mostraram um importante teor de compostos fenólicos e lipídeos, encontrados principalmente no mesocarpo e pericarpo do fruto, conforme demonstrado na figura 9. Segundo Rojas (2021), a composição do fruto, tamanho, cor e tamanho da semente são fatores determinantes para a atração das aves e conseqüentemente dispersão das sementes.

FIGURA 9: SECÇÕES ANATÔMICAS DO FRUTO DE *P. ensifolium* FRENTE AOS TESTES HISTOQUÍMICOS



Nota 1: A – Corte transversal do fruto a presença de compostos fenólicos no pericarpo. B – Corte transversal do fruto a presença de compostos fenólicos no pericarpo, C – Corte transversal do fruto evidenciando a presença de compostos lipídicos, D – Corte transversal do fruto evidenciando a presença de compostos fenólicos no pericarpo.

Nota 2: EP – CF – Compostos fenólicos, CL – Compostos lipídicos.

Fonte: a autora, 2019

#### 4.2 ENSAIO SISTEMÁTICO DO PERFIL FITOQUÍMICO

As classes de compostos químicos presentes em *P. ensifolium* foram previamente caracterizadas a partir do *screening* fitoquímico. Os resultados foram categorizados e apresentam os resultados para o extrato hidroalcoólico e aquoso, respectivamente (tabela 1 e 2).

*P. ensifolium* demonstrou reações positivas para alcaloides, cumarinas, flavonoides, esteroides e triterpenos no extrato hidroalcoólico e antocianidinas, saponinas e taninos no extrato aquoso.

Rangel-Méndez et al. (2022) observaram variações na composição de metabólitos secundários de *P. watti* de acordo com as estações do ano. A concentração de compostos secundários pode sofrer alteração de acordo com o hospedeiro em que a planta se encontra, Assanga et al (2020) observaram diferenças na presença de compostos fenólicos em *P. californicum*, indicando que as interações planta-hospedeiro influenciam o metabolismo da espécie. A presença de flavonoides e taninos foi também observada em *P. perrottetti*, o que pode estar relacionado com o processo de intrusão da planta nos tecidos do hospedeiro (FURLAN et al., 2019).

As classes de metabólitos secundários encontrados em *P. ensifolium* corroboram com o gênero, é importante salientar que variações têm sido associadas às condições ambientais e ao hospedeiro.

TABELA 1: Composição Fitoquímica do extrato hidroalcolólico das partes aéreas de *Phoradendron ensifolium*

Grupos Fitoquímicos	FRAÇÕES			
	HEX	CLO	AE	REM
Alcaloides	+	+	-	++
Leucoantocianidinas	-	-	-	-
Flavonoides	-	-	++++	-
Cumarinas	++++	-	++	
Heterosídeos				
Antraquinônicos	-	-	-	-
Esteroides e / ou				
Triterpenos	+	+	-	-

Nota 1: HEX - Fração Hexano, CLO - Fração Clorofórmio, AE - Fração Acetato de Etila, REM - Fração Hidroalcolólica Remanescente. Nota 2: - reação negativa; + reação fraca, ++ reação moderada, +++ reação forte, ++++ reação intensa.

Fonte: os autores, 2019

TABELA 2: COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DAS PARTES AÉREAS DE *Phoradendron ensifolium*

Grupos Fitoquímicos	Análises	Resultado
Antocianidinas	HCl	++
Saponinas	Ensaio da espuma	++++
Heterosídeos Cianogênicos	Reação de Schoenbein	-
Taninos	Cloreto férrico	+++

Nota 1: - reação negativa; + reação fraca, ++ reação moderada, +++ reação forte, reação intensa.

Fonte: a autora, 2019

Os resultados obtidos a partir da caracterização fitoquímica preliminar também corrobora com os achados a partir dos testes histoquímicos da morfoanatomia da espécie, confirmando a presença de compostos da classe dos esteroides, flavonoides, cumarinas e taninos.

#### 4.3 ENSAIO TERMOGRAVIMÉTRICO

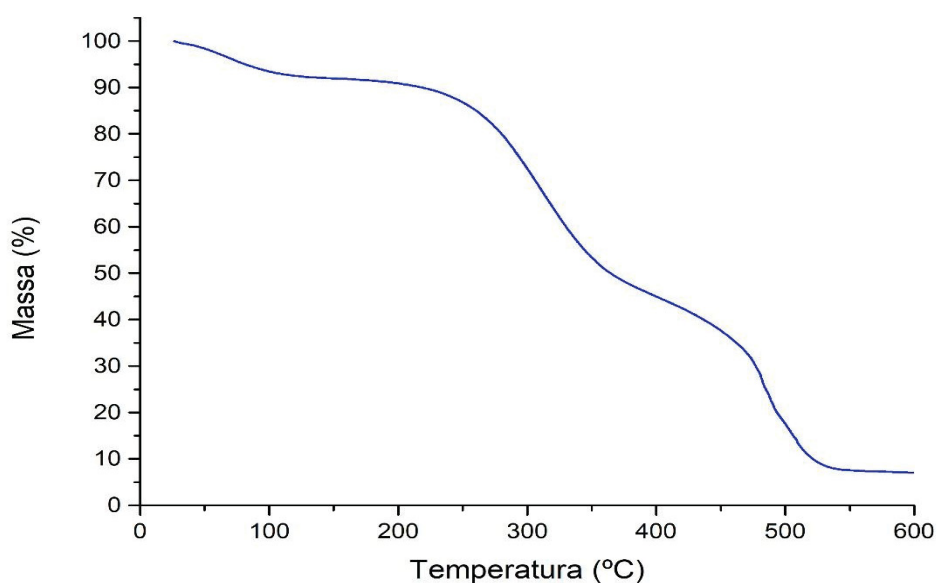
A análise térmica da amostra foi um importante parâmetro para avaliar as propriedades físico-químicas da planta, permitindo conhecer o padrão de degradação da espécie quando submetida a temperaturas e atmosferas controladas. Desta forma, foi possível identificar o teor de umidade e cinzas, a variação de massa da amostra pode ser utilizada como um indicativo para a presença dos principais grupos de metabólitos secundários. O padrão de perda de massa de *P. ensifolium* (tabela 3) apresentou três etapas, a primeira etapa de degradação caracterizou a perda de umidade da planta, totalizando 7% de massa. A segunda etapa de degradação é caracterizada pela decomposição de compostos metabólitos secundários como flavonoides, taninos e terpenos, representando 47,07% da amostra. A terceira etapa de degradação está relacionada à decomposição lenta de resíduos carbonados e polímeros, responsável pela perda de 37,35% da massa. A faixa de temperatura de degradação dos compostos (figura 10) revela que o método de obtenção do extrato bruto e frações foi seguro, uma vez que a extração a quente por Soxhlet atinge aproximadamente 75°C.

TABELA 3: PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE *Phoradendron ensifolium*

	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>% de massa</b>
<b>1</b>	Umidade	30 - 130	7,7
<b>2</b>	Degradação de Metabólitos Secundários	150 – 400	47,07
<b>3</b>	Resíduos carbonados e polímeros	400 – 500	37,35

Nota: % de degradação de massa por etapa  
 Fonte: Os autores (2019)

Figura 10: CURVA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DAS FOLHAS E CAULES DE *P. ensifolium*



Fonte: a autora, 2019

#### 4.4 Determinação do teor de umidade e cinzas

A determinação do teor de umidade e cinzas de *P. ensifolium* estão apresentados na tabela 4. O material vegetal apresentou umidade dentro dos limites permitidos pela farmacopeia brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019), cujo valor máximo é de 14%, sendo este fator primordial na manutenção da qualidade e das propriedades terapêuticas da planta. O excesso de umidade pode propiciar o desenvolvimento de

bactérias e fungos, além de permitir a ação de enzimas que podem degradar constituintes químicos (VASCONCELOS et al., 2012; SIMÕES et al., 2017; BRASIL, 2019).

TABELA 4: DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS DE *Phoradendron ensifolium*

Determinação	Material Vegetal
Teor de umidade	7,29%
Teor de cinzas totais	5,54%

Fonte: a autora, 2019

O teor de cinzas determinado na amostra seca, permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis e serve de parâmetro para possíveis adulterações do material vegetal (ARAUJO et al., 2006; SIMÕES et al., 2017; BRASIL, 2019;)

#### 4.5 ESTUDOS QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*

##### 4.5.1 Teor de sólidos solúveis e rendimento do extrato bruto e frações

O extrato bruto apresentou um rendimento de 2,64% de extrato bruto com um teor de sólidos totais de 0,9%. Os rendimentos das frações estão esquematizados na tabela 5. Foram retiradas 5g de cada fração para as demais análises.

TABELA 5: DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE *P. ensifolium*

	Massa Obtida (g)	Rendimento (%)
<b>Fração Hexano</b>	62,91	1,75
<b>Clorofórmio</b>	103,55	2,88
<b>Acetato de Etila</b>	6,33	0,17
<b>Remanescente</b>	46,49	1,29

Fonte: a autora, 2019

#### 4.6 PESQUISA DE CLASSES DE METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

Os resultados observados pela CCD foram relacionados e descritos (tabela 6), a partir destes foi possível nortear a pesquisa de compostos secundários por cromatografia em coluna, os achados também foram úteis para confirmar os resultados obtidos através do ensaio fitoquímico preliminar e dos achados histoquímicos.

TABELA 6: CLASSES DE METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

Constituinte Químico	EB	HEX	CLO	AE	REM
Esteroides	-	+	-	-	-
Triterpenos	-	+	-	-	-
Flavonoides	-	-	-	+	-
Taninos	-	-	-	+	-
Alcaloides	-	-	+	-	-
Cumarinas	+	+	-	-	-

Nota 1: EB – Extrato HEX - Fração Hexano, CLO - Fração Clorofórmio, AE - Fração Acetato de Etila, REM - Fração Hidroalcolica Remanescente. Nota 2: - reação negativa; + reação fraca, ++ reação moderada, +++ reação forte, ++++ reação intensa.

Fonte: a autora, 2019

A fração hexano foi positiva para a presença de esteroides, triterpenos e cumarinas, o ensaio fitoquímico preliminar também mostrou a presença de esteroides e triterpenos para a fração hexânica. A fração clorofórmio mostrou-se positiva para a presença de alcaloides tanto no *screening* fitoquímico como para as análises por CCD, entretanto a partir dos ensaios preliminares foram observadas também a presença de cumarinas, esteroides e triterpenos. Em relação a fração acetato de etila, além da presença de flavonoides e taninos, o *screening* fitoquímico preliminar foi positivo também para cumarinas. Por fim, a fração remanescente mostrou-se positiva para a presença de alcaloides a partir dos ensaios preliminares, enquanto nenhum grupo de compostos foram identificados na pesquisa por CCD. As variações encontradas nas pesquisas podem estar relacionadas as metodologias empregadas, bem como no tipo de extração realizada, desta forma, salienta-se a importância de empregar métodos

diferentes de pesquisa por compostos metabólicos a fim de complementar os resultados obtidos.

#### 4.7 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

Os resultados obtidos por CCD foram relacionados e descritos (tabela 6), a partir destes, as frações foram submetidas a cromatografia em coluna com o objetivo de identificar e isolar os principais metabólitos secundários.

TABELA 6: CLASSES DE METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

Constituinte Químico	Extrato Bruto	Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de etila	Fração Remanescente
Esteroides	-	+	-	-	-
Triterpenos	-	+	-	-	-
Flavonoides	-	-	-	+	-
Taninos	-	-	-	+	-
Alcaloides	-	-	+	-	-
Cumarinas	+	+	-	-	-

Fonte: a autora, 2019

##### 4.7.1 Fração hexano

Ao fim da coluna foram utilizados 226 frascos. Os quais foram deixados em local arejado para a completa evaporação dos solventes. Após a secagem completa foi possível observar a formação de precipitados, estes foram submetidos a CCD para a classe de esteroides e terpenos, composta por tolueno : acetato de etila (93:7), como revelador foi utilizada vanilina sulfúrica (1%). A caracterização por CCD revelou a presença de cumarinas, entretanto a quantidade se mostrou insuficiente para isolamento e identificação por RMN.

#### 4.7.2 Fração clorofórmio

Ao fim da coluna foram utilizados 256 frascos. Os quais foram deixados em local arejado para a completa evaporação dos solventes. Os frascos que apresentaram aspecto semelhante foram analisados através da CCD para alcaloides, utilizando clorofórmio : MeOH (95:5) em universo amônio, como revelador foi utilizado Dragendorff. A presença de banda de coloração tijolo indicou o teste positivo para a presença das substâncias, entretanto a amostra não foi suficiente para o isolamento do composto.

#### 4.7.3 Fração acetato de etila

Com o objetivo de isolar e identificar compostos, foi realizada uma coluna cromatográfica gravimétrica e sílica em gel como fase estacionária. A partir da evaporação dos solventes utilizados, foi possível observar a presença de precipitados com coloração amarelo-ouro (figura 11) nos frascos 105 - 123.

FIGURA 11: PRECIPITADO OBTIDO A PARTIR DA CROMATOLOGRAFIA EM COLUNA



Fonte: a autora, 2019

O precipitado intitulado PAE032 foi então isolado, solubilizado em DMSO em uma alíquota de 5 mL e encaminhado para análise por ressonância magnética nuclear.

Para a identificação utilizou-se a frequência de 200,13 para o espectro de RMN <sup>1</sup>H e 50.62 espectros de RMN <sup>13</sup>C e DEPT (tabela 7).

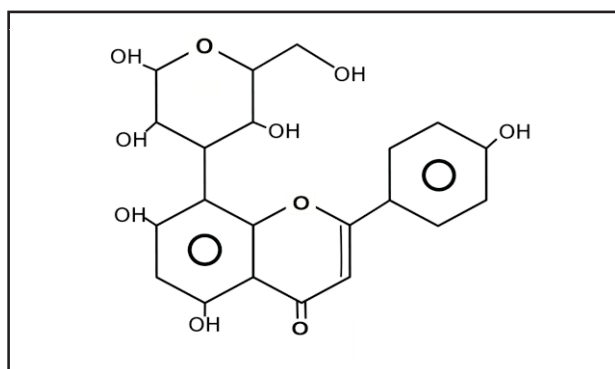
A partir dos resultados da análise o precipitado foi identificado como Apigenina-C-glicosídica, conforme demonstrado na figura 12.

TABELA 7: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO PAE032 EM COMPARAÇÃO COM A APIGENINA

COMPOSTO PAE032		APIGENINA
RMN $^{13}\text{C}$	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$
181,95	8	180,19
163,84	6,88	170,9
162,49	6,74	159,13
161,01	6,26	150,85
160,28	3,25	120,93
155,88	3,27	116,94
128,80	4,7	115,80
121,50	3,84	107,01
115,71	3,29	106,70
102,32	3,75	105,18
92,59	3,54	93,03
81,69	2,5	82,91
78,57	2,08	76,71
70,49		64,82
61,21		62,99

Fonte: a autora, 2020; Amâncio, 2019

Figura 12: ESTRUTURA QUÍMICA DA APIGENINA-C-GLICOSÍDICA



Fonte: a autora, 2020

#### 4.7.3.1 Apigenina-C-glicosídica

Apigenina pertence a classe de flavonoides, compostos que estão naturalmente distribuídos na natureza, onde desenvolvem funções de defesa contra patógenos e atração visual para potenciais polinizadores. Quimicamente possuem um núcleo central com 15 carbonos constituídos por dois anéis benzeno, ligados por uma cadeia de três carbonos e um oxigênio como heteroátomo (SANTOS; RODRIGUES, 2017), os flavonoides são subdivididos em seis classes: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavonóis e antocianinas, podendo de apresentar como agliconas, ácidos metilados e na forma glicosilada como resíduos de açúcar em posições diferentes. A apigenina apresenta-se como um flavonóide da classe das flavonas. (SALEHI et. al., 2019)

Os efeitos terapêuticos da apigenina estão associados a efeitos anti-inflamatórias, anti apoptóticos, atividades citostática e citotóxica para vários tipos de câncer, (SALEHI et. al.,2019; KASHYAP et al., 2018). A apigenina apresenta a capacidade de inibir a atividade da  $\alpha$ -glicosidase e aumentar a secreção de insulina *in vivo*. Estudos em seres humanos estão associados a melhora de quadros de depressão e ansiedade, melhora no sono e redução dos níveis de pressão arterial (PAMUNUWA et al., 2016).

### 4.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO

#### 4.8.1 Atividade tóxica em *Artemia salina*

Os resultados obtidos através do ensaio de *Artemia salina*, foram calculados com o auxílio do software estatístico IBM SPSS®, probitos, a tabela 8 relaciona a taxa de mortalidade encontrada para a cada concentração de amostra. Segundo Meyer (1892) para que a amostra seja caracterizada como tóxica a concentração letal em 50% (CL50) deve ser inferior a  $<1000\mu\text{g/mL}$ . Desta forma as amostras não apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina*.

Tabela 8: TAXA DE MORTALIDADE EM *Artemia salina* FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*

Amostra	Mortalidade / Concentração					CL50 (µg/mL)
	100	350	500	750	1000	
EB	0	2	4	5	5	>1000
FH	0	2	4	2	5	>1000
FC	2	2	4	4	7	>1000
FAE	0	3	4	6	6	>1000
FR	0	3	4	6	7	>1000
Sulfato de Quinidina	13	26	27	29	30	165,43

NOTA: Extrato Bruto (EB), Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Remanescente (FR), Concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>)

Fonte: A autora, 2019

#### 4.8.2 Atividade hemolítica

Os principais resultados obtidos a partir da análise da atividade hemolítica do extrato bruto e frações de *P. ensifolium* estão demonstrados da tabela 9. Observa-se que o extrato bruto na concentração de 250 µg/mL apresentou 40% de atividade hemolítica. A fração acetato de etila demonstrou hemólise em todas as suas concentrações, porém a atividade não foi concentração-dependente. A fração remanescente de 100 µg/mL foi a responsável pelo maior percentual de hemólise entre as amostras. Enquanto as demais amostras avaliadas não apresentaram a capacidade de hemólise.

A liberação de hemoglobina no plasma, ocasionada pela ruptura da membrana eritrocitária pode acarretar danos ao organismo, desta forma, avaliação da capacidade hemolítica da planta é um importante parâmetro a ser observado, visto que auxilia a determinar a ação citotóxica do extrato vegetal (PAZ et al., 2022).

TABELA 9: CAPACIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*

Amostra	Concentração µg/mL	Atividade hemolítica %
Extrato bruto	250	40
Acetato de etila	100	17
	250	19
	500	9
	750	27
	1000	10
Fração remanescente	100	53
	1000	15
Controle		100

Fonte: a autora, 2019

A lise celular pode ser provocada por diversas substâncias vegetais e/ou diferentes combinações destas. Dentre os metabólitos secundários da espécie, a presença de saponinas é um fator indicativo para atividade hemolítica (PAULA, 2004). A presença de compostos fenólicos e flavonoides também demonstram relação com atividade hemolítica, sendo que as diferentes concentrações podem exercer fator protetor ou pró-hemolítico (FREIRE, 2020)

Bastos et. al., (2017) não encontram atividade hemolítica em *Phoradendron mucronatum*, já Martinez et. al., (2013) observaram resposta hemolítica em *Phoradendron bathoryctum* apenas em altas concentrações da planta, quanto submetidas a baixas concentrações não foi identificado hemólise.

#### 4.8.3 Atividade alelopática

A alelopatia pode ser entendida como a interação planta-planta, causada por substâncias produzidas pelos vegetais, como resultado é possível observar resultados benéficos e/ou maléficos. As plantas podem liberar compostos químicos de quatro maneiras: decomposição, lixiviação, volatilização e exsudação radicular (RIZVI & RIZVI, 1992; BARROSO & MURATA, 2021). A ação dos aleloquímicos liberados pode resultar em modificações específicas, como alteração na estrutura e transporte das membranas, alterações morfológicas, interferência no ciclo celular, alterações no balanço hídrico, entre outras (EINHELLIG, 2002).

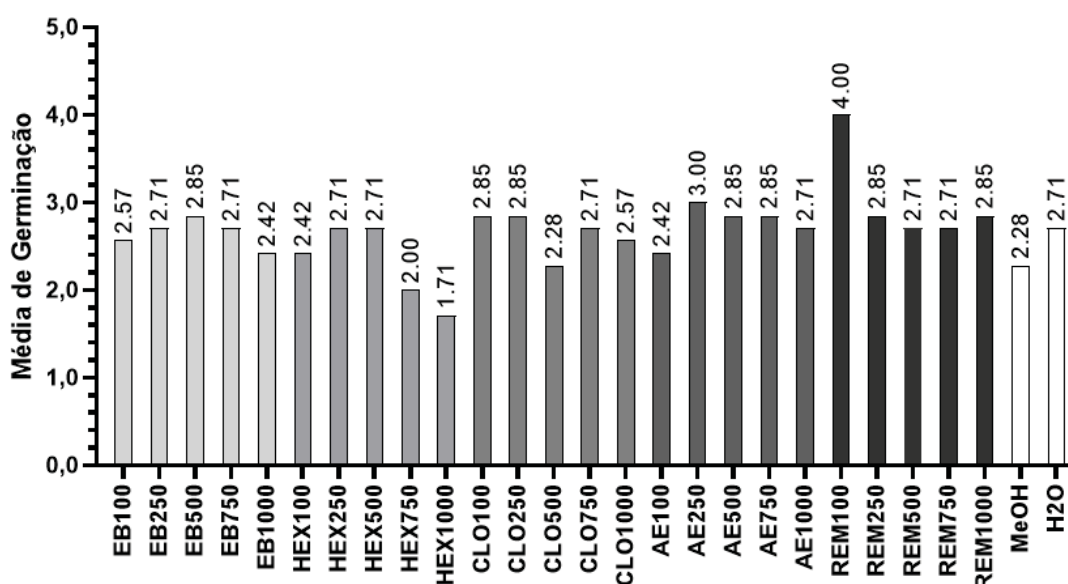
A ação alelopática das espécies vegetais constitui um campo que demanda atenção e busca por novos saberes uma vez que as interações planta-planta não são completamente elucidadas.

A avaliação da atividade alelopática de *P. ensifolium* é um importante parâmetro a ser observado, considerando o hábito parasitário que a planta apresenta. Desta forma, a planta exerce naturalmente uma interferência na planta hospedeira. A partir destas informações, foi avaliada a atividade alelopática desenvolvida pelo extrato bruto e frações em relação às sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* para a velocidade de germinação, crescimento do hipocótilo e radícula.

#### 4.8.3.1 Avaliação da atividade alelopática em *Lactuca sativa*

Em relação à média aritmética de germinação, foi possível observar que as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila apresentaram influência no padrão de crescimento das sementes quando comparadas ao controle positivo (H<sub>2</sub>O), as interferências resultaram tanto em crescimento abaixo da registrado para os controles, como crescimento acima, os dados estão demonstrados na figura 13. De modo geral, o processo germinativo tem se mostrado menos sensível ao efeito alelopático, uma vez que as sementes possuem maior resistência aos fatores ambientais (DORNELES et al., 2015), entretanto alterações ocorridas na germinação podem estar relacionadas a interferências em diversas etapas do processo (SOUZA et al., 2005; CANSIAN et al., 2013). Tendo em vista o sinergismo exercido pelos compostos químicos podemos observar tanto o estímulo quanto a inibição das atividades de germinação nas sementes de *L. sativa* quando expostas as frações de *P. ensifolium*.

FIGURA 13: MÉDIA ARITMÉTICA DE GERMINAÇÃO DE *L. sativa* FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*

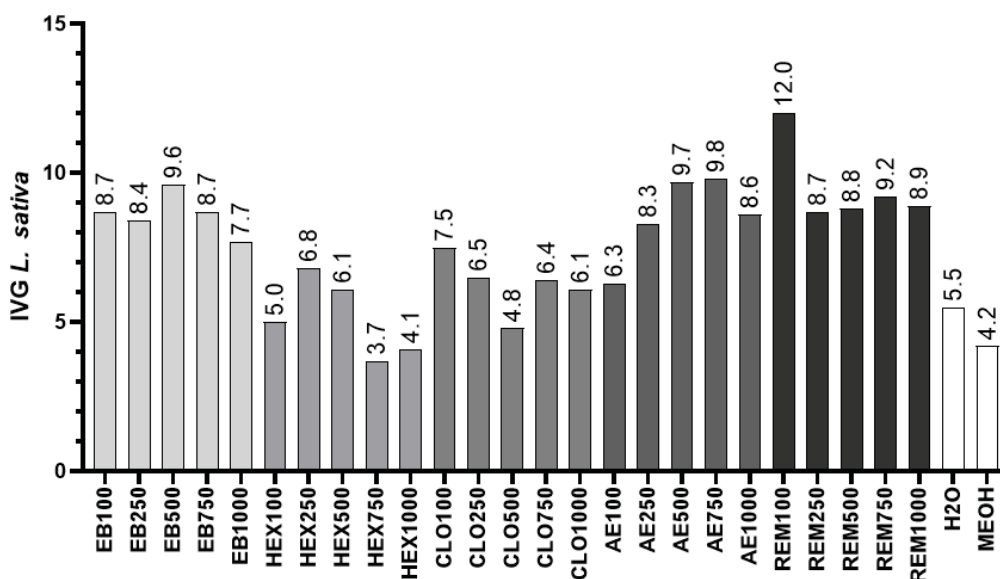


Nota: EB – Extrato Bruto, HEX – Fração Hexano, CLO – Fração Clorofórmio, AE – Fração Acetato de Etila, REM – Fração Remanescente, MeOH – Metanol, H<sub>2</sub>O – Água  
 Fonte: a autora, 2020

O índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *L. sativa* sofreu estímulo positivo frente ao extrato bruto, FAE e FREM (figura 14). O aumento do índice de germinação pode estar associado a alterações na velocidade das reações químicas, resultando em importantes modificações no padrão germinativo (MERINO et al., 2018).

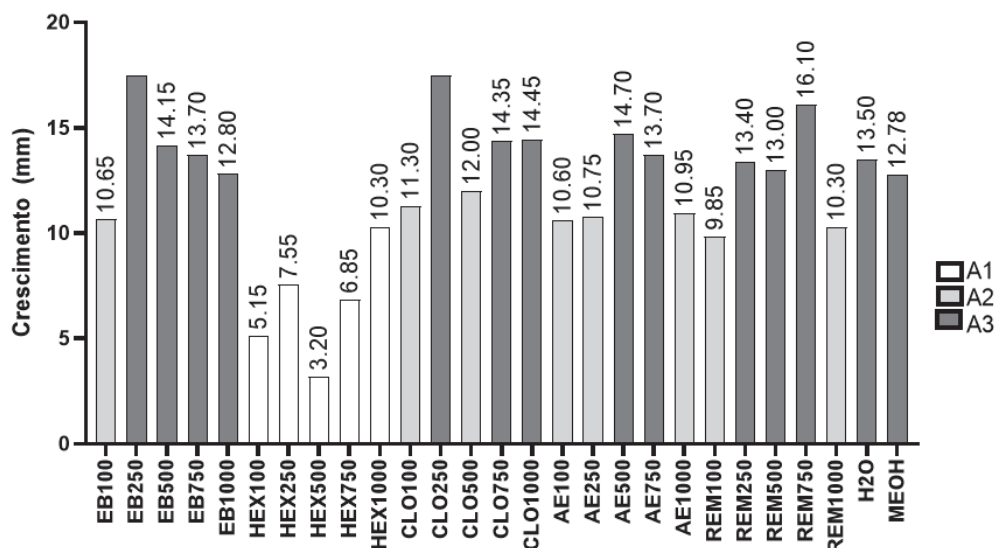
O crescimento do hipocótilo sofreu uma expressiva inibição para todas as concentrações da fração hexano, o que evidencia uma forte ação alelopática para esta fração. Um efeito alelopático menos acentuado foi observado para o extrato bruto (100µg/mL), e frações clorofórmio (100 e 500µg/mL), acetato de etila (100, 250 e 1000µg/mL) e remanescente (100 e 1000µg/mL). Tendo em vista que a ação alelopática é mediada pelo conjunto de constituintes químicos, não é possível indicar o grupamento diretamente envolvido nas reações de inibição, entretanto observa-se que as reações de crescimento e/ou desenvolvimento das partes aéreas apresentaram maior interferência quando comparadas à germinação (figura 15).

FIGURA 14: ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *L. sativa* FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*



Nota: EB – Extrato Bruto, HEX – Fração Hexano, CLO – Fração Clorofórmio, AE – Fração Acetato de Etila, REM – Fração Remanescente, MeOH – Metanol, H<sub>2</sub>O – Água  
Fonte: a autora, 2020

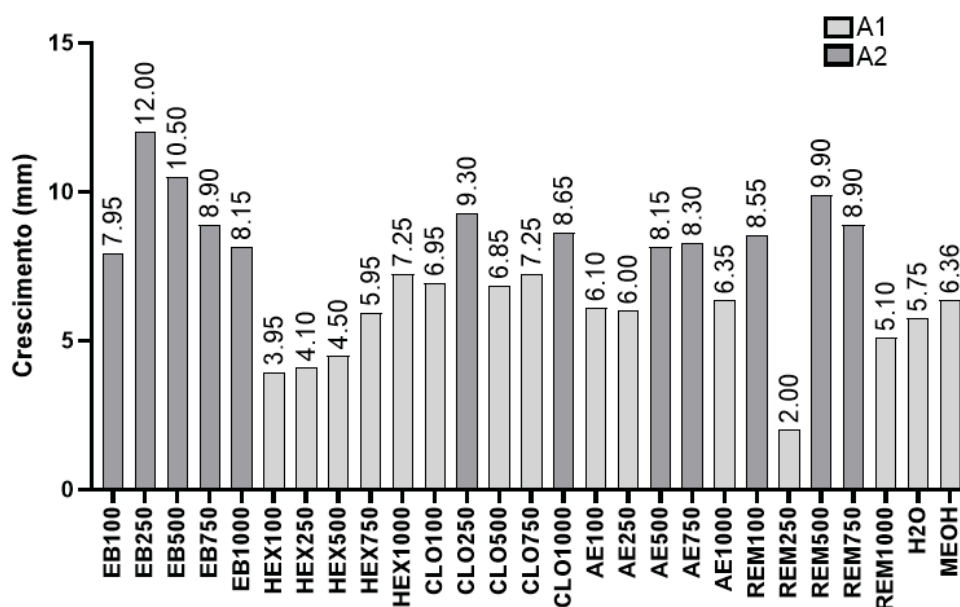
FIGURA 15: CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *L. sativa* FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*



Nota: (1) EB – Extrato Bruto, HEX – Fração Hexano, CLO – Fração Clorofórmio, AE – Fração Acetato de Etila, REM – Fração Remanescente, MeOH – Metanol, H<sub>2</sub>O – Água  
(2) Barras com a mesma cor não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ), classificadas em três grupos estatísticos distintos A1, A2 e A3  
Fonte: a autora, 2020

A porção radicular tem se mostrado mais sensível à presença de compostos químicos, uma vez que permanece em contato com os extratos por mais tempo, como principais anormalidades é possível citar o surgimento de raízes primárias atrofiadas, defeituosas e/ou ausentes (BORELLA & PASTORINI, 2009). No presente ensaio, como resultado à exposição das sementes de *L. sativa* ao extrato bruto e frações de *P. ensifolium* as radículas apresentaram alterações no padrão de desenvolvimento. As frações hexano (em todas as suas concentrações), clorofórmio (500 e 750µg/mL), acetato de etila (100, 250 e 1000µg/mL) e remanescente (250 e 1000µg/mL) tiveram efeito sobre o crescimento radicular estatisticamente semelhante aos controles positivos, enquanto as demais frações estimularam o crescimento (figura 16).

FIGURA 16: CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *L. sativa* FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*



Nota: (1) EB – Nota: Extrato Bruto, HEX – Fração Hexano, CLO – Fração Clorofórmio, AE – Fração Acetato de Etila, REM – Fração Remanescente, MeOH – Metanol, H<sub>2</sub>O – Água

(2) Barras com a mesma cor não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ), classificadas em três grupos estatísticos distintos A1 e A2

Fonte: a autora, 2020

A interação entre os constituintes químicos e a planta podem resultar em ação alelopática de inibição ou estímulo do desenvolvimento, conforme observado no ensaio com sementes de *L. sativa*, uma vez que houve inibição do crescimento do

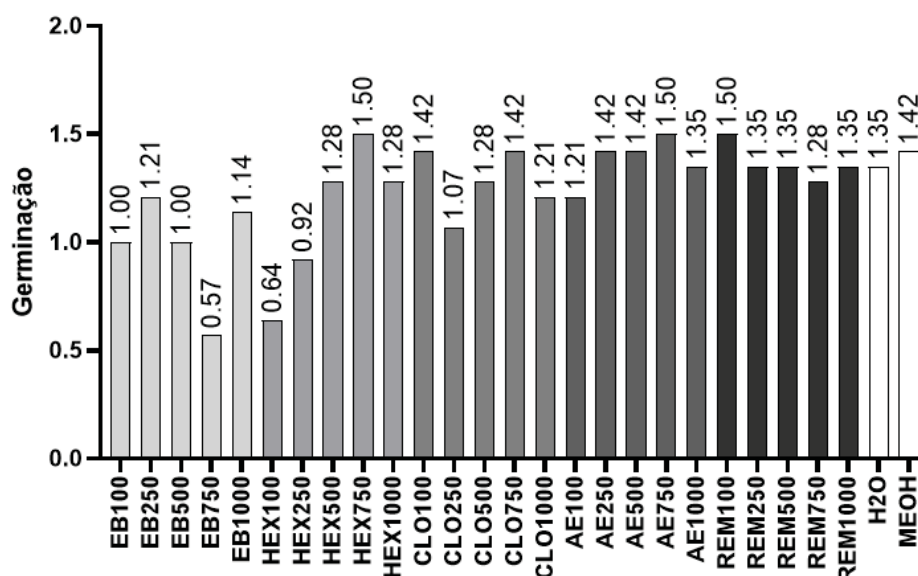
hipocótilo e estímulo do crescimento da radícula. Por se tratar de uma planta hemiparasita, *P. ensifolium* possui a capacidade de fotossíntese, entretanto extrai água e nutrientes da planta hospedeira, desta forma, a planta apresenta um convívio competitivo com as demais plantas e convém que o crescimento da radícula seja estimulado para estabelecer a relação de hemiparasitismo (BARROSO & MURATA, 2021).

#### 4.8.3.2 Avaliação da atividade alelopática em *Allium cepa*

A ação aleloquímica ocorre naturalmente entre as espécies, porém envolve um complexo mecanismo de interação visto que o ambiente apresenta diversas interposições. Desta forma, a variação de concentração de compostos químicos como taninos, glicosídeos, alcaloides, flavonoides e compostos fenólicos será um fator determinante para o tipo de relação que irá se estabelecer (DORNELES et al., 2015; PAULA et al., 2014). Portanto, para observação do potencial alelopático de *P. ensifolium* também foram utilizadas sementes de *Allium cepa*. Quando analisadas em relação à média aritmética de germinação frente ao extrato bruto e frações, foi possível observar que todas as frações exerceram ação de inibição da germinação, sendo mais evidente para extrato bruto (750 µg/mL) e a fração hexano (100 µg/mL), conforme demonstrado na figura 17. Apesar de ser menos sensível, a germinação é um importante parâmetro observado, alterações neste processo podem estar associadas à respiração das raízes (PAULA et al., 2014).

A dispersão do padrão germinativo das sementes frente ao extrato bruto e frações de *P. ensifolium* pode estar relacionada ao processo de dormência, uma das estratégias de sobrevivência de plantas daninhas. Desta forma, a germinação das sementes ocorre quando os fatores biológicos para o estabelecimento da planta são favoráveis. O conhecimento do padrão de germinação é fundamental para a compreensão do mecanismo de estabelecimento da planta (SILVA et al., 2007).

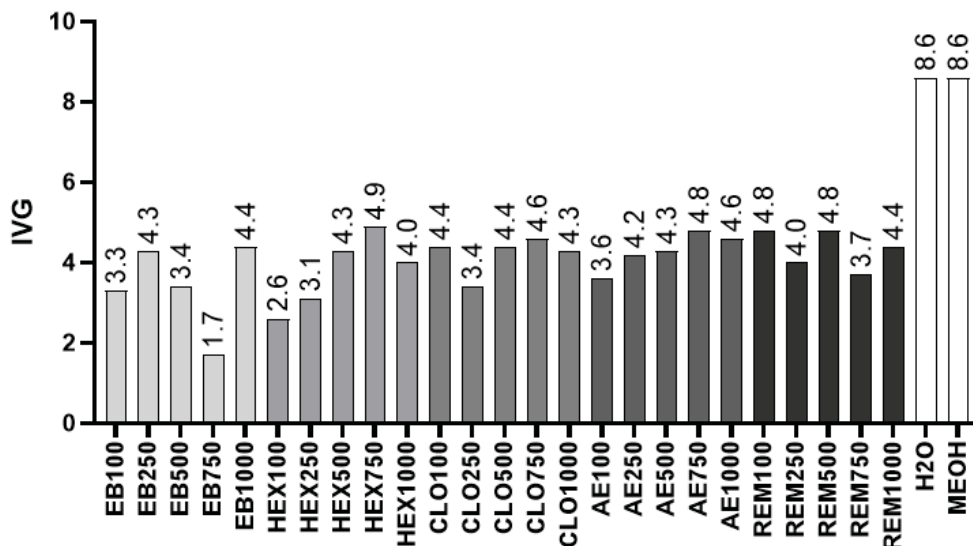
FIGURA 17: MÉDIA ARITMÉTICA DE GERMINAÇÃO DE *A. cepa* FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*



Nota: EB – Extrato Bruto, HEX – Fração Hexano, CLO – Fração Clorofórmio, AE – Fração Acetato de Etila, REM – Fração Remanescente, MeOH – Metanol, H<sub>2</sub>O – Água  
 Fonte: a autora, 2020

A avaliação do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes revelou que todas as concentrações do extrato bruto e as frações inibiram o processo de maneira significativa quando comparadas ao controle positivo, os resultados são apresentados na figura 18. Desta forma, é possível observar que apesar de não impedir a germinação das sementes, houve uma importante diminuição na velocidade de germinação, indicando ação alelopática da planta. Tais efeitos podem estar associados ao sinergismo dos metabólitos secundários de *P. ensifolium*, visto que a presença de flavonas, saponinas e taninos podem resultar em efeitos alelopáticos (RICE, 1984; RICE, 1992).

FIGURA 18: ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *A. cepa* FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*

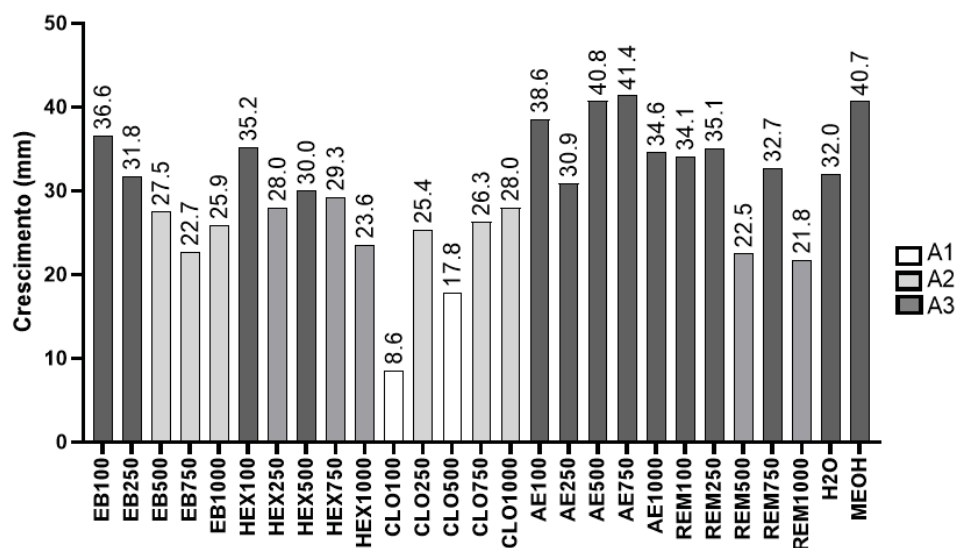


Nota: EB – Extrato Bruto, HEX – Fração Hexano, CLO – Fração Clorofórmio, AE – Fração Acetato de Etila, REM – Fração Remanescente, MeOH – Metanol, H<sub>2</sub>O – Água  
 Fonte: a autora, 2020

Quanto ao crescimento do hipocótilo, conforme apresentado na figura 19, a fração clorofórmio (100 e 500µg/mL) e a fração remanescente (1000µg/mL) mostraram uma maior inibição de crescimento. O extrato bruto (500, 1000µg/mL), frações hexano (250, 750, 1000µg/mL), clorofórmio (250, 750, 1000µg/mL) e remanescente (500, 1000µg/mL) também apresentaram ação inibitória para o crescimento do hipocótilo, entretanto estatisticamente menor. O uso de *A. cepa* em testes de toxicidade é um importante bioindicador, apresentando baixo custo e confiabilidade (FURINI et al., 2020).

Para o crescimento da radícula, demonstrado na figura 20, observa-se que extrato bruto e frações em todas as suas concentrações inibiram o crescimento das estruturas. A inibição foi apresentada em três proporções. As frações acetato de etila (100, 250 e 500 µg/mL) apresentaram menor ação inibitória, seguida pelo extrato bruto (100, 250 e 750 µg/mL), frações hexano (100, 750 e 1000 µg/mL), acetato de etila (750, 1000 µg/mL), remanescente (250, 500 e 750 µg/mL). Desta forma, o extrato bruto (500, 1000 µg/mL), clorofórmio (100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL) e remanescente (1000 µg/mL) apresentaram ação inibitória mais significativa.

FIGURA 19: CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *A. cepa* FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*

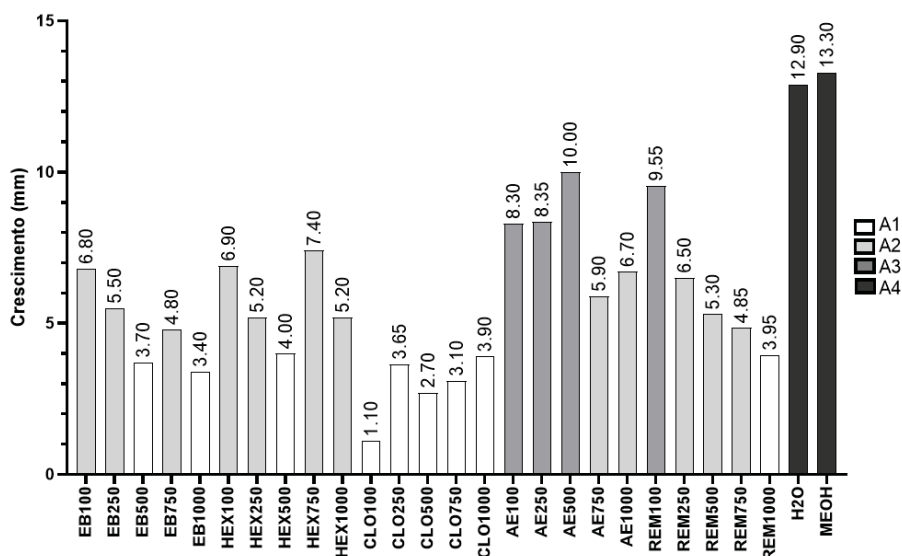


Nota: (1) EB – Extrato Bruto, HEX – Fração Hexano, CLO – Fração Clorofórmio, AE – Fração Acetato de Etila, REM – Fração Remanescente, MeOH – Metanol, H<sub>2</sub>O – Água

(2) Barras com a mesma cor não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ), classificadas em três grupos estatísticos distintos A1, A2 e A3

Fonte: a autora, 2020

FIGURA 20: CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *A. cepa* FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. ensifolium*



Nota: (1) EB – Extrato Bruto, HEX – Fração Hexano, CLO – Fração Clorofórmio, AE – Fração Acetato de Etila, REM – Fração Remanescente, MeOH – Metanol, H<sub>2</sub>O – Água

(2) Barras com a mesma cor não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ), classificadas em três grupos estatísticos distintos A1, A2, A3 e A4

Fonte: a autora, 2020

A ação alelopática das plantas consiste em uma área que demanda atenção e busca por novos saberes, visto que todas as interações não são completamente elucidadas. Furlan et al., (2019) em seu estudo sobre a interação entre *Phoradendron perrotteti* e *Tapirira guianensis* observou que ao realizar atividade hemiparasitária *P. perrotteti* apresentou altos níveis de flavonoides, importantes durante o estabelecimento da planta, em contra partida, os tecidos parasitados apresentaram diminuição dos teores de taninos quando comparado aos tecidos saudáveis.

*P. ensifolium* demonstrou uma importante alelopatia frente a sementes monocotiledôneas e dicotiledôneas, o que pode estar associado a presença de alcaloides, flavonoides, taninos e compostos fenólicos na composição da espécie. Entretanto apesar dos ensaios fitoquímicos evidenciarem a presença dos compostos nas amostras analisadas, não é possível atribuir a ação alelopática a um único composto. Desta forma, a alelopatia pode ser entendida como uma complexa interação entre os aleloquímicos, podendo resultar no estímulo ou inibição das estruturas vegetais envolvidas. Espécies que apresentam ação alelopática podem ser caracterizadas como potenciais precursores de substâncias de interesse farmacêutico, agrícola e industrial (CANSIAN et al., 2013; PAULA et al., 2014; b).

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE *P. ensifolium*

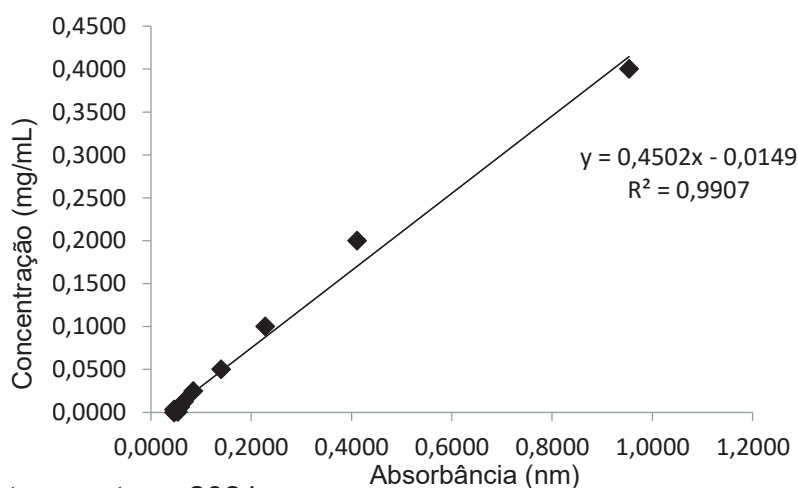
Considerando os resultados obtidos a partir das atividades biológicas de *Phoradendron ensifolium*, e com vistas a elucidar as potencialidades da planta, para o delineamento do perfil antioxidante da planta, foram utilizados extrato bruto e frações das folhas e caules, e extrato bruto e frações do fruto.

##### 4.9.1 Determinação do teor de fenólicos totais

Para os fenólicos totais a fração acetato de etila folha (0,573 mg/mL), acetato de etila fruto (0,420 mg/mL) e remanescente fruto (0,537 mg/mL) foram as amostras que apresentaram os maiores resultados para a ação antioxidante. A curva de doseamento de compostos fenólicos de *P. ensifolium* frente ao ácido gálico está demonstrada na figura 21.

Os dados encontrados a partir do teor de compostos fenólicos vem de encontro com os dados previamente encontrados a partir da morfoanatomia de folhas e frutos, ensaio fitoquímico preliminar e CCD. Os resultados também podem estar associados a atividade alelopática observada para as sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*.

FIGURA 21: CURVA DE DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS FRENTE AO ÁCIDO GÁLICO



Fonte: a autora, 2021

A presença de compostos fenólicos nos frutos de *P. ensifolium* pode estar relacionada a perpetuação da espécie, uma vez que pode servir como um atrativo para as aves que dispersam suas sementes nas copas das árvores. Dado semelhante foi encontrado por Rojas et al., (2021) que investigaram a associação entre o hábito alimentar de pássaros com a composição dos frutos escolhidos, e observaram que os frutos de *P. ensifolium* estão entre os preferidos da espécie *Thraupis sayaca* (sanhaçu-cinzento), segundo a pesquisa desenvolvida, a escolha está correlacionada ao teor de fenólicos e carboidratos não estruturais, bom como o tamanho do fruto e tamanho da semente. Estes fatores favorecem a propagação de *P. ensifolium* nas regiões em que *T. sayaca* está distribuído.

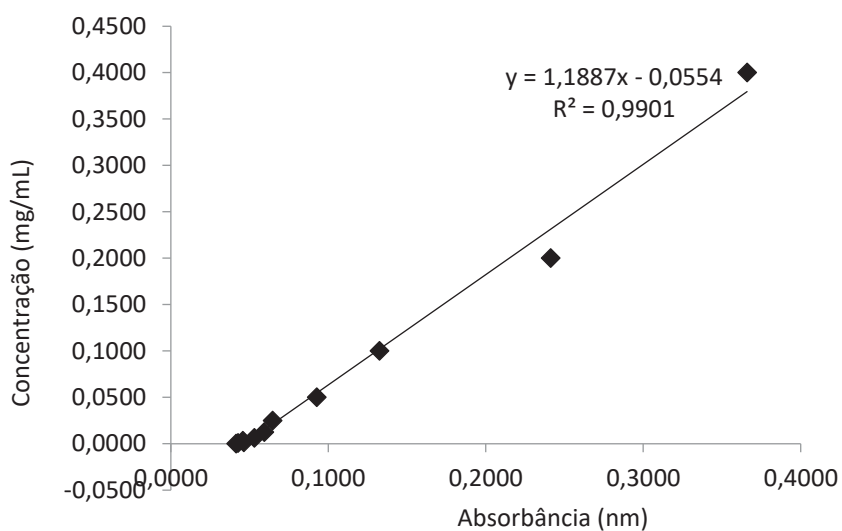
#### 4.9.2 Determinação do teor de flavonoides totais

Os flavonoides são uma classe de compostos que apresentam uma grande variedade estrutural, podendo formar complexos com açúcares, lipídeos, aminas e

ácidos carboxílicos (FLAMBÓ, 2013). Estudos indicam que essa classe de compostos naturalmente presentes nos vegetais podem desempenhar atividades antioxidantes, anti-carcinogênicas, antimicrobianas, antifúngicas e antiparasitária (SILVA et al., 2020).

Quanto ao teor de flavonoides totais encontrados em *P. ensifolium* a fração acetato de etila folha (0,660 mg/mL) e acetato de etila fruto (0,865 mg/mL) demonstraram as maiores atividades quando comparadas as demais amostras. Os resultados estão descritos a partir da curva padrão da catequina (figura 22).

FIGURA 22: CURVA DE DOSEAMENTO FLAVONOIDES FRENTE A CATEQUINA



Fonte: a autora, 2021

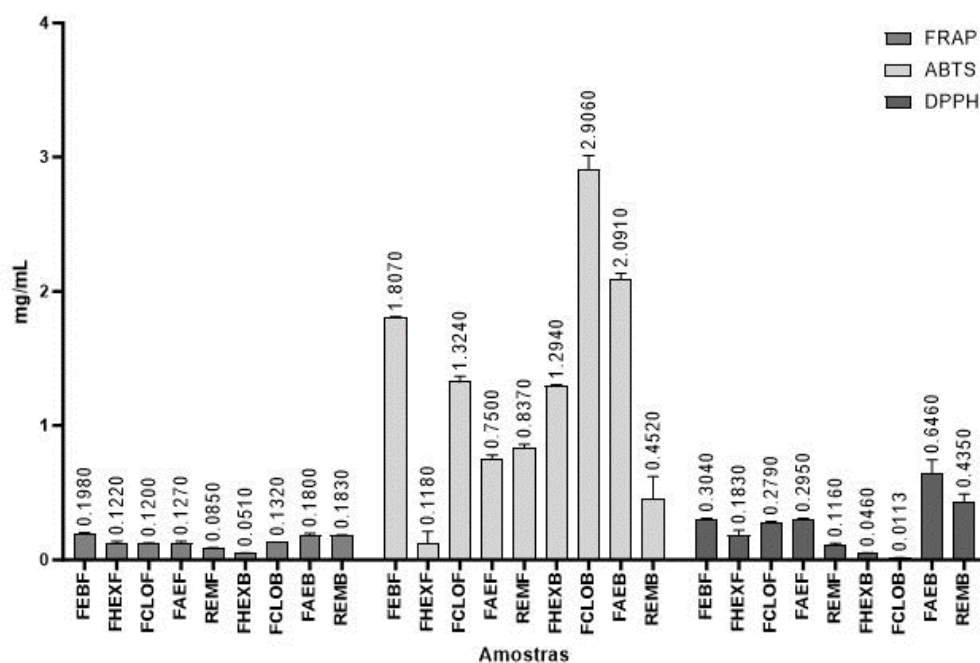
Os resultados obtidos corroboram com os ensaios previamente conduzidos, tendo em vista o isolamento do composto apigenina-C-glicosídica na fração acetato de etila das folhas, caules e frutos.

Iloki-Assanga et al., (2015) realizou um comparativo entre os teores de fenólicos e flavonoides obtidos para *P. californicum* a partir da extração com diferentes solventes, como resultado, os autores observam maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides para os extratos metanólicos quando comparados aos extratos alcóolicos.

#### 4.9.3 Propriedade antioxidante

O perfil antioxidante de *P. ensifolium* foi estabelecido a partir dos ensaios para ABTS, FRAP e DPPH. Para a execução dos experimentos a fração acetato de etila fruto e remanescente fruto, demandaram uma maior diluição, respectivamente, 5,3 mg/mL e 4,6 mg/mL, o que em um primeiro momento evidencia o potencial antioxidante das frações. Para as demais amostras as diluições foram semelhantes, em torno de 24 mg/mL. Os resultados das propriedades antioxidantes serão discutidos concomitantemente visto que os dados colaboram entre si, a figura 23.

FIGURA 23: PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E FRUTOS DE *P. ensifolium*



Nota: EBF – Extrato Bruto Folha, HEXF – Fração Hexano Folha, FCLOF Fração Clorofórmio Folha, FAEF – Fração Acetato de Etila Folha, REMF – Remanescente Folha, FHEXB – Fração Hexano Fruto, FCLOB, Fração Clorofórmio Fruto, FAEB – Fração Acetato de Etila Fruto, REMB – Remanescente Fruto, FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power, ABTS - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), DPPH - ,2 – difenil – 1-picril – hidrazila  
 Fonte: a autora, 2021

De modo geral é possível observar que todas as amostras testadas apresentaram atividade antioxidante. Entretanto as amostras do fruto demonstram

atividade superior para todos os testes. Dentre as amostras do fruto as frações acetato de etila e remanescente tiveram as maiores atividades antioxidantes.

Os resultados obtidos para o teste FRAP mostrou uma maior atividade antioxidante no extrato bruto de folhas (0,198 mg/mL), acetato de etila fruto (0,180 mg/mL) e remanescente fruto (0,183 mg/mL), quando comparados as demais amostras.

Em relação ao ensaio ABTS a fração clorofórmio fruto (2,906 mg/mL) e acetato de etila fruto (2,091 mg/mL) apresentaram maiores teores de atividade antioxidante frente ao radical.

Frente ao radical livre DPPH podemos salientar as atividades apresentadas pelas frações acetato de etila fruto (646 mg/mL) e remanescente fruto (0,435 mg/mL).

Os resultados encontrados por Wang et. al., (2017), corroboram com os resultados dos ensaios, em sua pesquisa utilizando extrato metanólico 70% de folhas de *Phoradendron* sp. foi observado uma importante atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e ABTS. Jimenez-Strada et al., (2013) também observaram atividade antioxidante frente os ensaios DPPH, FRAP e ABTS para *P. Californicum*.

Apesar do gênero *Phoradendron* ser amplamente estudado em relação ao seu hábito de vida e características botânicas, e os estudos sobre sua composição fitoquímica ainda serem escassos, os relatos demonstram uma importante atividade antioxidante para o gênero. Cabe ressaltar que as condições do meio, bem como a planta hospedeira pode estar diretamente relacionadas as propriedades antioxidantes desenvolvidas pela planta.

Considerando os ensaios realizados foi possível observar uma importante atividade antioxidante da fração acetato de etila fruto e remanescente fruto de *P. ensifolium*. Estes resultados corroboram com os achados pela CCD, corroboram ainda com a atividade antioxidante atribuída a flavona apigenina. Desta forma os resultados obtidos constituem um importante campo de pesquisa a ser explorado, tanto para o isolamento de substâncias, quanto para a avaliação das atividades terapêuticas de *P. ensifolium*.

#### 4.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A partir dos resultados obtidos para os teores de compostos fenólicos, flavonoides e propriedades antioxidantes das frações acetato de etila e fração remanescente do fruto, optou-se por seguir com os ensaios microbiológicos apenas para as frações do fruto. Os flavonoides constituem-se como uma classe de compostos amplamente estudados devido a suas propriedades terapêuticas. As atividades antimicrobianas dos flavonoides estão associadas à sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana e parede celular, inibição da síntese de ácidos nucleicos e neutralização dos fatores de virulência (SILVA et al., 2020).

Após o período de 24h da inoculação das bactérias, foi possível observar a olho nu a presença de turbidez nos poços das placas, indicando desta forma o crescimento microbiano. Desta forma, as frações do fruto de *P. ensifolium* não demonstraram atividade antimicrobiana.

Os achados do teste corroboram com Bastos et. al. (2015) ao não encontrar atividade antimicrobiana nas espécies *P. mucronatum* (DC.) Krug & Urb. e *Phoradendron microphyllum* (Pohl ex DC.). Grahan (2003) descreveu atividade antimicrobiana para *P. piperoides*, ao observar a capacidade de menos de 50% de inibição para *Mycobacterium tuberculosis* em cultura radiométrica, para este ensaio foram utilizados extrato diclorometado da planta inteira.

É importante observar que as atividades biológicas e terapêuticas atribuídas aos extratos está diretamente relacionada ao tipo de solvente e de extração empregada na amostra para tornar os compostos biodisponíveis (RIEDER, 2021).

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir desta pesquisa, contribuem para a caracterização de uma planta da biodiversidade brasileira, além de incentivar pesquisas futuras para completa elucidação e aplicabilidade da espécie.

A morfoanatomia do vegetal demonstrou uma importante bainha cutinizada em toda a extensão foliar, a presença de estômatos paracíticos em ambas as faces foliares.

Os testes histoquímicos revelaram a presença de compostos fenólicos e lipídeos nas folhas e frutos, o que foi confirmado com os testes fitoquímicos.

O screening fitoquímico indicou a presença de alcaloides, heterosídeos flavônicos, cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, esteroides e triterpenos no extrato hidroalcolico. O extrato aquoso apresentou heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, taninos, grupamentos amino e ácidos.

A avaliação da atividade termogravimétrica indicou que a extração química realizada por soxhlet é segura para manter a integridade dos compostos metabólitos secundários da espécie. Os achados corroboram com o teor de umidade e cinzas obtidos a partir da metodologia farmacopeica.

Em relação a atividade biológica *in vitro* o teste frente ao microcrustáceo *Artemia salina* não indicou ação tóxica.

Atividade hemolítica foi observada em frações do extrato bruto, fração acetato de etila e fração remanescente. O que pode ser provocada por diferentes combinações de compostos químicos, principalmente na presença de saponinas.

Já em relação a atividade alelopática, o extrato bruto e frações mostraram alterações no padrão de crescimento do hipocótilo e radícula de sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. A ação de inibição observada em sementes de *A. cepa* incentiva novos estudos em relação a um potencial ação antitumoral.

As frações acetato de etila fruto e remanescente hidroalcolico fruto apresentaram elevado teor de compostos fenólicos e flavonoides. Ambas frações demonstraram importante propriedade antioxidante frente o radical DPPH, ABTS e FRAP.

As frações do fruto não demonstraram atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos a partir da pesquisa contribuem para a caracterização de uma planta da biodiversidade brasileira

O potencial biológico da espécie motiva futuras pesquisas para a elucidação completa dos metabólitos secundários e a busca por novas aplicabilidades para a espécie.

## 6 REFERÊNCIAS

- AMÂNCIO, E. A. M.; Estudo Fitoquímico de Extratos etanólico de espécies do gênero Jacaranda (Bignoniaceae) ocorrentes no estado de Minas Gerais e avaliação da atividade citotóxica. Dissertação de mestrato. **Universidade Federal De Ouro Preto**. 2019.
- ARAÚJO, A. A. de S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 269-276, 2006.
- ASSANGA, S. B. I.; LUJÁN, L. M. L.; RUIZ, J. C. G.; MCCARTY, M. F.; COTA-ARCE; J. M., ESPINOZA, C. L. L., SALIDO; A. A. G.; ÂNGULO, D. F. Comparative analysis of phenolic content and antioxidant power between parasitic *Phoradendron californicum* (toji) and their hosts from Sonoram desert. *Results in Chemistry*. 2020.
- BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-biological Interactions**, Amsterdam, v. 174, n. 2, p. 134-139, 2008.
- BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. Matologia. Estudos Sobre Plantas Daninhas. **Fábrica da Palavra**. p. 21-26. 2021
- BASTOS, I.V.G.A. et al., Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of *Phoradendron mucronatum* and *Phoradendron microphyllum* (Viscaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2017.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v.1, 1976.
- BENZIE, I.; STRAIN, J. A. Capacidade Redutora Férrica do Plasma (FRAP) como uma Medida do “Poder Antioxidante: O Ensaio FRAP”. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76. 1996.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.
- BIAZOTTO, K. R.; MESQUITA, L. M. S.; NEVES, B. V.; BRAGA, A. R. C.; TANGERINA, M. M. P.; VILEGAS, W.; MERCADANTE, A. Z.; ROSSO, V. V. Frutas da Biodiversidade Brasileira: Descoberta de Compostos Bioativos de Fontes Pouco Exploradas. **J. Agric. Química Alimentar**, v. 67, n. 7, p. 1860-1876, 2019.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVÉLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. V. 28, n. 1, p. 25 -30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, vol. 1, 6. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, vol. 2, 6. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ACS, 2009c.

CAIRES, C.S.; DETTKE, G. A. Loranthaceae, **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v. 2, p. 1172-1177, 2010.

CANEVAROLO JR., S. V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. São Paulo: **Artliber**, p. 448 2003.

CANSIAN, F. C.; LIMA, C. P.; ZORTÉ, A, F. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; Potencial alelopático de *Tynanthus micranthus* Corr. Mello ex. Schum. (Bignoniaceae) sobre diásporos de *Lactuca sativa* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.1, p.137-140, 2013.

CHON, S. U.; JANG, H. G.; KIM, D. K.; KIM, Y. M.; BOO, H. O.; KIM, Y. J. Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 309-317, 2005.

COCKERILL, R. F. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard: M07-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. v.32 n. 5, p. 1-88, 2012.

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

DETTKE, G. A. Taxonomia das Ervas-de-Passarinho na região Sul do Brasil: Loranthaceae, Santalaceae, Viscaceae. Tese de doutorado. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2013.

DETTKE, G. A.; WAECHTER, J. L. Estudo taxonômico das ervas de passarinho da Região Sul do Brasil: II. Viscaceae (Phoradendron). **Rodriguésia**. v. 65, 2014.

DETTKE, G. A.; CAIRES, C. S. Synopsis of *Dendrophthora* Eichler and *Phoradendron* Nutt. (Santalaceae) in Brazil. **Rodriguésia**, 2021.

DETTKE, G. A.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Morfoanatomia caulinar de seis espécies de *Phoradendron* Nutt (Viscaceae), **Rev. Biol. Neotrop**. v. 6, n. 1, p. 25-34, 2009.

DIAS, J. F. G.; CÍRIO, G. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Contribution to the allelopathic study of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 220-223, 2005.

DORNELES, K.; POZZEBON, B. C.; ETHUR, L. Z.; ZEIST, A. R. Efeito alelopático de extrato de plantas medicinais e condimentares na germinação e no crescimento inicial do meloeiro. **Ciência e Natura**. v.37, n. 2, p. 212 – 217, 2015.

EINHELLIG, F.A. The physiology of allelochemical action: Clues and views. In: REIGOSA, M.; PEDROL, N. Allelopathy from Molecules to Ecosystems. **Vigo: Universidade de Vigo**, p.1-23, 2002

FURINI, T., FURINI; S. C. S., BARROS; J. O., DOMINGUE; S. C. O., KARSBURG, I. V. Alelopatia e genotoxicidade da erva de Santa Maria sobre sementes *Lactuca sativa*. e raízes *Allium cepa* L. **South American Journal of Basic Education**, Technical and Technological, v. 7, n. 2, p. 105-116, 2020.

FURLAN, C. M.; et al., Does *Phoradendron perrottetti* (mistletoe) alter polyphenols levels of *Tapirira guianensis* (host plant)? **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 136. p. 222-229. 2019.

GRAHAM JG, et al., Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. **Phytomedicine**. v. 10, n. 6-7, p. 528-35, 2003.

GUIMARÃES, A. C. Aspectos Etnobotânicos e Químicos das Famílias Loranthaceae e Viscaceae: Potencialidades Terapêuticas das "Ervas-de-Passarinho". **Revista Fitos**. n. 1, v. 2, p. 27-47, 2006.

INDRIOKO, S.; RATNANINGRUM, Y. W. N. Habitat Loss Caused Clonality, Genetic Diversity Reduction and Reproductive Failure in *Santalum Album* (Santalaceae), an Endangered Endemic Species of Indonesia. **Procedia Environmental Sciences**. v. 28, p. 657-644, 2015.

JÄGER, T.; HOLANDINO, C.; MELO, M. N. O; PENALOZA, E. M. C; OLIVEIRA, A. P; GARRETT, R.; GLAUSER, G.; GRAZI, M.; RAMM, H.; URECH, K.; BAUMGARTNER, S. Metabolômica por UHPLC-Q-TOF revela variação fitoquímica dependente de árvore hospedeira em *Viscum album* L. **Plants**. v. 10 n. 8, 2021.

JIA, Z. S.; TANG, M. C; WU, J. M. A determinação do conteúdo de flavonóides na amoreira e seus efeitos de eliminação nos radicais superóxidos. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; VELÁZQUEZ-CONTRERAS, C.; GARIBAY-ESCOBAR, A. et al. Atividade antioxidante e antiproliferativa in vitro de plantas da etnofarmacopéia do noroeste do México. **BMC Complemento Alternativo Med**. V. 13 , n. 12, 2013.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940  
KASHYAP, D. et al., Apigenin: A natural bioactive flavone-type molecule with promising therapeutic function. **Journal of Functional Foods**. v. 48, p. 457-471, 2018.

KUIJT, J.; HANSEN, B. The Families and Genera of Vascular Plants. **Ed. Springer**. v. 12, p. 35 – 37, 2015.

LORENSI, C. A.; PASSAMANI, B. R.; PONCE, M. M.; ETHUR L. Z. Alelopatia de extratos vegetais na germinação e crescimento inicial do tomateiro. **Enciclopédia Biosfera**. v. 14 , n. 25, p. 185-195, 2017.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MARTINEZ, M. et al., Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler sobre eritrocitos humanos. **Steviana**. v. 5, 2013.

MERINO, F. J. Z., Et al., A study of phytotoxic effects of the aerial parts of *Senecio westermanii* Dusén (Asteraceae) on ***Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L.** seeds. **Braz. J. Pharm Sci.** v. 54, n. 03, 2018.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. **Apostila da disciplina de fitoquímica**. Curso de farmácia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

NICKRENT, D. L.; MALECOR, V.; VIDAL-RUSSELL, R.; DER, J. P. A Revised Classification of Santalales. **Taxon**. v. 59, n. (2), p. 345 – 685, 2010.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Vienna, v. 59, n. 2, p.368-73, 1964.

OLIVEIRA, L. F. Estudo químico, propriedades antioxidantes, biológicas, antitumoral e hepatoprotetora das partes aéreas de *Croton glandulosus* Linnaeus., Euphorbiaceae. Tese de doutorado. Ciências Farmacêuticas, **Universidade Federal do Paraná**, 2020.

PAMUNUWA, G.; KARUNARATNE, D. N.; WAISUNDARA, V. Y. Antidiabetic Properties, Bioactive Constituents, and Other Therapeutic Effects of *Scoparia dulcis*. **Hindawi**. 2016.

PAULA, C. S., CANTELLI, V. C. D., SILVA, C. B., CAMPOS, R., MIGUEL, O. G., MIGUEL, M. D. Atividade alelopática do extrato e frações das folhas de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista das Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 35, n. 1, p. 47-52. 2014.

PAZ, I. P. et al., Toxicidade do extrato vegetal, óleo essencial e hidrolato das plantas *Zingiber officinale* Roscoe e *Allium sativum* L. **Brazilian Journal of Development**. V. 8, n. 2, p. 14318 – 14329, 2022.

POLLI, A.; SOUZA, L. A.; ALMEIDA, O. J. G. Structural development of the fruits and seeds in three mistletoe species of *Phoradendron* (Visceae: Santalaceae). **Rodriguésia**. V.63, n.3, 2016.

RANGEL-MENDEZ, J. A.; VALENCIA-CHAN, L. S.; PERAZA-SANCHEZ, S.; MOOPUC, R. E. Season affects active metabolite composition and cytotoxic effect in *Phoradendron wattii* methanol extracts. **Natural Products Research**. V. 36, n. 17, p. 4460-4463, 2022.

RE, et. al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. V. 26, n. 9-10, p. 1231-1237. 1999.

RICE, E.L. Allelopathic effects on nitrogen cycling. *Allelopathy: basic and applied aspect*. London: **Chapman & Hall**. 1992

RICE, E.L. *Allelopathy*. 2ed, New York: **Academic Press**, 1984.

RIEDER, A. et al., Potencial bioativo de ervas-de-passarinho: Efeito do extrato aquoso de folhas de *Phoradendron piperoides* (Kunt.) Trel. (Santalaceae) na mitose. **Research, Society and Development**. v.10, n, 8. 2021.

RIGON, J. O gênero *Phoradendron* Nutt (Viscaceae) no Estado do Paraná, Brasil. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal do Paraná (UFPR)**. 2011.

RIGON, J.; CERVI, A. C. O gênero *Phoradendron* Nutt. (Viscaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Pesquisas Botânica** 64: p. 15-38, 2013.

RIZVI, S.J.H.; RIZVI, H. *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall, p.1-10, 1992

RODRIGUES, F. A.; PIMENTA, V. S. C.; BRAGA, K, M, S.; ARAÚJO, E. G. A. Obtenção de extratos de plantas do cerrado. **Enciclopédia Biosfera**. n.13, v.23, p.870-887, 2016.

ROJAS, T. N., et al., A combination of rules govern fruit trait preference by frugivorous bat and birds species: nutrients, defence and size. **Animal Behaviour**. v. 176. p. 111-123. 2021.

ROTTA, E., et al. Reconhecimento Prático de Cinco Espécies de Erva-de-Passarinho na Arborização de Curitiba-PR. **EMBRAPA**, 1ª edição, 2005.

SALEHI, B. et al., Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components. **Biomolecules**. v. 30, n.10, 2019.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação científica**. v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2 ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SAUERBORN, J.; MÜLLER-STÖVER, D.; HERSHENHORN, J. The role of biological control in managing parasitic weeds. **Crop Protection**. v.26, n.3, p.246-254, 2007.

SHYAULA, S. L. A Review on genus *Osyris*: A phytochemical constituents and traditional uses. **Journal of Natural Pharmaceuticals**. V.3 n. 2. P.61-70, 2012

SILVA, A.A.; SILVA, J.F. Tópicos em manejo de plantas daninhas. 1 ed. Viçosa: **Editora UFV**, 2007. 367p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. São Paulo: **Artmed Editora**, 2017.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p. 144-158, 1965.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C. A. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Braquiária-decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. **Planta Daninha**. v. 24, n.4. 2006.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 216– 223, 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, p. 109-116, 2004.

VARELA, B.; et al., *Phoradendron liga* (Gill. Ex. H. et al) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies. **Journal of Ethnopharmacology**. v.94, n. 1, p. 109-116, 2004.

VASCONCELOS, M. C. C.; SILVA, A. F. A.; LIMA, R. S. Interferência de plantas daninhas sobre plantas cultivadas. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2012. WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2. ed. **Berlin: Springer Science & Business Media**, 1996.

## ANEXO 1

### AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO

  
**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO  
**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A8AB244**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGer em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A8AB244**  
Usuário: **Universidade Federal do Paraná**  
CPF/CNPJ: **75.095.679/0001-49**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Phoradendron ensifolium**


Título da Atividade: **Pesquisa fitoquímica e farmacológica de phoradendrum ensifolium**

**Equipe**

<b>Obdulio Gomes Miguel</b>	<b>Universidade Federal do Paraná</b>
<b>Emellie Cristine Alves</b>	<b>UFPR</b>
<b>Marilis Dallarmi Miguel</b>	<b>UFPR</b>

Data do Cadastro: **13/12/2018 11:17:37**  
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:08 de 17/10/2019.**

 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**