



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

GABRIELLE MOURA NASCIMENTO
PRISCILA DE OLIVEIRA TEIXEIRA MOTTA

**ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS
HOMEOPÁTICOS OBTIDOS DE TINTURA-MÃE DE VISCUM (*Viscum album*
L.)**

BRASÍLIA

2020/21



GABRIELLE MOURA NASCIMENTO
PRISCILA DE OLIVEIRA TEIXEIRA MOTTA

**ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS
HOMEOPÁTICOS OBTIDOS DE TINTURA-MÃE DE VISCUM (*Viscum album*
L.)**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e
Pesquisa.

Orientação: Francislete Rodrigues Melo e Carlos
Alberto da Cruz Júnior

BRASÍLIA

2020/21

AGRADECIMENTOS

Ao coordenador Carlos Alberto da Cruz Júnior, nosso reconhecimento pela oportunidade de participar deste projeto.

A professora Francislete Rodrigues nosso respeito e admiração pelos ensinamentos, paciência, apoio e orientação.

Ao pessoal do Labocien e equipe da BIOCELL Terapia Celular®, principalmente a doutora Hilana Brunel, pela disponibilidade e ajuda.

A doutora Ana Catarina Valle pelo apoio na liberação das amostras e ensinamentos.

A médica veterinária Vivian Vivanco pelos ensinamentos, compreensão e por nos mostrar que a homeopatia é muito mais do que podemos imaginar, sobretudo na medicina veterinária.

Ao CEUB pelo incentivo aos alunos na área de iniciação científica.

RESUMO

Atualmente, medicações fitoterápicas e homeopáticas vêm sendo bastante utilizadas tanto na medicina humana como na medicina veterinária para tratamento de depressão, obesidade, ansiedade, doenças do trato respiratório, câncer e outras. O uso de medicamentos homeopáticos de *Viscum* (*Viscum album* L.) como tratamento complementar em casos de câncer tem sido frequente há muitos anos na medicina integrativa humana, entretanto na medicina veterinária esse uso é recente, sendo empregado principalmente em animais de companhia. Na homeopatia, existem princípios básicos que devem ser seguidos, os quais preconizam o tratamento pela diluição e dinamização da mesma substância que produz os sintomas. Para o combate ao câncer, medicamentos com atividade antioxidante são importantes tanto para o combate à doença quanto para amenizar os efeitos da quimioterapia, porém sua possível citotoxicidade é um parâmetro que não pode ser negligenciado. Diante disto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante de produtos homeopáticos obtidos de tintura-mãe de viscum e sua ação citotóxica em células-tronco mesenquimais de cão através do ensaio colorimétrico MTT nas concentrações de 10 a 50 µL/mL, e método de captura do radical 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), em que as amostras foram adquiridas da empresa INJECTCENTER®. Por meio dos resultados, foi possível observar que a amostra de VAD3 possui menor atividade antioxidante e maior ação citotóxica do que a amostra VA200CH. Estudos complementares *in vivo* se fazem necessários para que possamos dar prosseguimento às investigações sobre a eficácia desses produtos.

Palavras-Chave: Homeopatia; Oncologia; Plantas medicinais; Visco.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Amostra de VA200CH.	11
Figura 2. Amostra de VAD3.	11
Figura 3. Ilustrações do ensaio colorimétrico de MTT.	12
Figura 4. Espectrofotômetro.	13
Figura 5. Determinação do percentual da viabilidade celular referente as concentrações utilizadas (10 a 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) das amostras VAD3.	17
Figura 6. Determinação do percentual da viabilidade celular referente as concentrações utilizadas (10 a 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) das amostras VA200CH.	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparo das soluções da curva padrão.	14
Tabela 2. Média das concentrações a partir da leitura de absorbância da amostra VA200CH.	15
Tabela 3. Média das concentrações a partir da leitura de absorbância da amostra VAD3.....	16
Tabela 4. Atividade antioxidante das triplicatas da amostra VA200CH.	18
Tabela 5. Atividade antioxidante das triplicatas da amostra VAD3.	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
2.1. Plantas Medicinais	8
2.2. Compostos fenólicos e atividade antioxidante	9
2.3. Plantas medicinais e a homeopatia	9
2.4. Avaliação da citotoxicidade de plantas medicinais	9
2.5. Viscum album	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Aquisição das amostras	11
3.2. Ensaio MTT	11
3.3. Determinação de atividade antioxidante	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. Ensaio MTT	15
4.2. Determinação de atividade antioxidante	15
5. CONCLUSÃO	15
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

1. INTRODUÇÃO

A avaliação da atividade antioxidante é de extrema relevância, pois a partir dela se sabe a propriedade protetiva de um determinado composto que pode ser utilizado para procedimentos fitoterápicos, como por exemplo, no tratamento complementar de neoplasias, que são as principais causas de óbitos em animais de estimação. Ademais, os tratamentos convencionais, como a quimioterapia, podem gerar um aumento do stress oxidativo e conseqüentemente uma formação de grande quantidade de radicais livres, os quais causam efeitos deletérios a moléculas e células animais. Adicionalmente, estudos de citotoxicidade são muito importantes para garantir que além da eficácia, o fitoterápico seja seguro para seus pacientes. Com isto, a caracterização da citotoxicidade *in vitro* é uma prática comum na avaliação biológica de produtos para a saúde e fundamental para a análise inicial da biocompatibilidade dos mesmos. O projeto foi baseado no estudo de determinação da atividade antioxidante e avaliação citotóxica de plantas medicinais que são utilizadas na medicina tradicional brasileira. De acordo com Figueiredo (2014), o uso de visco (*Viscum album* L.) como terapia complementar, tem-se demonstrado eficaz na redução de efeitos deletérios e de toxicidade dos tratamentos convencionais, além do fortalecimento do sistema imunológico e da amenização dos sintomas neoplásicos em pequenos animais, resultando em um aumento da sobrevivência, diminuição de efeitos secundários e aumento da qualidade de vida.

O objetivo deste projeto foi avaliar a atividade antioxidante de produtos a base de *Viscum album* utilizados na terapia complementar em neoplasias de pequenos animais e investigar uma possível ação citotóxica do mesmo em células-tronco mesenquimais de cão.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Plantas Mediciniais

A biodiversidade é constituída por alguns elementos, dentre eles as plantas medicinais, que começaram a ser utilizadas como medicamentos caseiros e na farmacologia em algumas localidades, onde se tornaram conhecidas como matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos. Assim como todas as outras plantas, as medicinais possuem as funções no ambiente de amenizarem a poluição do solo, pois suas raízes possuem uma malha que fixam a terra, evitando que ela seja contaminada (FIRMO *et al.*, 2010; HARAGUCHI e CARVALHO, 2010).

Para alguns autores, as plantas medicinais são todas aquelas que, quando aplicadas em um ser humano ou animal, exercem ação terapêutica, auxiliando o organismo a normalizar funções fisiológicas prejudicadas, restaurar a imunidade enfraquecida, promover a desintoxicação e o rejuvenescimento. Este algo atuante é chamado de princípio ativo, seja ele composto de uma única substância existente na planta ou de um conjunto que age sinergicamente, chamado de complexo fitoterápico. Porém para a planta ser considerada verdadeiramente medicinal, é necessário que seja identificado o seu princípio ativo e que ele seja avaliado farmacologicamente (FIRMO *et al.*, 2010; HARAGUCHI e CARVALHO, 2010; LORENZI e MATOS, 2008).

2.2. Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário de plantas medicinais, sendo importante para o seu crescimento e reprodução, possuindo atividade antioxidante. São enquadrados em distintas categorias como ácidos fenólicos provenientes do ácido benzóico e cinâmico, fenóis simples, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (ANGELO, 2006).

A atividade antioxidante dos compostos deve-se pelas propriedades redutoras e estruturas químicas, que acabam desempenhando um importante papel no sequestro de radicais livres durante as etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo. O método usualmente utilizado para medir a atividade antioxidante é pela captura do radical 2,2' - azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática, medindo as atividades dos compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (RUFINO, 2007; SOUSA *et al.*, 2007).

2.3. Plantas medicinais e a homeopatia

A homeopatia foi aplicada inicialmente há 200 anos atrás, pelo médico alemão Samuel Hahnemann, conhecido como o pai da homeopatia. Ela possui alguns princípios básicos, como a “lei dos semelhantes”, que preconiza o tratamento pela diluição e dinamização da mesma substância que produz sintomas em uma pessoa saudável, chamado de “princípio da globalidade”, que determina que a homeopatia se concentra no ser como um todo e não apenas na doença, avaliando sua constituição física e temperamental, e, por fim, o “princípio da infinitesimalidade”, que demonstra que os medicamentos homeopáticos

são utilizados em altas diluições, anulando os efeitos indesejáveis e mantendo ação terapêutica de forma mais profunda e duradoura (VANZELA & BITENCOURT, 2017).

Os medicamentos homeopáticos podem ser derivados dos reinos animal, vegetal e mineral, e substâncias produzidas nos organismos vivos como resultados de processos fisiológicos. No reino vegetal, as plantas mais utilizadas para a produção de medicamentos são *Anemose pulsatilla* L. (Anêmona) e *Thuya occidentalis* L. (Árvore-da-vida), sendo estas usadas para tratamentos de depressão puerperal, bronquite, enfisema e asma (VANZELA & BITENCOURT, 2017; NASER *et al.*, 2005; TAMANAKA, 2019).

2.4. Avaliação da citotoxicidade de plantas medicinais

Com o passar do tempo, o tratamento com plantas medicinais em formas de xaropes, chás, tinturas e inalações tem se tornado popularmente conhecido. Entretanto, a maioria das plantas utilizadas nunca foram avaliadas em relação aos seus efeitos tóxicos em nível celular, já sendo relatado que chás e infusões de algumas espécies possuem substâncias tóxicas mutagênicas (NASCIMENTO *et al.*, 2021; FAGUNDES *et al.*, 2017). De acordo com Fagundes *et al.* (2017) a proliferação adequada de uma célula é indicada pelo seu índice mitótico que é utilizado como parâmetro para avaliação da análise citotóxica de extratos de plantas medicinais, servindo no desenvolvimento de drogas com baixa toxicidade.

Segundo Soto e Campelo (2016), o ensaio de citotoxicidade celular *in vitro* é um sistema muito importante para definição da toxicidade de extratos de plantas medicinais, indicando se estes compostos podem ou não ocasionar morte celular. O método de análise mais utilizado é o ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) que envolve na conversão do corante solúvel em água utilizados nas células em um formazan roxo insolúvel pela ação da enzima redutase mitocondrial (KUMAR *et al.*, 2018).

2.5. *Viscum album*

O gênero *Viscum* faz parte do grupo de plantas que parasitam outras espécies, sendo, em sua maioria, duas espécies nativas da África e Madagascar. A espécie *Viscum album* L., conhecida como visco, é encontrada na Europa Central, sendo utilizada na medicina complementar em estudos fenomenológicos, fitoquímicos, pré-clínicos e clínicos (MAGANO, 2012). Tem como sua composição principal a lectina, que apresenta efeito citotóxico em células tumorais e aumenta o efeito de fármacos anticancerígenos. Além da viscotoxina, um

composto que causa interferência na angiogênese tumoral, estimulando o sistema imune (BETTIOL, 2011).

Ainda há poucos relatos sobre a atividade antioxidante deste gênero, porém já existem trabalhos que constataam a sua eficácia antimicrobiana, anticâncer, antiviral, indutora de apoptose e atividades imunomoduladoras e, portanto, pode ser considerada uma boa fonte para outras aplicações medicinais (ÖNAY-UÇAR *et al.*, 2006; PAUN *et al.*, 2009).

Um estudo realizado com humanos portadores de câncer pancreático, em estágio final ou em metástase, demonstrou que, os pacientes tratados apenas com extrato de visco obtiveram um tempo de sobrevivência de 2 meses a mais que os pacientes do grupo controle, os quais não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento (OSTERMANN *et al.*, 2020). Enquanto um estudo com aplicação de altas doses de visco em carcinoma precoce de bexiga apresentou menor taxa de recorrência do câncer, comparado ao que seria considerado padrão para esse tipo de tumor e uma regressão de 56% nos marcadores tumorais restantes, indicando controle e redução do crescimento tumoral (GUNVER *et al.*, 2017).

De acordo com Pires (2019), a associação da acupuntura veterinária com aplicação de *Viscum* em tratamentos oncológicos reduz efeitos adversos de vômitos e náuseas, além do fortalecimento do sistema imune. A aplicação do fitoterápico deve ser feita no acuponto VG-14, localizado entre a sétima vértebra cervical e a primeira torácica. Outros autores também relatam a eficácia do tratamento da planta associada à solução aquosa de látex de Janaúba (*Himatanthus drasticus*) em neoplasias da cavidade oral, tendo como resultado a diminuição da massa tumoral (ALCÂNTARA *et al.*, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aquisição das amostras

As amostras homeopáticas foram cedidas pela empresa INJECTCENTER®, já preparadas pela empresa. As amostras foram denominadas de VA200CH e VAD3 (**figura 1 e 2**) devido às quantidades de diluições para formulação do produto, sendo que a VAD3 contém a substância do insumo ativo. Ambas foram utilizadas tanto no ensaio MTT como na determinação de atividade antioxidante.

Figura SEQ Figura * ARABIC 1.
Amostra de VA200CH.

Figura SEQ Figura * ARABIC 2. Amostra de VAD3.
Figura 1. Amostra de VA200CH.



3.2.

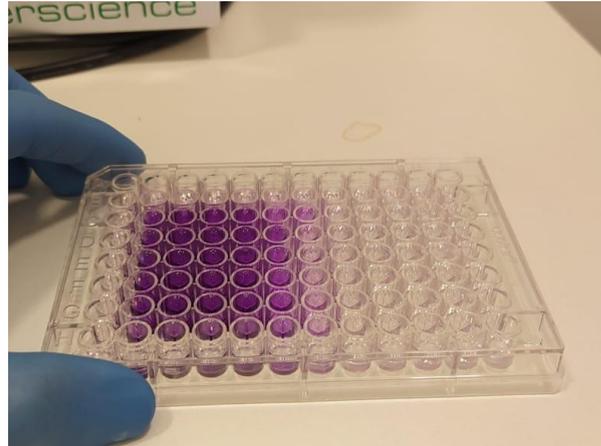
Ensaio MTT

O ensaio MTT foi realizado pela equipe da BIO CELL Terapia Celular®, por meio do cultivo de células-tronco mesenquimais de cão em garrafas, até atingirem a confluência de 80%.

1. Posteriormente as células-tronco foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $2,5 \times 10^4$ células/mL em meio de cultivo DMEM.
2. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio adicionado de VAD3 em uma placa, e VA200CH em outra placa, em cinco concentrações diferentes, que variaram de 10 a 50 $\mu\text{L/mL}$
3. Também foram mantidos poços controle, formados apenas por meios de cultivo e células.
4. Todos os meios foram preservados 48 horas em cultivo e realizados 6 poços por tratamento.
5. Após esse período, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT (**figura 3**), com adição de reagente de MTT e incubação por mais 4 horas em ambiente escuro.
6. Foi adicionado DMSO para diluição dos cristais de formazam e realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro em 570nm.
7. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem e calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{média da absorbância do tratamento} \times 100}{\text{média da absorbância do controle}}$$

Figura 3. Ilustrações do ensaio colorimétrico de MTT.



FONTE: Brunel, 2021.

3.3. Determinação de atividade antioxidante

A determinação de atividade antioxidante foi realizada a partir do método da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), modificado pela EMBRAPA (2007), sendo as quantidades utilizadas em dobro, porém nas mesmas proporções:

1. Preparado da solução estoque ABTS 7Mm (384 mg de ABTS em 100 mL de água destilada).
2. Preparado a solução de persulfato de potássio 140 Mm (378,4 mg para 10 mL de água destilada).
3. Preparado do Radical ABTS a partir das soluções de persulfato de potássio e estoque ABTS (1.776 μ L/100mL), colocada em vidro âmbar, em temperatura ambiente e deixada no escuro por 16 horas. Podendo ser usado somente no dia da análise.
4. O radical ABTS foi diluído em etanol até uma leitura de \pm 700nm a 734nm, resultando na diluição de 1:70 (v/v).
5. Utilizado 30 microlitros das amostras e 3 mL do radical ABTS (em triplicata) e após 6 minutos, realizada a leitura em 734 nanômetros no espectrofotômetro, utilizando um branco (etanol) para calibração do espectrofotômetro (**figura 4**).
6. As absorbâncias obtidas foram jogadas na curva padrão.

Figura 4. Espectrofotômetro.



Curva padrão do Trolox:

1. Preparado a solução padrão de trolox 2 mM (25 mg de trolox em álcool etílico e completado o volume para 50 mL em um balão volumétrico com álcool etílico, foi homogeneizado e transferido para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Podendo somente ser utilizado no dia da análise.
2. A partir da solução padrão de trolox (2.000 M), preparou-se em balões volumétricos de 1 mL, soluções variando a concentração de 100 M a 1.500 M, conforme a **tabela 1**.

Tabela 1. Preparo das soluções da curva padrão.

Solução padrão Trolox (mL)	Álcool etílico (mL)	Concentração final (µL)
0,15	9,5	100
2,5	7,5	500
5	5	1000
7,5	2,5	1500
10	0	2000

3. Em ambiente escuro, foi transferido uma alíquota de 30 µL de cada solução de trolox (100 µM, 500 µM, 1.000 µM, 1.500 µM e 2.000 µM) para tubos de ensaio, misturado com 3,0 mL da solução do radical ABTS e homogeneizado.
4. Foi realizada a leitura em 734 nanômetros e após 6 minutos da mistura, e utilizado álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro.
5. A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotar a absorvância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X.
6. Em seguida, determinar a equação da reta. Para calcular a AAT, deve-se substituir na equação da reta a absorvância equivalente a 1.000 µM do padrão trolox (Eq. 1).
7. O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox (Eq. 2).

Equação 1:

Absorvância correspondente a 1.000 µM de trolox

$$y = -ax + b$$

onde:

x = 1.000 µM do trolox

y = Absorvância correspondente a 1.000 µM de trolox

Equação 2:

Cálculo das diluições do extrato (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox

$$y = ax + b$$

onde:

y = Absorvância correspondente a 1.000 µM de trolox (Equação 1) x

= Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox

8. A partir do resultado encontrado (x) na equação 2, dividir por 1.000 para ter o valor em g.

9. O resultado (Eq. 3) é calculado pela divisão de 1.000 (μM) pelo valor de $X(\text{g})$ e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em μM trolox / g de fruta (porção comestível).

Equação 3:

Cálculo final expresso em (μM trolox / g)

$$X(\text{g}) = x / 1.000$$

$$Z = 1.000 / X(\text{g}).1$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio MTT

Para mensuração da viabilidade celular, foram realizados 6 poços de cada amostra nas concentrações de 10 a 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e controle, e a partir da leitura foram feitas as médias com os valores obtidos como mostrados na **tabela 2 e 3**.

Tabela 2. Média das concentrações a partir da leitura de absorbância da amostra VA200CH.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	MÉDIA
Controle	0,389
10	0,384
20	0,374
30	0,365
40	0,353
50	0,360

Tabela 3. Média das concentrações a partir da leitura de absorbância da amostra VAD3.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	MÉDIA
Controle	0,676
10	0,388
20	0,243
30	0,191
40	0,171
50	0,204

A partir do ensaio, foi possível avaliar que a amostra VAD3 apresentou maior citotoxicidade em todas as concentrações testadas, principalmente na concentração de 40 $\mu\text{L/mL}$ (**figura 5**). Enquanto a amostra VA200CH foi menos citotóxica em todas as suas concentrações como demonstrado na **figura 6**. Na preparação dos medicamentos homeopáticos, uma das fases é a diluição, em que, com a finalidade de seguir o princípio da infinitesimalidade ou da dose mínima, são feitas sucessivas diluições da substância, diminuindo a concentração do princípio ativo, reduzindo assim, por conseguinte, a citotoxicidade celular do preparado (ANDRADE; NUNES; AGUIAR, 2012).

A concentração do insumo ativo obedece à escala decimal (D), sendo que, na primeira dinamização (D1), tem-se uma diluição correspondente a uma parte de insumo ativo em nove partes de insumo inerte/excipientes. Já na segunda dinamização decimal (D2), a diluição é correspondente a uma parte da D1 em nove partes do insumo inerte. A preparação em questão, D3, corresponde à terceira dinamização, onde tem-se uma diluição correspondente a uma parte de D2 em nove partes do insumo inerte/excipientes (LEFEBVRE; BONAMIN; OLIVEIRA, 2007).

Em um trabalho realizado por Lopes (2008), foi realizada avaliação da citotoxicidade com VAD3 em células Caco-2 (adenocarcinoma de colón), adquiridas pela mesma empresa e realizada pelo ensaio de MTT, porém análise dos resultados foi feita por espectroscopia de Raman Dispersivo em 830nm. De acordo com o estudo, VAD3 reduziu a viabilidade celular, atingindo a atividade mitocondrial da célula. Além disto, outro estudo realizado por cromatografia com VAD3 em adenocarcinoma de mama humano também demonstrou maior dano citotóxico (MELO *et al.*, 2020). Neste contexto, os resultados destes trabalhos se tornam positivos por se tratar de células neoplásicas, mostrando a eficácia do tratamento de VAD3 em neoplasias.

Figura 5. Determinação do percentual da viabilidade celular referente as concentrações utilizadas (10 a 50 $\mu\text{L/mL}$) das amostras VAD3.

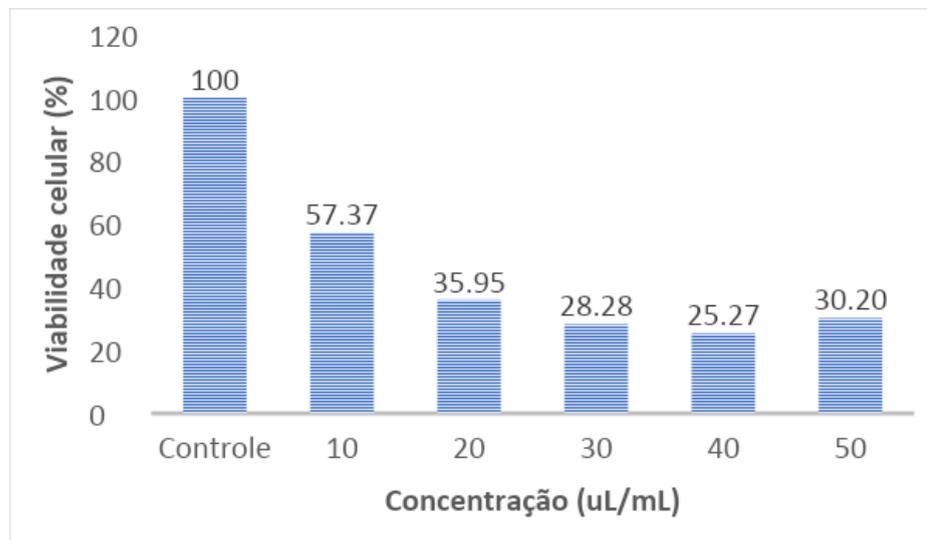
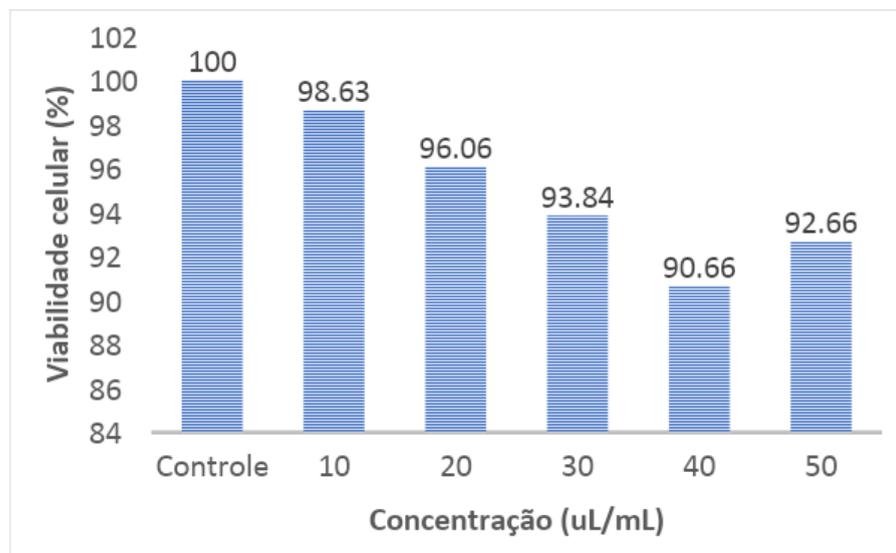


Figura 6. Determinação do percentual da viabilidade celular referente as concentrações utilizadas (10 a 50 $\mu\text{L/mL}$) das amostras VA200CH.



De acordo com esses resultados, verificamos que a amostra VAD3 apresentou maior citotoxicidade em comparação com a VA200CH, pois diminuiu a viabilidade das células mesenquimais de cães no ensaio em até 70%, enquanto a VA200CH, na mesma concentração (50 microlitros/mL), diminuiu em menos de 10% a viabilidade destas células.

4.2. Determinação de atividade antioxidante

Para a avaliação da atividade, como já descrito, o método de eleição utilizado foi ABTS. De acordo com Sucupira *et al.* (2012), este método em relação aos outros possui uma grande vantagem pois pode ser utilizado tanto em amostras lipossolúveis como hidrossolúveis, além de apresentar uma boa estabilidade, rápido e com resultados reproduzíveis.

Os resultados obtidos das amostras constam na **tabela 4 e 5**, e a partir destes dados foi realizado a média dos valores, sendo 738nm para VA200CH e 684nm para VAD3. Os ensaios das amostras evidenciaram que a atividade antioxidante de VA200CH foi superior à de VAD3, o que já era esperado por serem amostras diluídas.

Tabela 4. Atividade antioxidante das triplicatas da amostra VA200CH.

VA200CH	ABSORBÂNCIA – 734NM
Branco	750
Amostra 1	657
Amostra 2	694
Amostra 3	700

Tabela 5. Atividade antioxidante das triplicatas da amostra VAD3.

VAD3	ABSORBÂNCIA – 734NM
Branco	750
Amostra 1	716
Amostra 2	749
Amostra 3	749

Na literatura, não há trabalhos que descrevem a atividade antioxidante de produtos derivados da planta pelo método ABTS. Porém em um trabalho realizado por Önyay-Uçar *et al.* (2006) descreveu a capacidade antioxidante dos extratos puros de visco pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) lidos na absorvância de 517nm para evitar dados imprecisos. De acordo com o estudo, o *Viscum álbium* apresentou uma boa atividade antioxidante e efeito protetor contra hidroperóxidos. Porém segundo Oliveira (2015) o método DPPH, mesmo sendo bastante utilizado para a determinação de extratos puros e de medicamentos, não consegue caracterizar um composto como antioxidante totalmente,

sendo necessário realizar outros ensaios utilizando ABTS ou método de TRAP (Total Radical – Trapping Antioxidant Parameter).

De acordo com Szurpnicka *et al.* (2020) um estudo realizado em ratos hipertensos induzidos por glicocorticoides utilizando como tratamento extrato de visco, diminuiu a pressão arterial sistólica e os níveis de peroxidação lipídica e isto pode estar relacionado devido a ação antioxidante e da liberação de óxido nítrico da planta. De acordo com o autor, a atividade antioxidante de *Viscum album* irá depender da sua árvore hospedeira e fatores ambientais como estação, clima e temperatura que podem afetar os componentes antioxidantes. Pelas amostras terem sido adquiridas, não foi possível avaliarmos em qual árvore ambas foram coletadas.

5. CONCLUSÃO

Por meio dos resultados, foi possível observar que as amostras de VAD3 possuem menor atividade antioxidante e maior ação citotóxica do que a amostra VA200CH. Esse resultado sugere que por ter maior atividade antioxidante o VA200CH pode proteger mais as células, já que se mostrou menos citotóxica que VAD3. Ensaio específicos com células tumorais precisam agora ser feitos para se verificar se o padrão observado aqui ocorre também em células malignas.

Ademais, ainda existem outras pesquisas que devem ser realizadas sobre ação antioxidante e citotoxicidade dos homeopáticos devido a escassez na literatura mesmo com o uso atual do composto tanto na medicina humana como na medicina veterinária de pequenos animais, sendo possível tirar proveito destes avanços na medicina de animais silvestres. Além que, este foi o primeiro estudo a avaliar a atividade antioxidante de produtos homeopáticos a partir do método ABTS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, M. A *et al.* Tratamento de melanoma oral com *Viscum album* e solução aquosa com látex de Janaúba (*Himatathus drasticus*): relato de caso. **Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**, n.12, maio-agosto. 2015. Disponível em: <https://interin.utp.br/index.php/GR1/article/view/1737>. Acesso em: 29 de julho de 2021.

ANDRADE, A.; NUNES, A.; AGUIAR, R. A influência das diluições homeopáticas nas reações AG/AC do sistema sanguíneo ABO. **Revista Científica do ITPAC**, v.5, n.4. out. 2012. Disponível em: <https://assets.unitpac.com.br/arquivos/Revista/63/6.pdf>. Acesso em: 11 de agosto de 2021.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos Fenólicos em Alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9. 2007. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n1/v66n1a01.pdf>. Acesso em: 23 de julho de 2021.

BETTIOL, G. 2011. **Medicina integrativa no tratamento de linfoma canino**. Monografia de Conclusão de Curso - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/52498/000829811.pdf?sequence=1>. Acesso em: 03 de agosto de 2021.

FAGUNDES, P. A. S *et al.* Avaliação da citotoxicidade de três plantas medicinais encontradas em quintais urbanos no município de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. **Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.14, n.26, p.806. 2017. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2017b/biol/avaliacao%20da%20citotoxicidade.pdf>. Acesso em: 03 de agosto de 2021.

FIGUEIREDO, R. N. 2014. **Uso de *Viscum album* no ponto de acupuntura VG14 como terapia adjuvante à mastectomia radical em cadelas com neoplasias mamárias**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista. Araçatuba, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/128055>. Acesso em: 01 de agosto de 2021.

FIRMO, W. C. A *et al.* Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais. **Cad. Pesq**, São Luís, v.18, n. especial, dez. 2011. Disponível em: <http://www.periodicos eletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/view/746/2578>. Acesso em: 21 de julho de 2021.

GUNVER, S. K.; HELMUT, K. Ensaio clínico da terapia com *Viscum album* para o câncer - uma revisão. **Revista Arte Médica Ampliada**, v.37, n.2, abril-maio-junho. 2017. Disponível em: <http://abma.com.br/wp-content/uploads/2017/09/37-2-Viscum-album-Revis%C3%A3o-dos-estudos-cl%C3%ADnicos.pdf>. Acesso em: 26 de julho de 2021.

HARAGUCHI, L. M. M.; CARVALHO, O. B. **Plantas medicinais**. 1. ed. São Paulo: Escola Municipal de Jardinagem, 2010.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v.6. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/325520932_Analysis_of_Cell_Viability_by_the_MTT_Assay. Acesso em: 05 de agosto de 2021.

LEFEBVRE, G. N. F.; BONAMIN, V. L.; OLIVEIRA, C. M. Tratamento de tumor venéreo transmissível (TVT) canino utilizando *Viscum album* em associação à quimioterapia. **Clínica Veterinária**, a.XII, n.70. 2007. Disponível em: https://issuu.com/clinicavet/docs/clinica_veterinaria_70/78. Acesso em: 11 de agosto de 2021.

LOPES, D. F. 2008. **Utilização da espectroscopia Raman dispersiva na verificação da citotoxicidade do *Viscum album* em células caco-2 in vitro**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, 2008. Disponível em: <https://biblioteca.univap.br/dados/000002/0000027F.pdf>. Acesso em: 11 de agosto de 2021.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MAGANO, D. *Viscum album*: preparações farmacêuticas para aplicação na terapêutica antroposófica. **Arte Médica Ampliada**, v.32, n.2, abril-maio-junho. 2012. Disponível em: <http://abmanacional.com.br/arquivo/9f2d4f540fb3ecd880662e9c276ecb9a3f595027-32-2-viscum-album-magano.pdf>. Acesso em: 28 de julho de 2021.

MELO, M. N. O.; OLIVEIRA, A. P.; GARRETT, R.; OCHIONI, A. C.; BAUMGARTNER, S.; HOLANDINO, C. *Viscum album* ethanolic extracts: 2d and 3d cellular antitumor activity and glycolytic pathway mechanisms. **XIV Oncobiology Symposium**, 2020. Disponível em:

<http://proceedings.science/xiv-so-2020/papers/viscum-album-ethanolic-extracts--2d-and-3d-cellular-antitumor-activity-and-glycolytic-pathway-mechanisms?lang=pt-br>. Acesso em: 11 de agosto de 2021.

NASCIMENTO, G *et al.* Estudo do uso de plantas medicinais na medicina veterinária em plataformas virtuais. **PUBVET**, v.15, n.04, a.789, p.1-13, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n04a789.1-13>. Acesso em: 3 de agosto de 2021.

NASER, B.; BODINET, C.; TEGTMEIER, M.; LINDEQUIST, U. Thuja occidentalis (Arbor vitae): a review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. **Evidence Based. Complementary Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.69-78, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1062158/>. Acesso em: 09 de agosto de 2021.

RUFINO, M. S. M *et al.* Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. **EMBRAPA**, 2007. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf. Acesso em: 24 de julho de 2021.

SOUSA, C. M. M.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v.30, n.2, p.351-355. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/4d6yvCyDmhHyfP9ZJqV6nDy/?lang=pt>. Acesso em: 24 de julho de 2021.

SOTO, C. T. A.; CAMPELO, P. M. S. Avaliação da citotoxicidade de extratos de plantas medicinais. **XXIV Seminário de Iniciação Científica PUCPR (SEMIC)**, 2016. Disponível em: https://cip.pucpr.br/eventos/semic/16/resumo_template.php?id=0009915. Acesso em: 05 de agosto de 2021.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR. Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v.14, n.4, p.263-269. 2012. Disponível em: <https://revista.pgskroton.com/index.php/JHealthSci/article/view/885>. Acesso em: 09 de agosto de 2021.

SZURPNICKA, A.; KOWALCZUK, A.; SZTERK, A. Biological activity of mistletoe: in vitro and vivo studies and mechanisms of action. **Arch. Pharm. Res**, v.43, p.593-629. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12272-020-01247-w>. Acesso em: 11 de agosto de 2021.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, n.1, jan.-mar. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/5Wrr5LFLJVDN5yYQnFGyWd/?lang=pt>. Acesso em: 10 de agosto de 2021.

ÖNAY-UÇAR, E *et al.* Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. album. **Fitoterapia**, p.556-560 2006. Disponível em https://www.academia.edu/16732020/Antioxidant_activity_of_Viscum_album_ssp_album. Acesso em: 30 de julho de 2021.

OSTERMANN, T *et al.* Systematic review and meta-analysis on the survival of cancer patients treated with a fermented *Viscum Album* L. extract (iscador): An update of findings. **S Karger AG**, p.260-271, 2020. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/505202>. Acesso em: 22 de julho de 2021.

PAUN, G *et al.* Antiradical activities of *Salvia officinalis* and *Viscum album* L. extracts concentrated by ultrafiltration process. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v.8, n.3. 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/45088338_Antiradical_activities_of_Salvia_officinalis_and_Viscum_album_L_extracts_concentrated_by_ultrafiltration_process. Acesso em: 30 de julho de 2021.

PIRES, M. O. 2019. **Estudo retrospectivo do perfil e evolução clínica do paciente atendido por acupuntura veterinária em Florianópolis/SC**. Trabalho de Conclusão. Universidade do Sul de Santa Catarina. Tubarão, 2019. Disponível em: <https://www.riuni.unisul.br/bitstream/handle/12345/8440/TCC%20%20MARIANA%20VERS%20%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 24 de julho de 2021.

TAMANAKA, P. H. 2019. **Abordagem homeopática da depressão puerperal: relato de caso**. Monografia de Conclusão de Especialização em Homeopatia – Centro Alpha de Ensino, Associação Paulista de Homeopatia. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/08/1009531/tcc-paula-final.pdf>. Acesso em: 09 de agosto de 2021.

VANZELA, C.; BITENCOURT, R. M. Homeopatia: terapia alternativa ou efeito placebo? **Unoesc & Ciência – ACBS**, v.8, n.1, p.59-66, jan.-jun. 2017. Disponível em: <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/acbs/article/view/11105/pdf>. Acesso em: 09 de agosto de 2021.