

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

VANESSA SVIZZERO FAKHOURY

**Avaliação de *Myrcia bella* em células de osteossarcoma murino: efeito do extrato bruto e frações de elagitaninos e flavonoides**

BAURU  
2020



VANESSA SVIZZERO FAKHOURY

**Avaliação de *Myrcia bella* em células de osteossarcoma murino: efeito do extrato bruto e frações de elagitaninos e flavonoides**

Dissertação constituída por artigo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

**Versão Corrigida**

BAURU

2020

Fakhoury, Vanessa Svizzero

Evaluation of *Myrcia bella* in murine osteosarcoma cells: effect of the crude extract and fractions of ellagitannins and flavonoids / Vanessa Svizzero Fakhoury – Bauru, 2020.

73 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

**Nota:** A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

## ERRATA



## FOLHA DE APROVAÇÃO





---

## DEDICATÓRIA

A **Deus**, pela minha vida e por tudo o que ela me proporciona.

Ao meus pais, **Eduardo e Elenice** e minha irmã **Renata** pelo amor e carinho incondicional. Por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos de minha vida. Dedico tudo isso a vocês.

A todos os amigos de pesquisa e laboratório que sempre me acolheram tão bem e tanto me ajudaram durante meu mestrado.



---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo! Por mais uma etapa concluída com sucesso em minha vida. Por me dar forças, saúde e alegria todos os dias para enfrentar mais um dia de vida. Obrigada!

Aos meu pais e minha irmã por serem a melhor família que eu poderia ter. Por nós estarmos sempre unidos e eles me darem forças para eu continuar em qualquer projeto de minha vida. Amo vocês do fundo do meu coração.

Aos meus amigos da cultura celular Dri, Ana, Cintia, Gabi, Mari, Kelly e Adriana! Por me auxiliarem nos experimentos e sempre me ajudarem nos momentos que eu mais precisei, pelas inesquecíveis risadas e pelos momentos maravilhosos que tivemos juntos. Em especial agradeço a Cintia e ao Adriano por tanto conhecimento transmitido e pela paciência ao me ensinarem tudo o que aprendi. Podem ter certeza que a bagagem é gigante e será muito bem utilizada. Obrigada de coração por tudo, carrego todos vocês em um lugar especial!

Ao meu orientador professor Rodrigo, pela orientação e incentivo que me deu desde o princípio. Por ser sempre tão atencioso e prestativo com todas as minhas dúvidas e questionamentos. Por acreditar em mim e me ajudar o que tanto objetivei ao chegar na FOB-USP. Obrigada imensamente pela confiança.

Aos amigos que o laboratório me deu Vini, Line, Tatá, Natara, Tamara, Even, Juliana e todos que de certa forma passaram pela minha vida durante esses anos. Foi tão incrível compartilhar minha rotina com vocês! Obrigada pela amizade, pelas risadas, momentos de relax enquanto o laboratório estava naquela correria, pelas ajudas, saídas e por eu sempre poder contar com vocês.

A Lari e a Thel pelas conversas, orientações e todos os conhecimentos transmitidos que vocês passaram a mim! Obrigada por tantos conselhos e ajudas quando mais precisei. Só tenho a agradecer vocês.

Aos professores da disciplina de Bioquímica Ana Carolina Magalhães, Marília Afonso Rabelo Buzalaf e Rodrigo Cardoso de Oliveira. Obrigada pelos valiosos ensinamentos e atenção para com todos os alunos.

---

Aos colaboradores Anne Ligia Dokkedal, Luiz Leonardo Saldanha e Fernanda Melo da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, pela ajuda na realização deste estudo.

A secretária do Departamento Dalva Ribeiro de Oliveira, por ser sempre tão solícita. Por toda ajuda, apoio e orientações. Obrigada por toda atenção prestada à mim e aos demais alunos da pós.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, deixo os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa de pesquisa concedida, processo nº 2017/26261-6. A bolsa concedida pela instituição de fomento foi indispensável para que a pesquisa alcançasse os resultados aqui apresentados.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço também a faculdade de Odontologia de Bauru-FOB/USP por ter utilizado as dependências da instituição e todos os equipamentos para a realização deste projeto de mestrado.

---

*“Vá firme na direção das suas metas,  
porque o pensamento cria,  
o desejo atrai e a fé realiza”.*

**(Lauro Trevisan)**



---

## RESUMO

O osteossarcoma (OS) é o tipo mais comum de câncer que se desenvolve nos ossos, caracterizado pela formação de osteócitos anormais. Os produtos naturais estão surgindo consistentemente no campo da saúde médica com implicações terapêuticas promissoras, devido à resistência aos medicamentos na taxa de cura na quimioterapia em osteossarcoma. As plantas medicinais compõem parte da biodiversidade e são abundantemente utilizadas desde a existência da humanidade. Entre as espécies medicinais de destaque do Cerrado, encontra-se a *Myrcia bella* Cambess, da família Myrtaceae. Estudos demonstram que espécies do gênero *Myrcia* têm sido utilizadas na medicina popular como adstringentes, diuréticos, no estancamento de hemorragias, tratamento de hipertensão e *Diabetes mellitus* e também contra células de tumor gástrico. Estudos de fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrcia bella* (MB) revelaram heterosídeos de flavonoides acetilados derivados de quercetina e miricetina, além de taninos derivados de ácido elágico e ácido gálico. Deste modo, MB tem demonstrado um promissor potencial contra diversas alterações patológicas, sendo necessário o entendimento de sua ação e confirmação de concentrações seguras. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos de MB sobre células tumorais de osteossarcoma UMR-106 (*in vitro*). Foram realizados os ensaios de viabilidade celular em diferentes concentrações do extrato bruto (CE) de folhas de MB e frações de elagitanino (ELT) e flavonoide (FV) utilizando pré-osteoblastos diferenciados (MC3T3-E1) como controle e, após determinadas as concentrações, foi avaliado o potencial migratório, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) das células e ensaios para verificar a atividade de metaloproteinases de matriz (MMP) -2 e -9 no período de 48h. Os resultados em UMR-106 mostraram que CE 80 µg/mL, ELT 160 µg/mL e FV 64 µg/mL reduziram a viabilidade celular ( $p < 0,05$ ). A fração FV 64 µg/mL inibiu a migração celular, diminuiu a produção de ROS e teve efeito na redução da atividade da MMP-2 com diferenças significativas quando comparadas ao controle e mostrou tendência na redução da atividade da MMP-9. A partir dos resultados obtidos, o CE e principalmente o FV apresentaram atividade antioxidante e efeito citotóxico sobre a linhagem celular testada.

**Palavras-chave:** *Myrcia bella*. Planta medicinal. Viabilidade Celular. Osteossarcoma.





---

## ABSTRACT

### **Evaluation of *Myrcia bella* in murine osteosarcoma cells: effect of the crude extract and fractions of ellagitannins and flavonoids.**

Osteosarcoma (OS) is the most common type of cancer that develops in bone tissue, characterized by the formation of abnormal osteocytes. Natural products are consistently emerging in the medical health field with promising therapeutic implications, due to drug resistance in the cure rate for chemotherapy in osteosarcoma. Medicinal plants make up part of biodiversity and have been used extensively throughout the existence of mankind. Among the medicinal species of note in the Cerrado is *Myrcia bella* Cambess, from the Myrtaceae family. Studies show that species of the genre *Myrcia* have been used in folk medicine as astringents, diuretics, in stopping bleeding, treating hypertension and *Diabetes mellitus* and also against gastric tumor cells. Phytochemical studies of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Myrcia bella* (MB), revealed of acetylated flavonoid heterosides derived from quercetin and myricetin, in addition to tannins derived from ellagic acid and gallic acid. Thus, MB has demonstrated a promising potential against several pathological alterations, requiring the understanding of its action and confirmation of safe concentrations. This study evaluated the effects of MB on UMR-106 osteosarcoma tumor cells (*in vitro*). Cell viability tests were carried out at different concentrations of crude extract (CE) of MB leaves and ellagitannin (ELT) and flavonoid (FV) fractions using differentiated pre-osteoblast (MC3T3-E1) as a control, and then determined concentrations, evaluated the migratory potential, production of reactive oxygen species from the cells (ROS) and assays to verify the activity of matrix metalloproteinases (MMP) -2 and -9 in the period of 48h. The results in UMR-106 showed that CE 80 µg/mL, ELT 160 µg/mL and FV 64 µg/mL reduced cell viability ( $p < 0.05$ ). The FV fraction 64 µg/mL inhibited cell migration, decreased the production of ROS and had an effect in reducing the activity of MMP-2 with significant differences when compared to the control and showed a tendency in reducing the activity of MMP-9. From the results obtained, the CE and mainly FV showed antioxidant activity and cytotoxic effect on the tested cell line.

**Keywords:** *Myrcia bella*. Medicinal plants. Cell Viability. Osteosarcoma.



---

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	ARTIGO.....	27
3	DISCUSSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS .....	67
	ANEXO.....	73



## 1 INTRODUÇÃO

---



## 1 INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OS), tipo mais comum de câncer ósseo, é o mais frequente tumor mesenquimal maligno causado por alterações genéticas e epigenéticas que interrompem a diferenciação de osteoblastos provenientes de células tronco mesenquimais, com alto potencial de destruição local e metástase (WALKLEY et al., 2008; BENJAMIN, 2015). Em geral, a incidência de OS na população é maior na adolescência, cuja incidência anual atinge um pico de 8 a 11 milhões por ano na faixa etária entre 15 e 19 anos de idade (RITTER; BIELACK, 2010).

Como os osteoblastos no osso normal, as células que formam este tipo de câncer produzem a matriz óssea, entretanto essa matriz não é tão forte quanto a dos ossos normais (CORREIA et al., 2013).

Algumas enzimas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs), se destacam por apresentarem algum papel no desenvolvimento ou progressão de neoplasias. As metaloproteinases de matriz são uma família de enzimas zinco-dependentes que degradam a matriz extracelular, consideradas como importantes facilitadoras para a invasão e disseminação tumoral (JUCÁ et al., 2008).

Devido à resistência aos medicamentos na taxa de cura na quimioterapia com osteossarcoma, há uma necessidade urgente de terapêutica melhorada/apurada, afim de atenuar ou superar a quimiorresistência, pois contribuirá significativamente para o tratamento da doença (XU, 2016).

Existem vários alopáticos eficazes e opções de tratamento disponíveis no mercado, mas todos apresentam algum tipo de efeito colateral. Portanto, há a necessidade de estratégias terapêuticas alternativas que possam não apenas melhorar o potencial terapêutico, mas também reduzir possíveis efeitos adversos. A busca por fitoquímicos aumentou devido ao seu potencial uso na terapia como antioxidantes ou drogas anticâncer, com implicações terapêuticas promissora. Entre eles, os compostos fenólicos formam o grupo principal. Uma classe de compostos bioativos, os flavonoides, foram testados contra várias doenças humanas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios neurológicos entre outras. Em vários cânceres humanos, os flavonoides são conhecidos como compostos eficazes por seu papel fundamental na apoptose, ciclo celular, angiogênese, metástase, inflamação e estresse oxidativo (KASHYAP et al., 2019; SANTOS et al., 2018).

Recentemente, o interesse pelos flavonoides tem aumentado devido a sua gama de efeitos farmacológicos, e a sua capacidade de inibir a atividade de algumas enzimas, além da sua atividade antioxidante. Os efeitos dos flavonoides são reconhecidos como potenciais candidatos para serem utilizados no tratamento de diversas doenças, como câncer, arteriosclerose, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer e doenças relacionadas com a idade. Todos os efeitos dos flavonoides estão parcialmente associados às propriedades de sequestro de radicais livres (SALDANHA, 2013). Estes compostos fenólicos são classificados por muitos estudos como inibidores de câncer por apresentarem atividades antioxidantes, controlar a proliferação celular, bloquear a angiogênese, modular enzimas do metabolismo carcinogênico e detoxificação de carcinógenos (PEREIRA et al., 2015).

Dentre as diversas plantas existentes no Brasil, uma das espécies que tem despertado interesse é a *Myrcia bella* Cambess (Myrtaceae), popularmente conhecida como “mercurinho”, uma espécie comum e importante em muitos fragmentos do Cerrado, distribuídos no estado de São Paulo, muitas delas com atividades biológicas relatadas. O gênero *Myrcia* pertence a uma classe fitoquímica de elevada importância terapêutica, sendo um dos maiores gêneros economicamente importante. Atividades anti-inflamatórias, antinociceptivas, antioxidantes e antimicrobianas foram descritas para os óleos essenciais de *Myrcia*, enquanto atividades anti-hemorrágicas, hipoglicêmicas e antioxidantes foram atribuídas aos extratos (CASCAES et al., 2015; SALDANHA, 2013).

Estudos de fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrcia bella*, revelaram uma grande quantidade de heterosídeos de flavonoides acetilados derivados de quercetina e miricetina (SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013), além de taninos derivados de ácido elágico e ácido gálico, o que atribui a esta espécie um grande potencial medicinal (MELO; DOKKEDAL; SALDANHA, 2017).

Espécies *Myrcia* têm sido utilizadas na medicina popular como adstringentes, diuréticos, tratamento do *Diabetes mellitus*, estancamento de hemorragias e no tratamento de hipertensão e úlceras (VAREDA, 2013).

Na família Myrtaceae, os fenólicos são os metabólitos secundários mais abundantes nas plantas. Esses compostos orgânicos são importantes antioxidantes de defesa sendo mais potentes que a vitamina C, E e os carotenoides (TAKAO; IMATOMIB; GUALTIERIA, 2015).



Para muitos grupos étnicos e comunidades, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, na maioria das vezes, o único recurso terapêutico, sendo comercializadas livremente em feiras ou mercados. Contudo, esse uso indiscriminado apresenta um alto risco, pois pouco se sabe sobre suas propriedades farmacológicas e toxicidade (RINALDO, 2010).

Dentre os requisitos fundamentais para o registro de medicamentos fitoterápicos, deve-se ter o conhecimento da composição química e da atividade farmacológica da planta, para que se possa estabelecer critérios e metodologias para análise, controle de qualidade e preparo de formulações fitoterápicas (ANVISA, 2010; SALDANHA, 2013).

Devido à falta de estudos sobre os efeitos de *M. bella* em células de osteossarcoma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das diferentes concentrações do extrato bruto e frações de elagitaninos e flavonoides de *M. bella* em células de osteossarcoma (*in vitro*). Esta dissertação é apresentada na forma de um artigo.







**2 ARTIGO**

O artigo apresentado nesta dissertação foi escrito de acordo com as instruções e diretrizes do *Journal of Ethnopharmacology* para submissão.

**Avaliação de *Myrcia bella* em células de osteossarcoma murino: efeito do extrato bruto e frações de elagitaninos e flavonoides**

Vanessa Svizzero Fakhoury<sup>a</sup>, Adriano de Souza Pessoa<sup>a</sup>, Cintia Kazuko Tokuhara<sup>a</sup>, Ana Lígia Pagnan<sup>a</sup>, Gabriela Silva Neubern de Oliveira<sup>a</sup>, Mariana Rovis Sanches Liessa<sup>a</sup>, Kelly Karina Inacio<sup>a</sup>, Luiz Leonardo Saldanha<sup>b</sup>, Anne Lígia Dokkedal<sup>b</sup>, Rodrigo Cardoso de Oliveira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Brasil.

\*Autor correspondente: Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, Brasil.

Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, 17012-901, Bauru, São Paulo, Brasil.

Telefone: +55-14-35358346; Fax: +55-14-32271486

Endereço de Email: rodrigocardoso@usp.br

## Resumo

**Relevância etnofarmacológica:** As plantas medicinais são consideradas a matéria-prima para a fabricação de medicamentos fitoterápicos e outras drogas, sendo uma estratégia medicinal alternativa no alívio e na cura de doenças. Uma das espécies do Cerrado que tem despertado interesse entre os pesquisadores é a *Myrcia bella* Cambess (Myrtaceae), conhecida popularmente como “mercurinho”. O gênero *Myrcia* são utilizadas na medicina popular como adstringentes, diuréticos, coagulantes e para o tratamento de doenças como *Diabetes mellitus*, hipertensão e úlceras gástricas. As plantas medicinais possuem muitos produtos naturais, como os flavonoides, que demonstraram atividades antioxidantes significativas. No entanto, não há investigações de seu papel na toxicidade de células tumorais ósseas.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do extrato bruto (CE) e frações de elagitaninos (ELT) e flavonoides (FV) das folhas de *M. bella* em uma linhagem de osteossarcoma murino UMR-106 (*in vitro*).

**Materiais e métodos:** A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT e cristal violeta para a linhagem controle MC3T3-E1 e a linhagem de osteossarcoma murino UMR-106. Após determinadas as concentrações, foi avaliado a capacidade de inibição do potencial migratório, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ensaios para verificar a atividade da metaloproteinase da matriz (MMP) -2 e -9 quando em contato com o extrato bruto e as frações nas células tumorais UMR-106 no período de 48 horas.

**Resultados:** Os resultados em UMR-106 mostraram que CE 80 µg/mL, ELT 160 µg/mL e FV 64 µg/mL reduziram a viabilidade celular ( $p < 0,05$ ). Além disso, CE e especialmente FV inibiram a migração celular, diminuíram a produção de EROs, reduziram a atividade da MMP-2 e tenderam à redução na atividade da MMP-9. A partir dos resultados obtidos, o CE e principalmente o FV em sua maior concentração apresentaram atividade antioxidante e efeito citotóxico sobre a linhagem celular testada.

**Conclusão:** *Myrcia bella* é uma fonte rica de compostos fenólicos e sua fração de flavonoides heterosídeos demonstrou efeitos citotóxicos em células de osteossarcoma murino, preservando a viabilidade dos osteoblastos normais. Devido à sua capacidade antioxidante, o flavonoide pode ser uma nova estratégia terapêutica para o câncer.

**Palavras-chave:** *Myrcia bella*. Plantas medicinais. Viabilidade celular. Osteossarcoma.

## 1. Introdução

O osso é um tecido conjuntivo especializado composto por três tipos celulares diferentes, como osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. A interação entre eles é equilibrada através dos processos de formação e remodelação óssea, regulando a produção e a atividade biológica de muitos fatores e componentes solúveis da matriz extracelular necessários para manter a homeostase óssea em termos de proliferação, diferenciação e apoptose celular. O osteossarcoma (OS) aparece como resultado de eventos oncogênicos pouco definidos que surgem em precursores da linhagem osteogênica (Alfranca et al., 2015).

O osteossarcoma é o tumor ósseo maligno primitivo mais frequente, principalmente em adolescentes e adultos jovens em todo o mundo. O tumor tem um crescimento agressivo nos locais primários e metastatiza-se para outros órgãos. Os efeitos colaterais significativos dos medicamentos quimiopreventivos e o desenvolvimento de resistência à quimioterapia comprometem seriamente os esforços de tratamento. Assim, é essencial o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do osteossarcoma (Liu et al., 2017).

Houve um avanço no desenvolvimento de drogas antitumorais capazes de bloquear vias específicas de sinalização celular nos últimos anos. Pesquisas em busca de novos medicamentos com atividades antitumorais e efeitos colaterais reduzidos têm sido de grande relevância. No entanto, ainda existe uma gama de tumores que não respondem bem às terapias propostas (Rodrigues et al., 2017).

Durante décadas, muitas plantas medicinais têm sido usadas como chás, remédios em pó ou extratos alcoólicos. Estudos de farmacognosia permitiram a descoberta de um número vasto de novas moléculas e seus mecanismos de ação. Pesquisas científicas modernas confirmaram a importância das moléculas das plantas medicinais e a capacidade dos extratos de trabalhar em sinergia com todos os componentes, com foco na melhoria da eficácia e segurança de seus usos. Em paralelo, o controle de qualidade da produção levou à descoberta de novas moléculas e extratos padronizados, permitindo assim, um amplo repertório de medicamentos à base de plantas medicinais. Nos últimos anos, as plantas medicinais foram utilizadas

devido ao seu potencial anticarcinogênico e quimioprotetor. Além dessas propriedades notáveis, essas plantas possuem agentes antineoplásicos, antitumorais e antiproliferativos menos tóxicos do que as terapias tradicionais (Gezici e Sekeroglu, 2019; Colalto, 2018).

Os extratos vegetais são uma fonte relevante de estudos relacionados à prevenção e ao tratamento de doenças. Resultados promissores na avaliação de extratos brutos de plantas direcionaram a busca para os componentes ativos responsáveis por suas atividades biológicas e farmacológicas (Machado et al., 2016; Matos et al., 2019). A interação entre compostos bioativos no extrato, em alguns casos, é responsável por sua atividade biológica (Serpeloni et al., 2015).

Agentes derivados de fontes naturais, nos últimos 25 anos, ganharam considerável atenção de pesquisadores e médicos devido à sua segurança, eficácia e pela sua disponibilidade imediata. Nos últimos 30 anos, pelo menos 70% de todos os medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) foram originários de fontes naturais (Gupta et al., 2013).

Popularmente conhecida como "mercurinho", *Myrcia bella* Cambess (Myrtaceae) é uma planta importante e comum, nativa do Cerrado brasileiro. As folhas desta planta são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de Diabetes e distúrbios gastrointestinais. Estudos farmacológicos demonstraram as propriedades citotoxicidade, antimicrobiana e antidiabética dos extratos hidroalcoólicos de suas folhas. Os compostos fenólicos foram relacionados à bioatividade em todos esses estudos (Saldanha et al., 2020). Myrtaceae é um dos gêneros mais ricos e consiste em cerca de 133 gêneros e mais de 3800 espécies, muitas com atividades biológicas relatadas (Varela et al., 2014).

Estudos de fitoquímica do extrato hidroalcoólico de folhas de *M. bella* revelaram uma grande quantidade de heterosídeos de flavonoides acetilados derivados de quercetina e miricetina (Saldanha et al., 2013), além de taninos derivados do ácido elágico e ácido gálico, que atribui a esta espécie um grande potencial medicinal (Melo et al., 2017).

Assim, devido aos resultados promissores que a *M. bella* tem apresentado e aos seus componentes químicos presentes, este estudo avaliou os efeitos de diferentes concentrações de extrato bruto e frações de elagitaninos e flavonoides nas células tumorais do osteossarcoma (*in vitro*).



## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Material vegetal**

Os extratos de *Myrcia bella* foram gentilmente fornecidos pelo grupo de laboratório da Prof. Dra. Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Bauru, Brasil. Amostras de folhas de *Myrcia bella* foram coletadas na Área de Preservação Ambiental do Jardim Botânico Municipal de Bauru (20°08.0 "S 49 ° 00'30.4" W). Ramos férteis foram utilizados para identificação e depositados no Herbário da UNESP em Bauru (UNBA) sob o código número 5508. O extrato hidroalcoólico padronizado (EtOH 70%) utilizado no presente estudo foi produzido por percolação e caracterizado quimicamente por análise HPLC-PDA-MS baseada em dados, conforme descrito por Saldanha et al. (2013).

### **2.2. Cultura de células**

Para a expansão celular, pré-osteoblastos de camundongos MC3T3-E1 e osteoblastos de osteossarcoma de ratos UMR-106 (ATCC® - CRL-1661), adquiridos comercialmente pela *American Type Culture Collection* (ATCC® - CRL-2593), foram respectivamente cultivados em Meio Essencial Mínimo Eagle - Modificação Alfa ( $\alpha$ -MEM) ( $\alpha$ -MEM) (Gibco, Thermo-Scientific) e Meio Eagle Modificado de Dulbecco – alta glicose (DMEM) (Sigma-Aldrich), suplementada com soro fetal bovino a 10% (FBS, Gibco) e 1% de penicilina 10.000 UI/estreptomicina 0,060 g/L (Gibco). Para a subcultura, foram incubados com tripsina (0,25%) por 5 minutos a 37°C, seguido pela inativação da tripsina com meio contendo 10% de SFB. Após centrifugação a 1.200 rpm por 5 minutos, o *pellet* foi ressuspenso no meio respectivo e as células foram cultivadas em garrafas para outros ensaios. As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os materiais plásticos para cultura de células foram obtidos na Greiner Bio-One (Frickenhausen Alemanha).

#### **2.2.1. Diferenciação da linhagem MC3T3-E1**

O controle celular MC3T3-E1 é uma linhagem pré-osteoblástica murina e a linhagem celular tumoral (UMR-106) é osteoblástica. Para comparar as duas

linhagens celulares, induzimos a diferenciação de MC3T3-E1 com meio osteogênico (meio de cultura  $\alpha$ -MEM + 10% SBF + 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico + 10mM  $\beta$ -glicerofosfato) por 4 dias (Quarles et al., 1992).

## 2.3. Ensaios de viabilidade celular

### 2.3.1. Redução do MTT

Os dados de viabilidade celular foram obtidos através da análise da atividade mitocondrial, realizada pelo método de redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich).

A linhagem celular UMR-106 foi plaqueada a uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço em placa de 96 poços (TPP®) e incubada por 48h para adesão. Para a linhagem celular MC3T3-E1, as células foram plaqueadas a uma densidade de  $5 \times 10^2$  células/poço em placa de 96 poços, mantidas por 24h a 37°C e diferenciadas com meio osteogênico por 4 dias. Após o período de adesão e diferenciação, o meio de cultura foi substituído pelo meio contendo diferentes concentrações de *M. bella* do Extrato bruto (CE) (10, 20, 40 e 80  $\mu$ g/mL); Elagitanino (ELT) (20, 40, 80 e 160  $\mu$ g/mL) e Flavonoide (FV) (8, 16, 32 e 64  $\mu$ g/mL) além do grupo Controle (meio + NaOH 0,5 mol/L). As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL) por 4 horas a 37°C. A solução de MTT foi então substituída por dimetilsulfóxido (DMSO); Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) por 30 min. A absorbância foi determinada a 550 nm utilizando um leitor de microplacas (*Synergy™ MXBased Monochromator, Bio-Tek, Winooski, VT, USA*) (Matos et al., 2019).

### 2.3.2. Cristal Violeta

O ensaio de cristal violeta é responsável pela coloração dos ácidos nucleicos das células (Kueng et al., 1989). A linhagem celular UMR-106 foi plaqueada a uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço em placa de 96 poços (TPP®) e incubada por 48h para adesão. Para a linhagem celular MC3T3-E1, as células foram plaqueadas a uma densidade de  $5 \times 10^2$  células/poço em placa de 96 poços, mantidas por 24h a 37°C e diferenciadas com meio osteogênico por 4 dias. Após o período de adesão e

diferenciação, o meio de cultura foi substituído pelo meio contendo diferentes concentrações de *M. bella* de Extrato bruto (CE) (10, 20, 40 e 80 µg/mL); Elagitaninos (ELT) (20, 40, 80 e 160 µg/mL) e Flavonoides (FV) (8, 16, 32 e 64 µg/mL), além do grupo Controle (meio + NaOH 0,5 mol/L) por 48h. O meio de cultura de todos os grupos foi removido e as células foram lavadas duas vezes com a solução de PBS 1X. A solução de coloração de cristal violeta (0,5%) foi então adicionada e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada com água de torneira até o cristal ser completamente removido. A placa foi deixada aberta durante a noite para secagem completa. Após a secagem, foi adicionado metanol para a solubilização de cristais e, em seguida, a placa foi deixada agitando à temperatura ambiente por 20 minutos. A absorbância foi determinada a 570 nm (Feoktistova et al., 2016) (*Synergy™ MXBased Monochromator, Bio-Tek, Winooski, VT, USA*).

#### **2.4. Coloração Hematoxilina-Eosina**

As células foram plaqueadas a uma densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço para UMR-106 por 48h e para MC3T3-E1 a uma densidade de  $5 \times 10^2$  células/poço mantidas por 24 horas a 37°C e diferenciadas com meio osteogênico por 4 dias, ambos em lamínulas (13 mm de diâmetro) em uma placa de 24 poços. O meio de cultura foi removido e substituído pelo meio com tratamentos (CE 80 µg/mL, ELT 160 µg/mL, FV 64 µg/mL), além do grupo controle com meio de cultura + NaOH 0,5 mol/L mantido por 48h. As células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com formalina 10% durante 30 minutos. Após a fixação, os poços foram lavados por três vezes com PBS 1X. Em seguida, as células foram coradas com hematoxilina por 3 minutos e sujeitas a separação de cores com álcool-ácido a 0,5%. Adicionou-se então eosina a 1% por 2 minutos e as células foram desidratadas com um gradiente de etanol, embebidas em xileno e montadas com Entellan®. Após a coloração, as células foram cuidadosamente observadas usando um microscópio óptico invertido. As imagens representativas foram capturadas usando o microscópio Olympus U-TV0.5XC-3 (Olympus, Tóquio, Japão) com ampliação de 20X e classificadas de acordo com Salomão et al. (2017).

## 2.5. Migração Celular (*Wound healing assay*)

A migração celular é um fenômeno essencial para processos de invasão e metástase. Quando uma fenda é feita na monocamada celular na placa, as células com alta capacidade migratória ultrapassam essa linha, possibilitando o estudo de drogas que possam interferir nesse mecanismo (Brito et al., 2005).

O ensaio de migração celular foi baseado no modelo descrito por Andrade Carvalho et al. (2013), com adaptações. As células UMR-106 foram plaqueadas a uma densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/poço em placas de 12 poços e tratadas nas concentrações CE 80  $\mu\text{g/mL}$ , ELT 160  $\mu\text{g/mL}$ , FV 64  $\mu\text{g/mL}$  e meio + NaOH 0,5 mol/L sem a adição de compostos foi usada como controle. As células foram mantidas em estufa por 72 horas para adquirir confluência total. Em seguida, os poços foram tratados com 5  $\mu\text{g/mL}$  de mitomicina C (Sigma-Aldrich) por 2 horas. O pré-tratamento com mitomicina C garante que as células estejam migrando e não proliferando. Os poços foram lavados com PBS 1X e foi realizado uma fenda no sentido vertical da monocamada com ponteira de 1000  $\mu\text{L}$ . Os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X, acrescentado meio de cultura suplementado com 10% SFB, contendo CE 80  $\mu\text{g/mL}$ , ELT 160  $\mu\text{g/mL}$ , FV 64  $\mu\text{g/mL}$ . O meio com NaOH 0,5 mol/L sem adição de compostos foi usado como controle. Após 0 horas (imediatamente após a realização da fenda) e 72 horas de exposição aos compostos as placas foram fotografadas utilizando microscópio de contraste de fase acoplado à câmera digital *Olympus U-TV0.5XC-3*, com objetiva de 4X. O ensaio foi realizado em triplicata biológica. A porcentagem (%) de área da fenda foi calculada pelo *Software ImageJ* e a porcentagem (%) da área fechada da fenda foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ Área fechada da fenda} = \frac{(\%A_0 - \%A_{72})}{\%A_0} \times 100$$

Onde a  $\%A_0$  é a porcentagem da área da fenda no tempo 0 horas e  $\%A_{72}$  é a porcentagem da área da fenda em 72 hours.

## 2.6. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares

As células UMR-106 foram plaqueadas a uma densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> com adesão das células por 24 horas. Os radicais intracelulares foram medidos tratando-os com extrato bruto e frações de elagitaninos e flavonoides de *M. bella* (80, 160 e 64 µg/mL, respectivamente) ou deixando-os sem tratamento (controle). As células foram então carregadas com diacetato de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA; Sigma-Aldrich) (Brubacher e Bols, 2001). O sinal de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) foi analisado incubando as células com 10 µg/mL de DCFH-DA em PBS por 30 min a 37°C no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas novamente e a intensidade da fluorescência foi medida em espectrofotômetro com excitação de 495nm e emissão 530nm (*Synergy™ Mx*). Realizou-se triplicata biológica experimental. Os dados obtidos foram expressos em unidade de fluorescência relativa (RFU) (Matos et al., 2019).

## 2.7. Ensaio de zimografia

A zimografia é um método não quantitativo amplamente utilizado para avaliar perfis de proteinase (Leonard et al., 2018). Neste estudo, foi avaliado a atividade das MMP-2 e MMP-9, principais grupo de enzimas responsáveis pela degradação do colágeno. As células UMR-106 foram plaqueadas a uma densidade de  $2 \times 10^6$  em placas de Petri de 10 cm e tratadas com CE 40, 80 µg/mL, ELT 80, 160 µg/mL, FV 32, 64 µg/mL e meio + NaOH 0,5 mol/L sem a adição de compostos foi utilizado como controle. Após o período de 48 horas, os sobrenadantes foram coletados. O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Amostras de proteínas (50 µg), padrões de peso molecular e proteínas metaloproteinase -2 e -9 da matriz recombinante humana (hrMMP-2 e hrMMP-9) (Calbiochem-Merck, Darmstadt, Alemanha) foram submetidas a eletroforese em géis de poliacrilamida Tris-cloreto de hidrogênio (HCl) a 10% (Matsuda et al., 2014). Os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 (0,1%) e digitalizados usando um instrumento *Loccus* Biotecnologia DS-600. As densidades relativas de degradação do gel foram determinadas por análise

de densitometria usando o software Image J (National Institutes of Health, NIH Image). Foram realizados três géis de experimentos independentes (n=3).

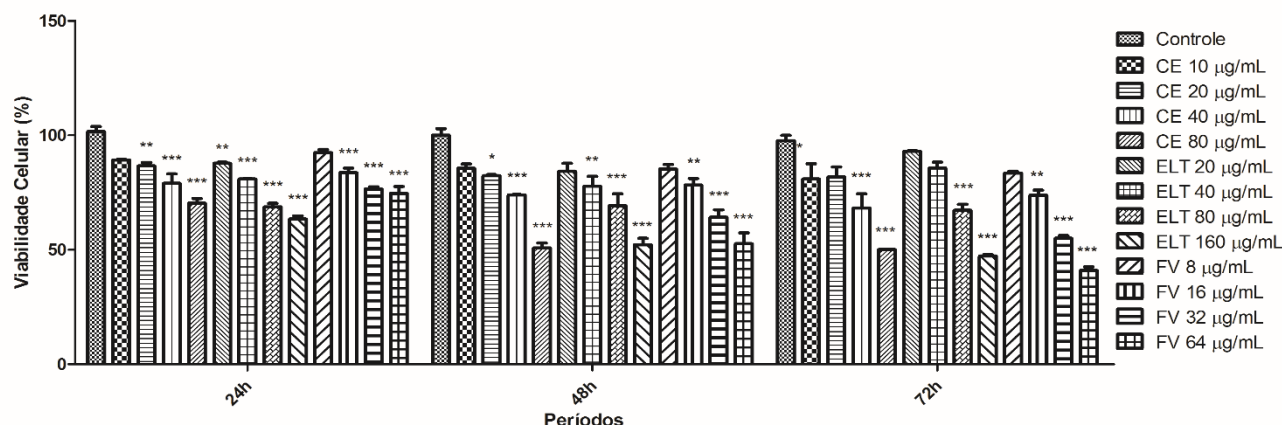
## 2.8. Análise Estatística

Os dados foram apresentados em média e desvio-padrão. Análises entre três ou mais grupos experimentais foram submetidos ao teste estatístico *one-way* ANOVA complementado pelo teste de *Tukey*. Para todas as análises e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos foram realizados usando GraphPadInStat e Prism (GraphPad, San Diego, CA).

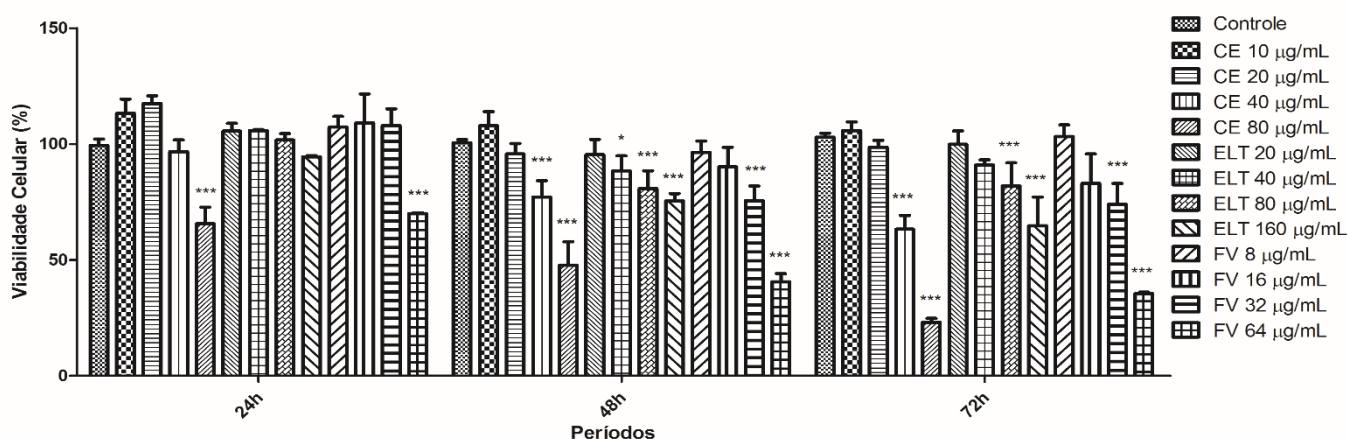
## 3. Resultados

### 3.1. Fração flavonoide e extrato bruto de *M. bella* diminuem a viabilidade de osteoblastos de osteossarcoma de maneira dose-dependente

As **Fig. 1** e **2** demonstram o efeito das diferentes concentrações de extrato bruto (CE) e frações de elagitanino (ELT) e flavonoide (FV) de *M. bella* no valor da viabilidade do ensaio MTT das linhagens MC3T3-E1 e UMR-106, respectivamente. Para a produção de gráficos e análise estatística de ambas as linhagens, foi calculada a média de três experimentos isolados (triplicata biológica) para MTT e cristal violeta. Comparações da análise estatística foram feitas individualmente por períodos.

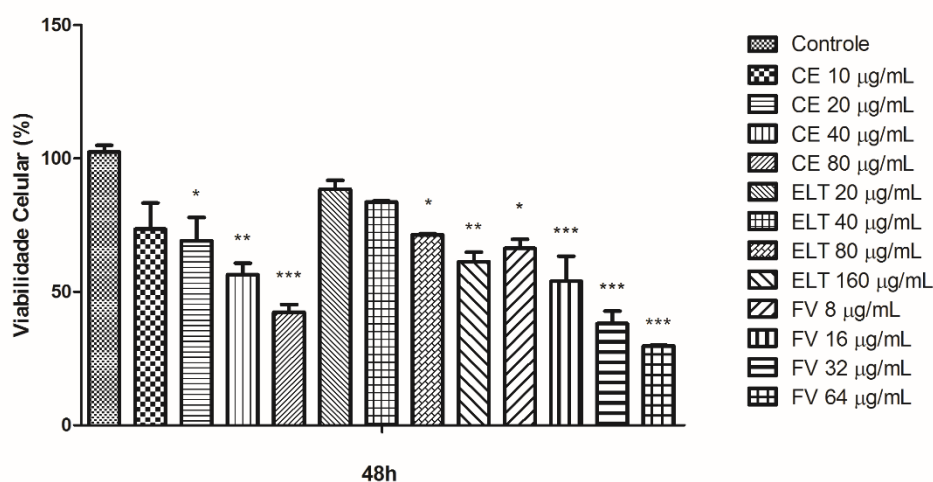


**Fig. 1.** Gráfico referente à média da triplicata biológica do teste de redução do MTT. Efeito do extrato bruto e frações na viabilidade celular da linhagem MC3T3-E1 após exposição por 24, 48 e 72h. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  representam diferenças estatísticas quando comparadas ao controle. (CE: Extrato bruto; ELT: Elagitanino; FV: Flavonoide).

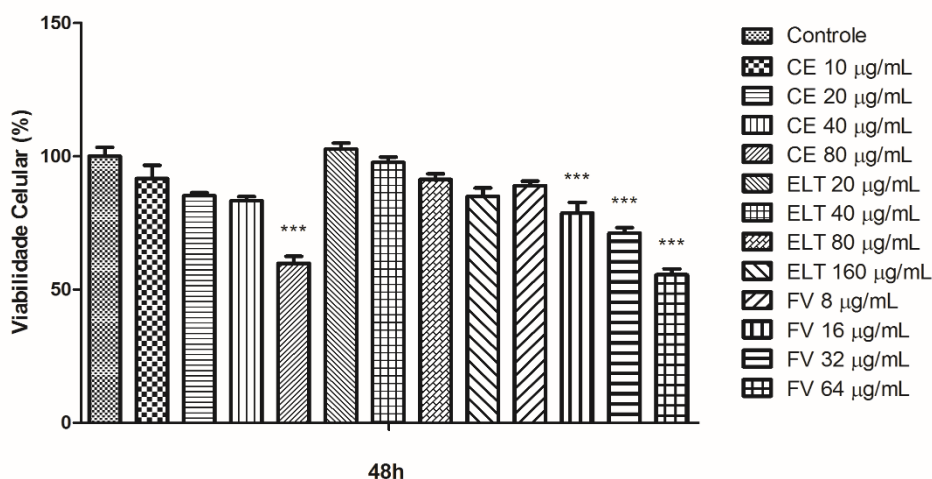


**Fig. 2.** Gráfico referente à média da triplicata biológica do teste de redução do MTT. Efeito do extrato bruto e frações na viabilidade celular da linhagem UMR-106 após exposição por 24, 48 e 72h. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  representam diferenças estatísticas quando comparadas ao controle. (CE: Extrato bruto; ELT: Elagitanino; FV: Flavonoide).

A análise da redução do MTT demonstrou que a linhagem UMR-106 apresentou diminuição na viabilidade celular nos períodos de 24h e 48h para as maiores concentrações dos compostos quando comparada ao controle, e no período de 72h houve uma diminuição ainda mais significativa na viabilidade celular. Além disso, quando comparada a linhagem controle MC3T3-E1, a diminuição da viabilidade é maior para a linhagem tumoral, mostrando diferenças estatísticas ( $p<0,05$ ). Os compostos em geral promoveram uma redução na viabilidade celular de maneira concentração-dependente, com ênfase no extrato bruto e na fração flavonoide.



**Fig. 3.** Gráfico referente à média da triplicata biológica do teste cristal violeta. Efeito do extrato bruto e frações na viabilidade da linhagem MC3T3-E1 após exposição por 24, 48 e 72h. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  representam diferenças estatísticas quando comparadas ao controle. (CE: Extrato bruto; ELT: Elagitanino; FV: Flavonoide).



**Fig. 4.** Gráfico referente à média da triplicata biológica do teste cristal violeta. Efeito do extrato bruto e frações na viabilidade da linhagem UMR-106 após exposição por 24, 48 e 72h. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  representam diferenças estatísticas quando comparadas ao controle. (CE: Extrato bruto; ELT: Elagitanino; FV: Flavonoide).

O período escolhido para as próximas análises através do ensaio de viabilidade MTT foi o de 48 horas pelo mecanismo de sua resposta.

Em relação ao cristal violeta, nas **Fig. 3 e 4**, ambas as linhagens sofrem aumento no dano em DNA nas maiores concentrações dos compostos no período de 48 horas, assim como na redução do MTT.

Os resultados aqui apresentados demonstraram que o extrato bruto e a fração flavonoide induzem citotoxicidade e danos ao DNA nas células da linhagem UMR-106.

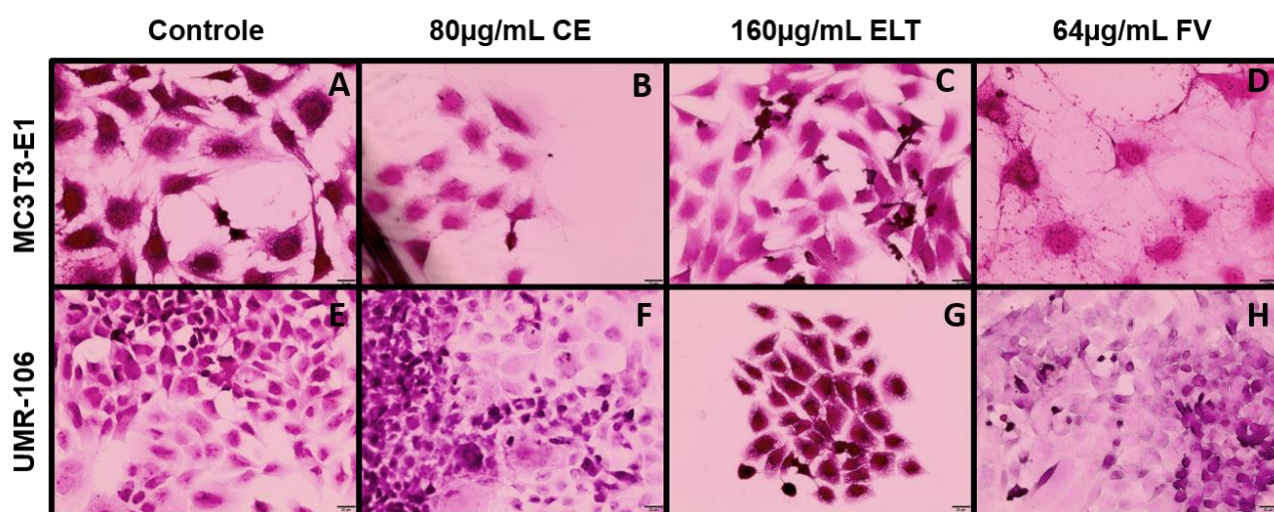
### 3.2. Coloração Hematoxilina-Eosina

Para a análise morfológica por coloração de Hematoxilina e Eosina, as células foram submetidas aos tratamentos e incubadas por 48 horas. As imagens capturadas de cada grupo são mostradas na **Fig. 5**. Em relação a morfologia celular da UMR-106, em comparação com o grupo controle, as células tratadas com CE apresentam uma diminuição dos núcleos e o formato apresenta irregularidades. Com o ELT houve um aumento no tamanho e as células estão mais espaçadas do que no controle; com o FV, as células mostraram uma leve diminuição no núcleo, aparentemente apresentando mais citoplasma de células na imagem do que uma célula inteira, não apresentando mais uma morfologia padrão.



Em relação à morfologia celular da MC3T3-E1, comparada ao grupo controle, aparentemente o CE não alterou a morfologia. No grupo tratado com ELT, as células aparentam estar mais esticadas, mas essa também é uma pequena diferença comparada ao controle. O grupo de células tratadas com FV apresentou alteração morfológica e, aparentemente, ocorreu degradação celular.

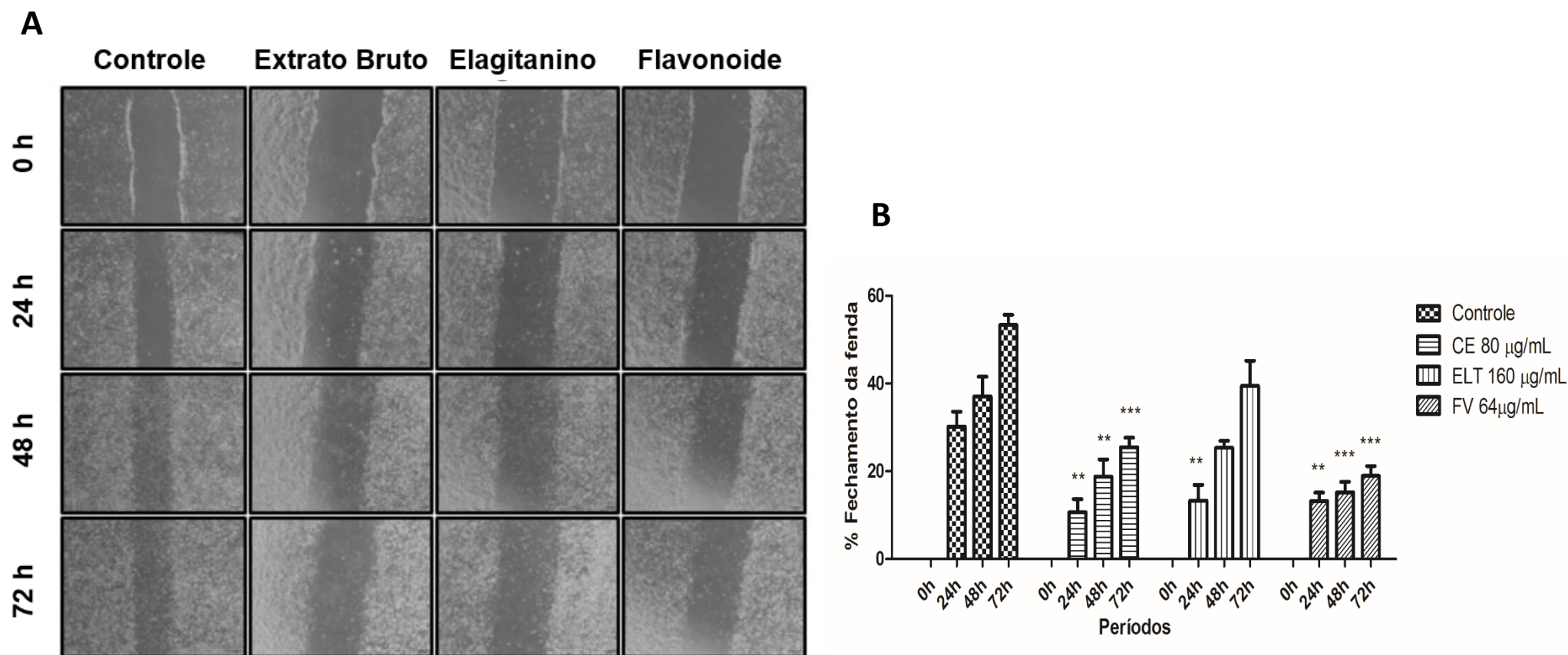
A fração FV aparentemente promoveu uma redução no número de células em ambas as linhagens celulares, entretanto mais característico na UMR-106 do que na MC3T3-E1.



**Fig. 5.** Microscopia dos grupos celulares tratados. Osteoblastos normais (MC3T3-E1 diferenciada) e tumorais (UMR-106): (A) MC3T3-E1 controle com NaOH; (B) MC3T3-E1 80 µg/mL CE, (C) MC3T3-E1 160 µg/mL ELT, (D) MC3T3-E1 64 µg/mL FV, (E) UMR-106 controle com NaOH, (F) UMR-106 80 µg/mL CE, (G) UMR-106 160 µg/mL ELT e (H) UMR-106 64 µg/mL FV. Coloração de Hematoxilina-Eosina e magnificação de 20X.

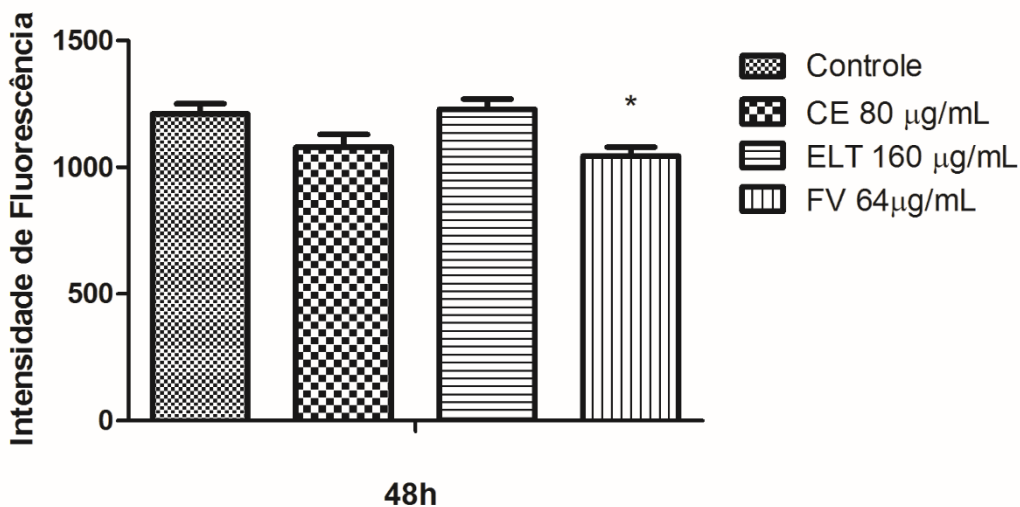
### 3.3. Eficácia da porção flavonoide na inibição da migração celular

De acordo com a **Fig. 6** os resultados obtidos permitem observar que após o tempo de incubação de 24 horas nas concentrações de CE 80µg/mL, ELT 160µg/mL e FV 64µg/mL as células fecharam a fenda em 10,61%, 13,25% e 13,15% em comparação com o controle, respectivamente. Em 48 horas, nas mesmas concentrações de CE, ELT e FV descritas houve o fechamento em 18,7%, 25,33% e 15,15% da fenda em comparação com o controle, respectivamente. No período de 72 horas, as concentrações de CE, ELT e FV promoveram o fechamento em 25,46%, 39,44% e 18,95% da fenda em comparação com o controle, respectivamente. Para o controle, nos períodos de 24h, 48h e 72h, o fechamento da fenda foi de 30,19%, 37,01% e 53,31%, respectivamente.



**Fig. 6.** Imagens representativas do ensaio de migração celular da linhagem UMR-106, tratadas ou não com Extrato Bruto, frações de Elagitanino e Flavonoide após os períodos de 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento **(A)** em comparação com o Controle. Gráfico da porcentagem de fechamento da fenda **(B)**. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  representam diferenças estatísticas quando comparado ao controle.

### 3.4. Flavonoides e espécies reativas de oxigênio (EROs)



**Fig. 7.** Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após exposição ao extrato de *M. Bella*. Os níveis intracelulares de EROs foram medidos pela sonda DCFH-DA após 48h de tratamento com extrato bruto e frações. \* $p < 0,05$ , comparadas às células de controle.

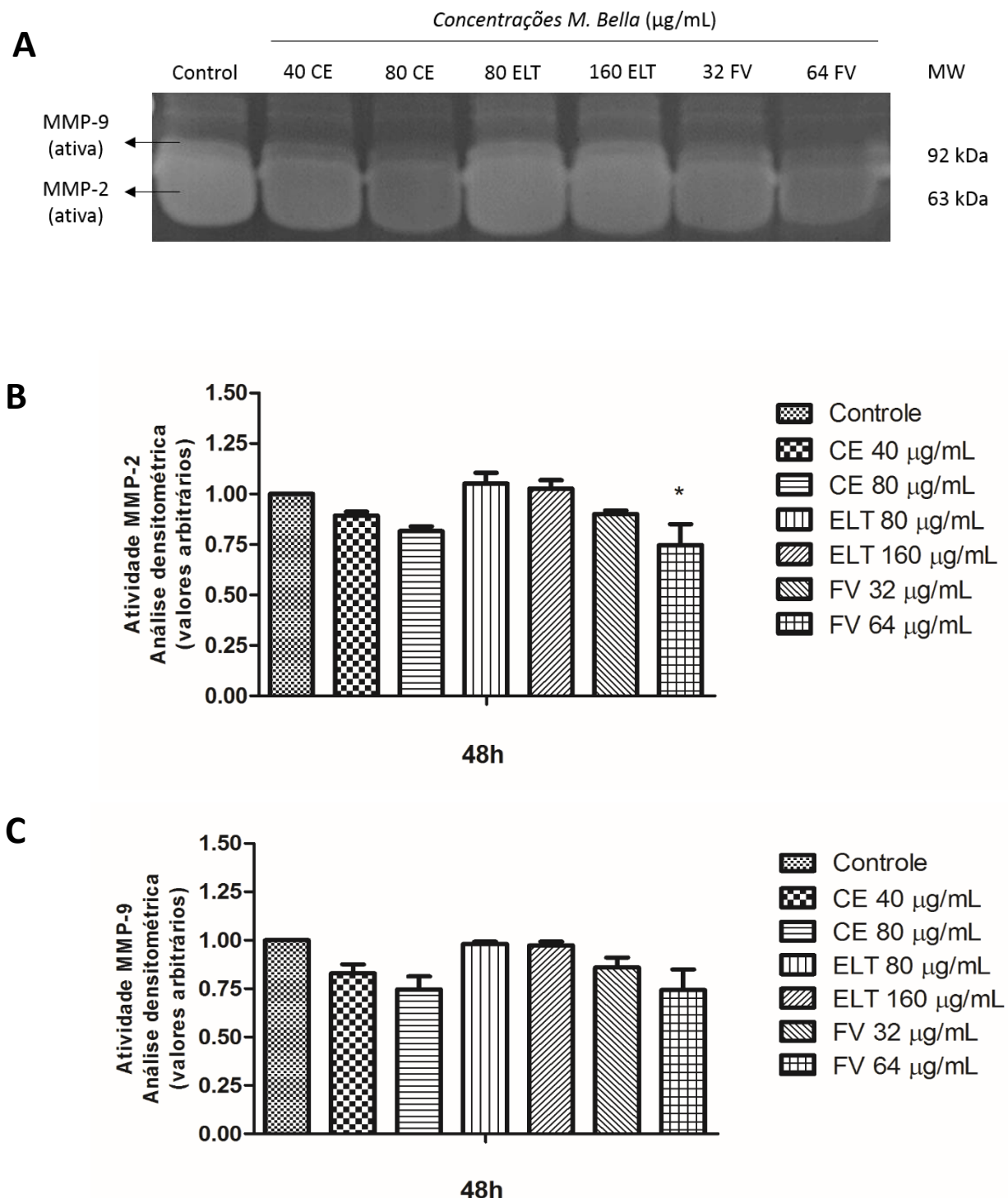
Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula tumoral foram medidos como é mostrado na **Fig.7**. Os níveis de fluorescência obtidos após o tratamento com o extrato bruto e frações foi comparado com o controle para avaliar sua atividade oxidante.

A concentração de FV 64 µg/mL aparentemente induziu um efeito antioxidante quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Contudo, também houve redução na intensidade de fluorescência no extrato bruto, porém sem apresentar diferenças significativas quando comparada ao controle.

### 3.5. Atividade de MMP 2 e 9

Uma forma de avaliar o papel de MB nos processos de metástase foi pelo ensaio da atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs) -2 e 9 por meio da técnica de zimografia em células UMR-106 (**Fig. 8**). O status de ativação das MMP-2 e -9 também foi avaliado, uma vez que a forma ativa da MMP-2 pode ser distinguida por seu peso molecular (MW) a 63 kDa e MMP-9 a 92 kDa. Quanto maior a área de degradação do gel, maior a atividade da metaloproteinase. A fração FV 64 µg/mL teve efeito na redução da atividade da MMP-2 com diferença significativa quando

comparada ao controle e mostrou tendência à redução da MMP-9, não mostrando diferenças significativas em relação ao controle.



**Fig. 8.** Efeito do extrato e frações de *Myrcia bella* nas MMP-2 e MMP-9. (A) Gel representativo das MMP-2 e 9 demonstrado pelo ensaio de zimografia em 48h; (B) Análise densitométrica contendo número arbitrário relacionado à MMP-2 ativa; (C) Análise densitométrica contendo número arbitrário relacionado à MMP-9 ativa. Os dados mostrados são de um experimento representativo realizado em triplicata em comparação com o controle.

#### 4. Discussão

Os produtos naturais sempre contribuíram extensivamente para o desenvolvimento da medicina moderna e ainda continuam a desempenhar um papel crucial na descoberta de novos medicamentos. O Brasil possui cerca de 10% da flora mundial, e, menos de 1% de suas espécies vegetais foram investigadas por propriedades químicas ou farmacológicas. (Sen and Samanta, 2014).

Os vegetais representam as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser utilizadas como alvos terapêuticos, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos e por ser a fonte mais antiga de medicamentos para o homem. As plantas medicinais e seus compostos podem oferecer novos agentes terapêuticos antineoplásicos e assim desempenhar papéis importantes na descoberta de agentes anticâncer eficazes e clinicamente úteis, apresentando menos efeitos colaterais por serem menos tóxicos. Pesquisas baseadas em estudos etnobotânicos aumentaram devido à necessidade de novos produtos com alta atividade terapêutica, baixa toxicidade, boa biocompatibilidade e que possuam um custo acessível (Brandao et al. 2010; Gezici and Sekeroglu, 2019).

A Myrtaceae é uma importante família do Cerrado brasileiro, com mais de 1.000 espécies em todo o país e *Myrcia*, com 350 espécies, é um dos gêneros mais ricos. Plantas do gênero *Myrcia* são utilizadas na medicina popular no Brasil como adstringentes, diuréticos, coagulantes e no tratamento de doenças como hipertensão e úlceras gástricas. Eles abrigam um grande número de espécies endêmicas, incluindo *Myrcia bella* Cambess (MB). As folhas MB têm sido utilizadas na medicina popular brasileira para diversos fins e também são exploradas comercialmente como fitoterápicos no tratamento do diabetes mellitus. (Saldanha et al., 2013).

Vareda et al., 2014 confirmou que extratos de folhas de MB possui propriedades hipoglicêmicas e possivelmente atua na regulação da captação de glicose pelo fígado.

A família Myrtaceae é uma das famílias mais importantes encontradas nos trópicos úmidos. *Myrcia* é uma espécie do gênero Myrtaceae que inclui arbustos e pequenas árvores, que são descritas como uma importante fonte de óleos essenciais. Deve-se destacar que alguns extratos de Myrtaceae, especificamente os de *Myrcia tomentosa*, já foram analisados como agentes antimicrobianos. *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. é uma espécie amplamente utilizada na medicina tradicional da América

do Sul para o tratamento do *Diabetes mellitus*. Estudos farmacológicos demonstraram que o extrato de folha de *Myrcia fallax* (Rich.) DC mostrou atividade contra células cancerosas, além de atividade antidiabética (Saldanha, 2013; Santos et al., 2018).

Neste estudo, avaliamos os possíveis efeitos citotóxicos de uma gama de concentrações de extrato bruto e frações em células normais (MC3T3-E1) e células tumorais (UMR-106). As células tumorais eram mais sensíveis do que as células normais, portanto, é importante selecionar as concentrações que matam células tumorais, mas não induzem distúrbios na homeostase das células saudáveis. O ensaio MTT detecta alterações na integridade mitocondrial e na sua capacidade de exercer suas funções celulares (Bernhard et al., 2003), e neste ensaio, foi possível observar que os compostos em geral promoveram redução da viabilidade celular com o aumento da concentração, com destaque para o extrato bruto e a fração flavonoide. Em relação aos resultados do teste colorimétrico cristal violeta, os resultados também demonstraram que o extrato bruto e a fração flavonoide induziram citotoxicidade e danos ao DNA de células da linhagem UMR-106.

O FV apresentou mudanças na redução celular em ambas as linhagens, entretanto mais característico na linhagem UMR-106 do que na MC3T3-E1. As células UMR-106, quando em contato com a fração FV 64 µg/mL no período de 48h já estão comprometidas, provavelmente ativando o mecanismo de morte celular, porém ainda continuam aderidas. O que faz jus a isto deve-se ao resultado de viabilidade celular do cristal violeta ainda mostrar um número maior na densidade celular desta concentração nas células tumorais. Assim, o aumento na redução celular em células UMR-106 comparado com a MC3T3-E1 deve-se por estas estarem mais comprometidas no estágio de morte celular.

A maior parte da mortalidade relacionada ao câncer tem sido associada a um complexo processo de metástase, realizado pela ativação de várias proteínas reguladoras. Existem vários alvos no processo de metástase, que são conhecidos por serem inibidos pelos flavonoides, tornando-os moléculas promissoras para a terapia anticâncer. Assim, os flavonoides possuem potencial anti-inflamatório e podem reduzir a inflamação associada ao risco de câncer (Kashyap et al., 2019). O processo de migração é utilizado pelas células no organismo em condições fisiológicas assim como patológicas. No processo metastático, as células tumorais migram-se do tumor primário para o sistema circulatório e lá estabelecem-se em uma nova região (Popolin, 2016). Na avaliação da inibição da atividade migratória das células de osteossarcoma,

o CE e o FV apresentaram maior eficácia. Os flavonoides foram eficazes em inibir a migração celular conforme a **Fig. 6**. A citotoxicidade do CE também foi alta, provavelmente por estar relacionada a quantidade de FV presente em sua porção.

Zhao et al. (2018) conduziram um estudo com Degalactotigonina (DGT), extraído de *Solanum nigrum* L., que possui propriedades anticâncer sem efeitos colaterais graves e exploraram se DGT tinha a capacidade de inibir o crescimento de osteossarcoma e metástases. O estudo indicou que a DGT diminuiu o crescimento e a metástase do osteossarcoma, o que pode ser uma estratégia terapêutica promissora contra o osteossarcoma *in vitro* e *in vivo* sem efeitos colaterais óbvios.

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e majoritários são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar radicais livres (Behling et al., 2004). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são um tipo de subproduto no processo do metabolismo aeróbico biológico. Comparadas às células normais, as células cancerígenas possuem altos níveis de EROs, desencadeando desregulação do equilíbrio redox e do estresse oxidativo. Certos flavonoides também aumentam os níveis de EROs das células de osteossarcoma e, depois, induzem a morte celular (Liu et al., 2017).

A possível correlação entre o citotóxico do extrato de MB e o acúmulo de estresse oxidativo foi examinada medindo-se os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células. Os resultados obtidos com a sonda DCFH-DA, a concentração de FV 64 µg/mL induziu um efeito antioxidante quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Contudo, também houve redução na intensidade de fluorescência no CE, porém sem apresentar diferenças significativas quando comparada ao controle.

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonoides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonoide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres (Barreiros et al., 2006). O estresse oxidativo desempenha um papel crucial na fisiopatologia dos diferentes tipos de câncer. Portanto, muita atenção tem sido dada aos antioxidantes como nova estratégia terapêutica para o câncer. A importância da busca por antioxidantes naturais é destacada por sua ação em eliminar e suprimir a



formação de espécies reativas de oxigênio ou na oposição às suas ações (Santos et al., 2018; Imran et al., 2019).

Dentre todas as MMP conhecidas, as MMP-2 e -9 (gelatinases) têm sido consistentemente associadas com a agressividade, o potencial metastático e o prognóstico desfavorável das neoplasias malignas. As gelatinases desempenham um papel fundamental no processo da carcinogênese, pois degradam principalmente colágeno tipo IV, componente fundamental da membrana basal, participando do processo de invasão do estroma e invasão dos vasos sanguíneos, processo fundamental para a metástase (Pereira et al., 2006). Vários tumores sólidos são exibidos na expressão melhorada de metaloproteinases da matriz (MMPs), e recentemente inibidores de MMP entraram em testes clínicos. Uma perturbação no sistema das MMP's em favor da atividade proteolítica aumentada pode ser suspeitada em osteossarcoma, pois o crescimento em OS é acompanhado por destruição óssea local e formação óssea, dois processos que dependem de enzimas proteolíticas (Bjørnland et al., 2005).

Os fármacos podem ser também utilizados para inibir o crescimento de células tumorais por meio da redução da atividade de MMP-2 e MMP-9 (Roomi et al., 2009).

No ensaio da atividade da metaloproteinases de matriz (MMPs) -2 e 9, por meio da técnica de zimografia em células UMR-106, as análises mostraram que em células de osteossarcoma, o tratamento com FV 64 µg/mL reduziu a atividade de MMP-2 apresentando diferenças significativas e também ilustra um maior potencial na redução de degradação e demonstrou uma tendência de redução na atividade da MMP-9. A degradação da matriz extracelular (MEC) é muito importante durante a metástase (Do Thi and Hwang, 2014).

Saragusti et al. (2010) observaram que a quercetina produzia de maneira dependente da concentração uma diminuição significativa na atividade da MMP-9. Ende and Gebhardt (2004) verificaram que os flavonoides influenciam o nível de MMPs de diferentes maneiras. Em muitos tipos celulares, os flavonoides têm sido descritos como reguladores negativos de biossíntese das MMPs. A quercetina, por exemplo, inibe a invasão de células de melanoma murino, diminuindo pro-MMP-9 através da via PKC. Uma vez que certas MMPs podem ser ativadas pelo estresse oxidativo, o efeito antioxidante dos flavonoides pode contribuir para o silenciamento eficiente de tais mecanismos de ativação. Foi demonstrado que os flavonoides diminuem a atividade excessiva da MMP nas metástases do câncer interferindo na



síntese e secreção das proteases. Outros relatos (Berndt et al., 2013; Li et al., 2019) mostram que o efeito inibitório da quercetina na migração e invasão celular em células de osteossarcoma humano têm efeitos terapêuticos contra o osteossarcoma. Lan et al. (2017) observou que o tratamento com concentrações mais altas de quercetina resultou em aumentos menores no crescimento do tumor quando as células HOS and MG63 foram tratadas com quercetina 100  $\mu$ M, e observou-se uma diminuição definitiva no crescimento do tumor. Tomados em conjunto, esses achados sugerem que a quercetina desempenha um papel crucial na atenuação de metástases no osteossarcoma. Nossos achados parecem convergir com esses autores, uma vez que a quercetina é um componente do extrato de MB e detectamos uma tendência à redução da atividade da MMP-9 nas células tratadas com MB.

Uma outra classe de flavonoides que inibe a proliferação celular, induzindo a interrupção do ciclo celular através da supressão de proteínas reguladoras do ciclo celular nas células cancerígenas é a miricetina. Além disso, diminui a atividade da MMP-2, um fator metastático essencial nas células cancerígenas do cólon. O tratamento com miricetina promoveu apoptose em osteossarcoma canino sendo uma possível droga citostática menos tóxica para o tratamento desta patologia (Park et al., 2018). Assim, a tendência de inibição da atividade das MMP-2 e 9 resultante de nossos testes, possivelmente, possa ter sido causada pela ação dos flavonoides quercetina e miricetina presentes em MB, devido às suas propriedades antioxidantes.

É possível tentar explicar os efeitos observados com base na composição química do extrato de MB. Baseado em HPLC-PDA-MS, Saldanha et al. (2013) confirma a presença de flavonoides e derivados de ácidos fenólicos no extrato MB. Sobre a composição química da MB, mostra que seus principais constituintes foram agliconas flavonoides, flavonoides-O-glicosídeos, e derivados flavonoides-O-glicosídeos acilados da quercetina e miricetina. Dependendo da concentração testada, esses compostos podem exibir atividades citotóxicas e pró-oxidantes. Outros resultados interessantes observados com o extrato MB são as propriedades antimutagênicas e antioxidantes que também foram demonstradas para a quercetina e miricetina (Serpeloni et al., 2015).

Serpeloni et al. (2015) mostrou que a capacidade antioxidante pelo flavonoide do extrato de *Myrcia bella* Cambess em células gástricas normais e tumorais, além de não seletiva, poderia ser responsável pelos efeitos protetores contra distúrbios gastrointestinais observados no uso tradicional de MB pela população brasileira.

Segundo os critérios estabelecidos para extratos vegetais por Scherer e Godoy (2009), os extratos de infusão de 12 espécies nativas de Myrtaceae avaliadas, incluindo *Myrcia bella*, apresentaram Índice de Atividade Antioxidante muito fortes (>2) (Takao et al., 2015), o que pode justificar os resultados apresentados.

Atualmente, deve-se levar em consideração que pelo menos um terço dos medicamentos são originários do reino vegetal (Calixto, 2003), portanto, a combinação de remédios tradicionais à base de plantas e agentes quimioterapêuticos convencionais representa uma estratégia promissora para novas opções para o desenvolvimento de novos medicamento (Salehi et al., 2018).

As vantagens do uso de plantas medicinais no tratamento do câncer foram comprovadas por vários estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*. As plantas medicinais possuem muitos produtos naturais e derivados sintéticos modificados e metabólitos secundários como alcalóides, flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, polifenóis, entre outros que demonstraram atividades antioxidantes significativas e, assim, impediram o desenvolvimento de câncer por inflamação, antitumoral, antimutagênico e atividades anti-carcinogênicas (Gezici And Sekeroglu, 2019).

Portanto, devido à composição química de *M.bella* e levando-se em consideração os diversos potenciais que os flavonoides heterosídeos apresentam em relação a uma ampla gama de atividades em uma linhagem de osteossarcoma murino, como redução da viabilidade celular, inibição da migração celular, diminuição da produção de EROs, redução da atividade da MMP-2 e tendendo à redução da atividade da MMP-9, *M. bella* torna-se uma fonte promissora fonte de estudos frente a uma vasta gama de atividades biológicas.

## **Conclusões**

Em resumo, os resultados em UMR-106 mostraram que as concentrações de CE 80 µg/mL, ELT 160 µg/mL e FV 64 µg/mL reduziram a viabilidade celular ( $p < 0,05$ ). Além disso, o CE e principalmente a fração FV inibiram a migração celular, diminuíram a produção de EROs, reduziram a atividade da MMP-2 e mostraram uma tendência na redução da atividade da MMP-9. Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da *Myrcia bella* nas células de osteossarcoma murino (*in vitro*), e demonstrou que a fração flavonoide efetivamente apresentou uma maior atividade antioxidante e efeito citotóxico sobre a linhagem celular UMR-106. Em suma, devido ao seu alto conteúdo

fenólico e atividades antioxidantes, MB se torna uma fonte potencial de novos antioxidantes naturais.

### **Conflitos de Interesse**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi baseado em uma dissertação submetida pelo primeiro autor à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obter o título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas. Gostaríamos de agradecer à FAPESP pelo apoio financeiro (# 2017/26261-6). “Este estudo foi financiado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

### **Referências**

Alfranca, A., Martinez-Cruzado, L., Tornin, J., et al., 2015. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3097–3113.

Andrade Carvalho, A., da Costa, P.M., da Silva Souza, L.G., Lemos, T.L., Alves A.P., Pessoa, C., de Moraes, M.O., 2013. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. *Life Sci.* 93 (5), 201-207.

Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova.* 29, 113-123.

Behling, E.B., Sendão, M.C., Francescato, H.D.C., Antunes, L.M.G., Bianchi, M.L.P., 2004. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutr.* 15 (3), 285-292

Berndt, K., Campanile, C., Muff, R., Strehler, E., Born, W., Fuchs, B., 2013. Evaluation of quercetin as a potential drug in osteosarcoma treatment, *Anticancer Res.* 33, 1297–1306.

Bernhard, D., Schwaiger, W., Crazzolara, R., Tinhofer, I., Kofler, R., Csordas A., 2003. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* 195 (1), 193–199.

Bjørnland, K., Flatmark, K., Pettersen, S., Aaasen, A.O., Fodstad, O., Mælandsmo, G.M., 2005. Matrix Metalloproteinases Participate in Osteosarcoma Invasion. *Journal of Surgical Research*. 127 (2), 151–156.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brandao, H.N., David, J.P., Couto, R.D., Nascimento, J.A.P., David, J.M., 2010. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*. 33 (6), 1359-1369.

Brito, G.A., Carneiro-Filho, B., Oriá, R.B., Destura, R.V., Lima, A.A., Guerrant, R.L., 2005. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. *Dig Dis Sci*. 50 (7), 1271-1278.

Brubacher, J.L., Bols, N.C., 2001. Chemically deacetylated 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Methods*. 251, 81–91.

Calixto, J.B., 2003. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult.* 55 (3), 37-39.

Colalto, C., 2018. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytotherapy Research*. 32, 413-425.

Do Thi, N., Hwang, E.S., 2014. Effects of laver extracts on adhesion, invasion, and migration in SK-Hep1 human hepatoma cancer cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 78 (6), 1044-1051.

Ende, C., Gebhardt, R., 2004. Inhibition of Matrix Metalloproteinase-2 and-9 Activities by Selected Flavonoids. *Planta Med.* 70, 1006-1008.

Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 4, 343-346.

Gezici, S., Sekeroglu, N., 2019. Current Perspectives in the Application of Medicinal Plants Against Cancer: Novel Therapeutic Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 19, 101-111.

Gupta, S.C., Prasad, S., Sethumadhavan, D.R., Nair, M.S., Mo, Y.Y., Aggarwal, B.B., 2013. Nimbolide, a limonoid triterpene, inhibits growth of human colorectal cancer xenografts by suppressing the proinflammatory microenvironment. *Clinical Cancer Research*. 19 (16), 4465–4476.

Imran, M., Rauf, A., Abu-Izneid, T., Nadeem, M., Ali Shariat, I., Ali Khan, I., et al., 2019. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 112, 1-10.

Kashyap, D., Tuli, H.S., Yerer, M.B., Sharma, A.K., Buttar, H.S., Youns, M., et al., 2019. Flavonoids as Emerging Anticancer Agents: Current Trends and Recent

Advances in Phytotherapy, in: Tuli, H.S. (Eds.), Current Aspects of Flavonoids: Their Role in Cancer Treatment. Springer, Singapore, pp. 91-123.

Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U., 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem.* 182, 16-19.

Lan, H., Hong, W., Fan, P., Qian, D., Zhu, J., Bai, B., 2017. Quercetin Inhibits Cell Migration and Invasion in Human Osteosarcoma Cells. *Cell Physiol Biochem.* 43, 553-567.

Leonard, A.K., Loughran, E.A., Klymenko, Y., Liu, Y., Kim, O., Asem, M., et al., 2018. Methods for the visualization and analysis of extracellular matrix protein structure and degradation. *Methods Cell Biol.* 143, 79–95.

Li, S., Pei, Y., Wang, W., Liu, F., Zheng, K., Zhang, X., 2019. Quercetin suppresses the proliferation and metastasis of metastatic osteosarcoma cells by inhibiting parathyroid hormone receptor 1. *Biomed Pharmacother.* 114, 1-10.

Liu, H., Gao, Y., Dong, Y., Cheng, P., Chen, A., Huang, H., 2017. Flavonoids Active Against Osteosarcoma: A Review of the Molecular Mechanisms Involved. *Curr Pharm Des.* 23 (13), 1993-2001.

Machado, A.C., Souza, L.P., Saldanha, L.L., Pieroni, L.G., Matos, A.A. et al (2016). "Aroeira" (*Myracrodruon urundeuva*) methanol extract: the relationship between chemical compounds and cellular effects. *Pharm Biol.* 54 (11), 2737-2741.

Matos, A.A., Oliveira, F.A., Machado, A.C., Saldanha, L.L., Tokuhara, C.K., Souza, L.P., et al., 2019. An extract from *Myracrodruon urundeuva* inhibits matrix mineralization in human osteoblasts. *Journal of Ethnopharmacology.* 237, 192-201.

Matsuda, S.S., Silva, T.L., Buzalaf, M.A., Rodrigues, A.C., Oliveira, R.C., 2014. Differential effects of fluoride during osteoblasts mineralization in C57BL/6J and C3H/HeJ inbred strains of mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 161, 123–129.

Melo, F.P.S.R., Dokkedal, A.L., Saldanha, L.L., 2017. Identificação de elagitaninos em *Myrcia bella* Cambess por CLAE-IS-AI-EM/EMn, in: XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. *Anais, Araraquara.*

Park, H., Park, S., Bazer, F.W., Lim, W., Song, G., 2018. Myricetin treatment induces apoptosis in canine osteosarcoma cells by inducing DNA fragmentation, disrupting redox homeostasis, and mediating loss of mitochondrial membrane potential. *Journal of cellular physiology.* 233 (9), 7457-7466.

Pereira, A.C., do Carmo, E.D., Silveira, V.A.S., Amadei, S.U., Rosa, L.E.B., 2006. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 52 (3), 257-262.

Popolin, C.P., 2016. Efeitos antitumorais e antimetastáticos de novos complexos de rutênio em células de câncer de mama. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso

de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, São Carlos.

Quarles, L.D., Yohay, D.A., Lever, L.W., Caton, R., Wenstrup, R.J., 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res.* 7 (6), 683-92.

Rodrigues, P.S.deM., Bertolin, A.O., Fucase, T.M., Galluzzi, F.M., Silva, E.C., Marumo, M.H.B., 2017. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. sobre células normais e tumorais. *J. Health Biol Sci.* 5, 16-23.

Roomi, M.W., Monterrey, J.C., Kalinovsky, T., Rath, M., Niedzwiecki, A., 2009. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncology reports.* 21 (5), 1323-1333.

Saldanha, L.L., Allard, P.M., Afzan, A., de Melo, F.P.S.R., Marcourt, L., Queiroz, E.F., Vilegas, W., Furlan, C.M., Dokkedal, A.L., Wolfender, J.-L., 2020. Metabolomics of *Myrcia bella* Populations in Brazilian Savanna Reveals Strong Influence of Environmental Factors on Its Specialized Metabolism. *Molecules.* 25, 2954.

Saldanha, L.L., Dokkedal, A.L.B., 2013. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. 2013. 161 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.

Saldanha, L.L., Vilegas, W., Dokkedal, A. L., 2013. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLCPAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. *Molecules.* 18, 8402-8416.

Salehi, B., Zucca, P., Sharifi-Rad, M., Pezzani, R., Rajabi, S., Setzer, W.N., et al., 2018. Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis. *Phytotherapy Research.* 32 (8), 1425-1449.

Salomão, P.M.A., Oliveira, F.A., Rodrigues, P.D., Al-Ahj, L.P., Gasques, K.C.D.s, Jeggle, P., et al., 2017. The cytotoxic effect of TiF<sub>4</sub> and NaF on fibroblasts is influenced by the experimental model, fluoride concentration and exposure time. *PLoS ONE.* 12 (6), 1–16.

Santos, C., Galaverna, R.S., Angolini, C.F.F., Nunes, V.V.A., de Almeida, L.F.R., Ruiz, A.L.T.G., et al., 2018. Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds from Three *Myrcia* Species. *Molecules.* 23 (986), 1-12.

Saragusti, A.C., Ortega, M.G., Cabrera, J.L., Estrin, D.A., Marti, M.A., Chiabrando, G.A., 2010. Inhibitory effect of quercetin on matrix metalloproteinase 9 activity Molecular mechanism and structure–activity relationship of the flavonoid–enzyme interaction. *European Journal of Pharmacology.* 644, 138-145.

Scherer, R., Godoy, H.T., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry.* 112 (3), 654-658.

Sen, T., Samanta, S.K., 2014. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review, in: Biotechnological applications of biodiversity. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 59-110.

Serpeloni, J.M., Specian, A.F., Ribeiro, D.L., Tuttis, K., Vilegas, W., Martínez-López, W., et al., 2015. Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. in normal and tumor gastric cells. Journal of Ethnopharmacology, 176, 345–355.

Takao, L.K., Imatomi, M., Gualtieri, S.C.J., 2015. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). Braz. J. Biol. 75 (4), 948-952.

Vareda, P.M.P., Saldanha, L.L., Camaforte, N.A.D.P., Violato, N.M., Dokkedal, A.L., Bosqueiro, J.R., 2014. *Myrcia bella* leaf extract presents hypoglycemic activity via PI3k/Akt insulin signaling pathway. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014, 1-11.

Zhao, Z. et al., 2018. Degalactotigonin, a Natural Compound from *Solanum nigrum* L., Inhibits Growth and Metastasis of Osteosarcoma through GSK3 $\beta$  Inactivation–Mediated Repression of the Hedgehog/Gli1 Pathway. Clinical Cancer Research. 24 (1), 130-144.





## **3 DISCUSSÃO**

---



### 3 DISCUSSÃO

Historicamente os medicamentos derivados de plantas eram administrados por via oral, pelo consumo direto dos vegetais ou pela preparação de extratos brutos, o que é muito vantajoso, pois esses métodos são simples e baratos. Há pelo menos 60.000 anos as plantas são utilizadas como remédios, refletindo sua capacidade de produzir metabólitos secundários com uma vasta gama de propriedades farmacológicas, incluindo atividade anticâncer. Os compostos fenólicos flavonoides, são os metabólitos secundários derivados de plantas mais promissores para o tratamento do câncer. O número de publicações que relatam a atividade anticâncer de extratos de plantas está se expandindo rapidamente (BUYEL, 2018).

São envolvidos inúmeros conhecimentos na busca de novos medicamentos originados de plantas que vão desde aspectos químicos, agrônômicos, farmacológicos, botânicos e toxicológicos. As plantas medicinais e seus compostos podem oferecer novos agentes terapêuticos antineoplásicos e, assim, desempenhar papéis importantes na descoberta de agentes anticâncer eficazes e clinicamente úteis, apresentando menos efeitos colaterais por serem menos tóxicos. Pesquisas baseadas em estudos etnobotânicos aumentaram devido à necessidade de novos produtos com alta atividade terapêutica, baixa toxicidade, boa biocompatibilidade e que possuam um custo acessível (MATOS et al., 2019; BRANDAO et al., 2010; GEZICI; SEKEROGLU, 2019).

Myrtaceae é uma das famílias mais importantes encontradas nos trópicos úmidos. *Myrcia* é uma espécie do gênero Myrtaceae, que inclui arbustos e pequenas árvores, que são descritas como uma importante fonte de óleos essenciais. O gênero *Myrcia* é utilizado na medicina popular no Brasil como adstringentes, diuréticos, coagulantes e para o tratamento de doenças como diabetes mellitus, hipertensão e úlceras gástricas. Abrigam um grande número de espécies endêmicas, incluindo *Myrcia bella* Cambess (MB). As folhas de MB têm sido utilizadas na medicina popular brasileira para diferentes fins e também são exploradas comercialmente como medicamentos fitoterápicos no tratamento do diabetes mellitus (SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013). Vareda et al. (2014) confirmou que extrato de folhas de MB possui propriedades hipoglicêmicas e possivelmente atua na regulação da captação de glicose pelo fígado. No entanto, este é o único relatório científico relativo

às propriedades biológicas e toxicológicas desta espécie. Serpeloni et al. (2015) mostrou que a capacidade antioxidante pelo flavonoide do extrato de *Myrcia bella* Cambess em células gástricas normais e tumorais, além de não seletiva, poderia ser responsável pelos efeitos protetores contra distúrbios gastrointestinais observados no uso tradicional de MB pela população brasileira.

Cabe ressaltar que alguns extratos de Myrtaceae, especificamente os de *M. tomentosa*, já foram analisados como agentes antimicrobianos. *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. é uma espécie amplamente utilizada na medicina tradicional na América do Sul para tratar o diabetes mellitus. Estudos farmacológicos mostraram que o extrato de folhas de *Myrcia fallax* (Rich.) DC mostrou atividade contra células cancerígenas, além de atividade antidiabética. (SALDANHA, 2013; SANTOS et al., 2018). Outras espécies de *Myrcia* possuem usos tradicionais: *Myrcia bracteata* DC. é utilizada para tratar dispepsia; *Myrcia ovata* Cambess. é utilizada no tratamento de doenças gástricas, gastrite e diarreia; e folhas maceradas de *Myrcia guianensis* são utilizadas pelos habitantes da região amazônica para neutralizar os venenos de serpentes (CASCAES et al., 2015). Deste modo, as espécies de Myrtaceae podem ser utilizadas para diversos fins, apresentando significativo interesse econômico para o Brasil (CONEGLIAN, 2011).

No presente estudo, os efeitos citotóxicos de uma gama de concentrações de extrato bruto e frações em células normais (MC3T3-E1) e células tumorais (UMR-106) foram avaliados. As células tumorais eram mais sensíveis do que células normais, portanto, é importante selecionar as concentrações que matam células tumorais, mas não induzem distúrbios na homeostase das células saudáveis. No ensaio de viabilidade celular MTT foi possível observar que os compostos em geral promoveram redução da viabilidade celular com o aumento da concentração, com destaque para o extrato bruto e a fração flavonoide. Em relação aos resultados do teste colorimétrico Cristal Violeta para a linhagem UMR-106, os resultados também demonstraram que o extrato bruto e a fração de flavonoide induziram citotoxicidade e danos ao DNA.

A fração FV apresentou mudanças na redução celular em ambas as linhagens, entretanto mais característico na linhagem UMR-106 do que na MC3T3-E1. Os valores em porcentagem (%) da viabilidade celular em MC3T3-E1 foram de 50,77 e 52,62 para o CE 80 µg/mL e FV 64 µg/mL, respectivamente. Para a linhagem tumoral UMR-106 os valores (%) foram de 47,69 e 40,58 para o CE 80 µg/mL e FV 64 µg/mL respectivamente. As células UMR-106, quando em contato com a fração FV 64 µg/mL

no período de 48h já estão comprometidas, provavelmente ativando o mecanismo de morte celular, porém ainda continuam aderidas. O que faz jus a isto deve-se ao resultado de viabilidade celular do cristal violeta ainda mostrar um número maior na densidade celular desta concentração nas células tumorais. Assim, o aumento na redução celular em células UMR-106 comparado com a MC3T3-E1 deve-se por estas estarem mais comprometidas no estágio de morte celular.

No processo metastático as células tumorais migram-se do tumor primário para o sistema circulatório e lá, estabelecem-se em uma nova região (POPOLIN, 2016). Grande parte da mortalidade relacionada ao câncer tem sido associada a um complexo processo de metástase, realizado pela ativação de várias proteínas reguladoras. Existem vários alvos no processo de metástase, que são conhecidos por serem inibidos pelos flavonoides, tornando-os moléculas promissoras para a terapia anticâncer. Assim, os flavonoides possuem potencial anti-inflamatório e podem reduzir a inflamação associada ao risco de câncer (KASHYAP et al., 2019). O processo de migração é utilizado pelas células no organismo em condições fisiológicas assim como patológicas. Na avaliação da inibição da atividade migratória das células de osteossarcoma, o CE e FV apresentaram maior eficácia. Os flavonoides foram eficazes em inibir a migração celular de acordo com a **Fig. 8**. A citotoxicidade do CE também foi alta, provavelmente por estar relacionada a quantidade de FV presente em sua porção.

Um composto antioxidante pode atrasar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, bloqueando assim, o início ou a propagação de reações em cadeia oxidativas, impedindo ou reparando os danos causados às células pelo oxigênio. O consumo de antioxidantes naturais apresenta potenciais benefícios à saúde. Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e majoritários são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar radicais livres. Comparadas às células normais, as células cancerígenas têm altos níveis de ROS, desencadeando desregulação do equilíbrio redox e estresse oxidativo. Certos flavonoides também aumentam os níveis de ROS das células de osteossarcoma e depois induzem a morte celular. Deste modo, há um interesse considerável na busca de novos antioxidantes a partir de materiais vegetais. Compostos antioxidantes de plantas, principalmente polifenóis, podem inibir a propagação de reações de radicais livres e proteger o corpo

humano de doenças (TAKAO; IMATOMIB; GUALTIERIA, 2015; BEHLING et al., 2004; LIU, 2017).

A possível correlação entre o efeito citotóxico do extrato de MB e o acúmulo de estresse oxidativo foi examinada medindo-se os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células. Os resultados obtidos com a sonda DCFH-DA, a concentração de FV 64 µg/mL induziu um efeito antioxidante quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Contudo, apesar de apresentar uma tendência na redução da intensidade de fluorescência no CE, não apresentou diferenças significativas quando comparada ao controle.

Os polifenóis e em particular os flavonoides de modo geral, possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais. A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonoide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O estresse oxidativo desempenha um papel crucial na fisiopatologia dos diferentes tipos de câncer. Portanto, muita atenção tem sido dada aos antioxidantes como nova estratégia terapêutica para o câncer. A importância da busca por antioxidantes naturais é destacada por sua ação na eliminação, eliminação e supressão da formação de ROS ou na oposição de suas ações (SANTOS et al., 2018; IMRAN et al., 2019). Desta forma, um dos efeitos dos aleloquímicos em células de plantas alvo é desregular a produção e o acúmulo de ROS (SALDANHA, 2013).

As MMP-2 e -9 (gelatinases) têm sido consistentemente associadas com a agressividade, o potencial metastático e o prognóstico desfavorável das neoplasias malignas. As gelatinases desempenham um papel fundamental no processo da carcinogênese, pois degradam principalmente colágeno tipo IV, componente fundamental da membrana basal, participando do processo de invasão do estroma e invasão dos vasos sanguíneos, processo fundamental para a metástase (PEREIRA et al., 2006). Uma perturbação no sistema das MMP's em favor da atividade proteolítica aumentada pode ser suspeitada em osteossarcoma, pois o crescimento em OS é acompanhado por destruição óssea local aprimorada e formação óssea, dois processos que dependem de enzimas proteolíticas (BJØRNLAND et al., 2005).

No ensaio da atividade de metaloproteínases de matriz (MMPs)-2 e 9 por meio da técnica de zimografia em células UMR-106, o tratamento com CE 80 µg/mL e FV 64 µg/mL mostraram uma tendência na redução da atividade de MMP-2 e -9. As

análises mostraram que nas células de osteossarcoma, o FV apresentou uma maior inibição da atividade de MMP-2 e 9, ilustrando também maior potencial na redução da degradação. A degradação da matriz extracelular (MEC) é uma etapa crucial durante o processo de metástase (DO THI; HWANG, 2014).

Vários estudos apoiam o potencial anticâncer do flavonoide quercetina (ABOTALEB et al., 2018). Saragusti et al. (2010) observaram que a quercetina produzia de maneira dependente da concentração uma diminuição significativa na atividade da MMP-9. Ende e Gebhardt (2004) verificou que os flavonoides influenciam o nível de MMPs de diferentes maneiras. Em muitos tipos de células, os flavonoides foram descritos como agentes de baixa regulação de biossíntese das MMPs. A quercetina, por exemplo, inibe a invasão de células de melanoma murino, diminuindo pro-MMP-9 através da via PKC. Uma vez que certas MMPs podem ser ativadas pelo estresse oxidativo, o efeito antioxidante dos flavonoides pode contribuir para o silenciamento eficiente de tais mecanismos de ativação. Foi demonstrado que os flavonoides diminuem a atividade excessiva da MMP nas metástases do câncer interferindo na síntese e secreção das proteases. Outros relatos (BERNDT et al., 2013; LI et al. 2019) mostram que o efeito inibitório da quercetina na migração e invasão celular em células de osteossarcoma humano têm efeitos terapêuticos contra o osteossarcoma. Lan et al. (2017) observou que o tratamento com concentrações mais altas de quercetina resultou em aumentos menores no crescimento do tumor observando uma diminuição definitiva no crescimento do tumor. Tomados em conjunto, esses achados sugerem que a quercetina desempenha um papel crucial na atenuação de metástases no osteossarcoma. Nossos achados parecem convergir com estes autores, uma vez que a quercetina é componente do extrato de MB e detectamos uma tendência na redução da atividade de MMP-9 nas células tratadas com MB.

Miricetina é um outro tipo de flavonoide que inibe a proliferação celular, induzindo a interrupção do ciclo celular através da supressão de proteínas reguladoras do ciclo celular nas células cancerígenas. Está associada a atividades antibacteriana, antiviral, antioxidante e anticancerígena. Além disso, diminui a atividade da MMP-2, um fator metastático essencial nas células cancerígenas do cólon. O tratamento com miricetina promoveu apoptose em osteossarcoma canino sendo uma possível droga citostática menos tóxica para o tratamento desta patologia (PARK et al., 2018; ABOTALEB et al., 2018). A indicação da presença de flavonóis como miricetinas e

quercetinas no extrato de MB nos indica um grande potencial antioxidante e consequentemente atividade biológica (SALDANHA, 2013). Deste modo, os nossos ensaios sugerem que as MMP-2 e 9 sofreram uma modulação quando tratadas com o CE e FV, possivelmente sido ocasionada pela ação dos flavonoides quercetina e miricetina presentes em MB.

Baseado em HPLC-PDA-MS, Saldanha, Vilegas e Dokkedal (2013) confirmam a presença de flavonoides e derivados de ácidos fenólicos no extrato MB. Sobre a composição química de MB, mostra que seus principais constituintes foram flavonoides agliconas, flavonoides-O-glicosídeos, e derivados de flavonoides-O-glicosídeos acetilados da quercetina e miricetina. Dependendo da concentração testada, esses compostos podem exibir atividades citotóxicas e pró-oxidantes. Outros resultados interessantes observados com o extrato MB são as propriedades antimutagênicas e antioxidantes que também foram demonstradas para a quercetina e miricetina (SERPELONI et al., 2015). Deste modo é possível tentar explicar os efeitos observados pela indicação da presença de flavonóis como miricetinas e quercetinas no extrato de MB indicando um elevado potencial antioxidante e consequentemente atividade biológica.

O que pode justificar os resultados apresentados, é que segundo os critérios estabelecidos para extratos vegetais por Scherer e Godoy (2009), o extrato de *Myrcia bella*, apresenta Índice de Atividade Antioxidante muito fortes (>2) (TAKAO; IMATOMIB; GUALTIERIA, 2015).

Abotaleb et al. (2018) comprovou que os extratos de plantas são fortes candidatos no tratamento de numerosos tipos de câncer por meio da via apoptótica moduladora. O principal mecanismo envolve a ativação de proteínas apoptóticas intrinsecamente e extrinsecamente, elevação de ROS e indução de danos ao DNA.

Das estimadas 250.000 espécies de plantas com flores no mundo, 15% foram avaliados fitoquimicamente e apenas 6% foram rastreadas quanto à sua atividade biológica (BUDOVSKY; YARMOLINSKY; BEN-SHABAT, 2015). Atualmente, deve-se levar em consideração que pelo menos um terço dos medicamentos são originários do reino vegetal (CALIXTO, 2003), portanto, a combinação de remédios tradicionais à base de plantas e agentes quimioterapêuticos convencionais representa uma estratégia promissora para novas opções para o desenvolvimento de novos medicamentos (SALEHI et al., 2018).



As vantagens do uso de plantas medicinais no tratamento do câncer foram comprovadas por vários estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*. As plantas medicinais possuem muitos produtos naturais e derivados sintéticos modificados e metabólitos secundários como alcalóides, flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, polifenóis, entre outros que demonstraram atividades antioxidantes significativas e, assim, impediram o desenvolvimento de câncer por inflamação, antitumoral, antimutagênico e atividades anti-carcinogênicas (GEZICI; SEKEROGLU, 2019).

Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da *Myrcia bella* em células de osteossarcoma murino (*in vitro*), e a fração flavonoide apresentou efetivamente maior atividade antioxidante e efeito citotóxico na linhagem celular UMR-106. Portanto, devido à composição química de *M. bella* e levando-se em consideração os diversos potenciais que flavonoides heterosídeos possuem, o extrato bruto e a fração flavonoide apresentaram redução da viabilidade celular ( $p < 0,05$ ), inibição da migração celular, diminuição da produção de ROS e redução da atividade de MMP-2 e 9. Deste modo, *M. bella* torna-se uma promissora fonte de estudos frente a uma vasta gama de atividades biológicas devido ao seu alto conteúdo fenólico e atividades antioxidantes.



## **REFERÊNCIAS**

---



## REFERÊNCIAS

- ABOTALEB, M. et al. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 1, 1-39, 2018.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos - **RDC nº 17**, de 16 de Abril de 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/medicamentos/empresas/boas-praticas-fabricacao>. Acesso em: 10 Dez 2019.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BENJAMIN, R. S. Osteosarcoma: better treatment through better trial design. **Lancet Oncol.**, v. 16, n. 1, p. 12-3, 2015.
- BERNDT, K. et al. Evaluation of quercetin as a potential drug in osteosarcoma treatment, **Anticancer Res.**, v. 33, p. 1297–1306, 2013.
- BJØRNLAND, K. et al. Matrix Metalloproteinases Participate in Osteosarcoma Invasion. **Journal of Surgical Research**, v. 127, n. 2, p. 151–156, 2005
- BRANDAO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 2, p. 171–183, 2015.
- BUYEL, J. F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 506–520, 2018.
- CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CASCAES, M. M. et al. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 10, p. 23881-904, 2015.
- CONEGLIAN, I. R. M. **Morfoanatomia de ovário, pericarpo e semente de sete espécies de Myrteae DC. (Myrtaceae)**. 2011. 107 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2011.
- CORREIA, A. et al. Metástase cerebral de osteossarcoma: relato de caso e revisão de literatura. **Rev. Med. Res.**, v.15, n.2, p.143-147, 2013.

- DO THI, N.; HWANG, E. S. Effects of laver extracts on adhesion, invasion, and migration in SK-Hep1 human hepatoma cancer cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 78, n. 6, p. 1044-1051, 2014.
- ENDE, C.; GEBHARDT, R. Inhibition of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Activities by Selected Flavonoids. **Planta Med.**, v. 70, p. 1006-1008, 2004.
- GEZICI, S.; SEKEROGLU, N. Current Perspectives in the Application of Medicinal Plants Against Cancer: Novel Therapeutic Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 101-111, 2019.
- IMRAN, M. et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 1-10, 2019.
- JUCÁ, M. et al. Metaloproteinases 1 e 7 e câncer colorretal. **Rev bras. coloproctol**, v.28, n.3, 2008.
- KASHYAP, D. et al. Flavonoids as Emerging Anticancer Agents: Current Trends and Recent Advances in Phytotherapy. In: **Hardeep Singh Tuli (Eds.). Current Aspects of Flavonoids: Their Role in Cancer Treatment**. Singapore: Springer, p. 91-123, 2019.
- LAN, H. et al. Quercetin Inhibits Cell Migration and Invasion in Human Osteosarcoma Cells. **Cell Physiol Biochem.**, v. 43, p. 553-567, 2017.
- LI, S. et al. Quercetin suppresses the proliferation and metastasis of metastatic osteosarcoma cells by inhibiting parathyroid hormone receptor 1. **Biomed Pharmacother**, v. 114, p. 1-10, 2019.
- LIU, H. Flavonoids Active Against Osteosarcoma: A Review of the Molecular Mechanisms Involved. **Curr Pharm Des.**, n. 23, v. 13, p. 1993-2001, 2017.
- MATOS, A. A. et al. An extract from *Myracrodruon urundeuva* inhibits matrix mineralization in human osteoblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p. 192-201, 2019.
- MELO, F. P. S. R.; DOKKEDAL, A. L.; SALDANHA, L. L. Identificação de elagitaninos em *Myrcia bella* Cambess. por CLAE-IS-AI-EM/EMn. In: **XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara, São Paulo, 2017.
- PARK, H. et al. Myricetin treatment induces apoptosis in canine osteosarcoma cells by inducing DNA fragmentation, disrupting redox homeostasis, and mediating loss of mitochondrial membrane potential. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 9, p. 7457-7466, 2018.
- PEREIRA, A. C. et al. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 3, p. 257-262, 2006.
- PEREIRA, W. L. et al. Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea L.*) contra a linhagem de célula H460. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, n. 4, supl. I, p. 798-806, 2015.

POPOLIN, C. P. **Efeitos antitumorais e antimetastáticos de novos complexos de rutênio em células de câncer de mama.** 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, São Carlos, 2016.

RINALDO, D. **Determinação de enantiômeros em extratos vegetais por cromatografia quiral e dicroísmo circular.** 2010. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista - Unesp Araraquara, Araraquara, 2010.

RITTER, J.; BIELACK, S. S. **Osteosarcoma.** *Annals of Oncology*, v. 21, p. 320-325, 2010.

SALDANHA, L. L. **Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess.** 2013. 161 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLCPAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. *Molecules*, v. 18, p. 8402-8416, 2013.

SALEHI, B. et al. Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis. *Phytotherapy Research*, v. 32, n. 8, p. 1425-1449, 2018.

SANTOS, C. et al. Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds from Three *Myrcia* Species. *Molecules*, v. 23, n. 986, p. 1-12, 2018.

SARAGUSTI, A. C. et al. Inhibitory effect of quercetin on matrix metalloproteinase 9 activity Molecular mechanism and structure–activity relationship of the flavonoid–enzyme interaction. *European Journal of Pharmacology*, n. 644, p. 138-145, 2010.

SERPELONI, J. M. et al. Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. in normal and tumor gastric cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 176, p. 345–355, 2015.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

TAKAO, L.K.; IMATOMIB, M.; GUALTIERIA, S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). *Braz. J. Biol*, v. 75, n. 4, p. 948-952, 2015.

VAREDA, P. M. P. **Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato de *Myrcia bella* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina.** 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

VAREDA, P.M.P. et al. *Myrcia bella* leaf extract presents hypoglycemic activity via PI3k/Akt insulin signaling pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, n. 2014, p. 1-11, 2014.

WALKLEY, C.R.; QUDSI, R.; SANKARAN, V.G. et al. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. **Genes Dev.**, v. 22, n. 12, p. 1662-76, 2008.

XU, H. (Z)-3,4,3',5'-tetramethoxystilbene, a natural product, induces apoptosis and reduces viability of paclitaxel-and cisplatin-resistant osteosarcoma cells. **J Cancer Res Ther**, v. 12, n. 4, p. 1261-1265, 2016.



**ANEXO**

---



## Participação em encontro científico

**Nome do evento:** Reunión Anual de SOCIEDADES DE BIOCIENCIA SAIC. SAIFE. SAB. SAP. AACYTAL. NANOMED-ar. HCS. Mar del Plata, Argentina, November 13th to 19th, 2019.

**Apresentação de trabalho em forma de pôster:** “Evaluation of *Myrcia bella* in murine osteosarcoma cells: effect of the crude extract and fractions of ellagitannins and flavonoids“. **FAKHOURY, V. S.**; PESSOA, A. S. ; PAGNAN, A. L. ; TOKUHARA, C. K. ; OLIVEIRA, G. S. N. ; LIESSA, M. R. S. ; SALDANHA, L. L. ; DOKKEDAL, A. L. ; OLIVEIRA, R. C.

“Cytotoxicity of methyl vanillate and methyl divanillate in breast cancer cells“. PESSOA, A. S. ; TOKUHARA, C. K. ; PAGNAN, A. L. ; **FAKHOURY, V. S.** ; LIESSA, M. R. S. ; OLIVEIRA, G. S. N. ; XIMENES, V. F. ; OLIVEIRA, R. C.

“Increased resistance of MC3T3-E1 cells differentiated or not compared to UMR-106 in response to Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)“. PAGNAN, A. L. ; PESSOA, A. S. ; **FAKHOURY, V. S.** ; TOKUHARA, C. K. ; LIESSA, M. R. S. ; OLIVEIRA, G. S. N. ; XIMENES, V. F. ; OLIVEIRA, R. C.