

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE *Campomanesia
adamantium* e *Hymenaea martiana* Hayne SOBRE CÉLULAS DE
OSTEOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS
HUMANAS**

Vanessa de Souza Vieira

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA

2020



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Vanessa de Souza Vieira

3. Título do trabalho

Efeitos dos extratos de folhas de *Campomanesia adamantium* e *Hymenaea martiana* Hayne sobre células de osteossarcoma canino e células endoteliais humanas

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Eugênio Gonçalves De Araújo, Professor do Magistério Superior**, em 05/08/2020, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **VANESSA DE SOUZA VIEIRA, Discente**, em 05/08/2020, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1464422** e o código CRC **18BD455D**.

Referência: Processo nº 23070.004102/2020-28

SEI nº 1464422

VANESSA DE SOUZA VIEIRA

EFEITOS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE *Campomanesia adamantium* e *Hymenaea martiana* Hayne SOBRE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS

Tese apresentada para obtenção do título de doutor em Ciência Animal a Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, nível doutorado.

Área de concentração:

Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica

Linha de pesquisa:

Patobiologia e morfofisiologia animal, experimental e comparada

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo - EVZ/
UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Vanessa de Sousa Cruz - EVZ/UFG
Prof. Dr. Weslen Fabrício Pires Teixeira -
EVZ/UFG

GOIÂNIA

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Vieira, Vanessa de Souza
EFEITOS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE *Campomanesia adamantium* e *Hymenaea martiana* Hayne SOBRE CELULAS DE OSTEOSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS [manuscrito] / Vanessa de Souza Vieira. - 2020.
10, 67 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo; co orientadora Dra. Vanessa de Sousa Cruz; co-orientador Dr. Weslen Fabrício Pires Teixeira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2020.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Tumores ósseos. 2. HUVEC. 3. Cultivo celular. 4. Gabiroleira. 5. Jatobá. I. Araújo, Eugênio Gonçalves de, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **285** da sessão de Defesa de Tese de **Vanessa de Souza Vieira** que confere o título de Doutor(a) em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Cirurgia, Clínica médica e Patologia Animal**.

Aos **vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte** a partir da(s) **09h00min**, no(a) sala 13 do setor de Pós-Graduação da EVZ/UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“Efeito dos extratos de folhas de gabirobeira e jatobá sobre células de osteossarcoma canino e endoteliais humanas”**. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo (EVZ/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Gabriel de Abreu Pfrimer (PUC-GO)**, membro titular externo; **Prof. Dr. Kleber Fernando Pereira (UFPR)**, membro titular externo; **Prof. Dr. Emmanuel Arnhold (EVZ/UFG)**, membro titular externo ao programa; **Prof. Dr. Gerlon de Almeida Ribeiro Oliveira (UFG)**, membro titular externo ao programa. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho conforme explicitado abaixo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Efeitos dos extratos de folhas de *Campomanesia adamantium* e *Hymenaea martiana* Hayne sobre células de osteossarcoma canino e células endoteliais humanas



Documento assinado eletronicamente por **Eugênio Gonçalves De Araújo, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2020, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel de Abreu Pfrimer, Usuário Externo**, em 27/02/2020, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emmanuel Arnhold, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2020, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gerlon De Almeida Ribeiro Oliveira, Técnico de Laboratório**, em 27/02/2020, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kleber Fernando Pereira, Usuário Externo**, em 27/02/2020, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1186164** e o código CRC **7573CE8C**.

Referência: Processo nº 23070.004102/2020-28

SEI nº 1186164

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar comigo nos momentos trêmulos e nos momentos firmes, e por sempre colocar no meu caminho pessoas boas e amigas.

Agradeço a toda Espiritualidade Maior, aos meus Guias e protetores espirituais por me amparar sempre.

Aos meus pais José César Vieira e Suely de Souza Vieira por todo apoio e amor incondicional.

Aos meus Irmãos Cristiano César de Souza Vieira, José César Vieira Junior e Thiago Vieira por tornar minha vida tão especial.

Aos meus sobrinhos Heloísa, Bernardo, Iasmyn, Milena, Isabella e Nicollas, que são os amores da minha vida.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Eugênio Gonçalves Araújo por ser esse ser humano fantástico, que me ensinou muito mais do que ser uma pesquisadora, mas ser uma pessoa melhor. Agradeço toda paciência e apoio em um dos períodos mais difíceis da minha vida.

A minha querida Prof.^a Dr.^a Vanessa de Sousa Cruz que é mais que uma orientadora e profissional incrível, é mãe, amiga, psicóloga... palavras nunca serão suficiente para agradecer por tudo que fez por mim, sem ela seria difícil ter chegado até aqui, uma pessoa que eu amo muito e pretendo levar para minha vida toda.

Ao Prof. Dr. Weslen Fabrício Pires Teixeira pelo apoio e por estar sempre à disposição para colaborar na orientação.

Ao Prof. Dr. Kleber Fernando Pereira por me encorajar a fazer doutorado em um momento que eu estava muito decepcionada com o meio acadêmico, por ter me apresentado ao professor Eugênio, e por sempre estar disposto a me auxiliar prontamente.

A minha amiga Nayane Peixoto Soares, pela companhia e caronas, pelas longas conversas (terapias) nas estradas, por ter sempre uma palavra de sabedoria ou de “tapa na cara”, pelas risadas intensas ou choros, foram momentos lindos de aprendizagem. Muito obrigada por tudo amiga, te amo.

Ao Leandro Nepomuceno que chegou devagar e se tornou nosso Lelê, com um humor ácido, e um coração gigante, sempre disposto a ajudar todos.

As colegas de laboratório Juliana e Fernandinha pelo companheirismo e por toda ajuda durante essa jornada.

A Krys pela amizade e disposição a ajudar com palavras e ações. Ao Olívio Israel Costa que foi imprescindível para o fechamento deste e outros ciclos na minha vida.

A Universidade Federal de Goiás, à Escola de Veterinária e Zootecnia, ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, ao Laboratório Multiusuário de Avaliação de Moléculas, Células e Tecidos.

Aos professores que ministraram as disciplinas que cursei durante o doutorado, pelo conhecimento adquirido, que contribuiu significativamente para a minha formação profissional.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que colaboraram e contribuíram de forma direta ou indireta na trajetória deste sonho que é o título de Doutora.

Compreendemos o efeito, já é muito; do efeito remontamos à causa, e julgamos a sua grandeza pela grandeza do efeito; mas a sua essência íntima nos escapa igual à da causa de uma multidão de fenômenos... Diante desses problemas insondáveis a nossa razão deve humilhar. Deus existe... É sua essência manifestando - se.

Allan Kardec (A Gênese)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. CICLO CELULAR	2
1.1. Estresse oxidativo e vias de ativação da apoptose	5
2. CÂNCER	8
3. OSTEOSSARCOMA CANINO	13
3.1. Introdução	13
3.2 Etiologia	14
3.3. Sinais clínicos	15
3.4. Diagnóstico	15
3.5. Estadiamento	16
3.5. Tratamento	17
4. METABOLISMO SECUNDÁRIO DAS PLANTAS	18
4.1. <i>Campomanesia spp.</i>	21
4.2. <i>Hymenaea spp.</i>	23
5. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo específicos	25
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2 – BIOATIVIDADE DAS FOLHAS DE GABIROBEIRA (<i>Campomanesia adamantium</i>) EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO <i>IN VITRO</i>	40
RESUMO	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUÇÃO	42

2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1. Material botânico e obtenção do extrato	43
2.3. Delineamento experimental	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 3 – EXTRATO DAS FOLHAS JATOBÁ (<i>Hymenaea martiana</i> Hayne) AUMENTA A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO <i>IN VITRO</i>	
	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
1. INTRODUÇÃO	59
3. METODOLOGIA	60
2.1. Material botânico e obtenção do extrato	61
2.2. Cultivo celular	61
2.3. Delineamento experimental	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	
	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

- FIGURA 1 Ciclo celular na fase G1 ocorre a descondensação dos cromossomos e a síntese de RNA e proteínas; na transição da fase G1 ocorre o primeiro ponto de checagem; durante a interfase o DNA nuclear é duplicado; a fase G2 é caracterizada pelo crescimento celular e síntese de DNA; na fase G2 está o segundo ponto de checagem; na fase M a célula é dividida em duas células filhas.....4
- FIGURA 2 Via extrínseca da apoptose desencadeada pela ligação de receptores de fator de necrose tumoral da membrana que ativa a cascata das Caspases levando a célula a apoptose.....9
- FIGURA 3 Esquema do processo de ativação da apoptose pela via intrínseca que ocorre quando há a retirada dos fatores de crescimento ou danos ao DNA, as moléculas pró-apoptóticas como o citocromo c são ativadas, resultando na ativação das caspases iniciadores e efetoras, levando a célula a apoptose.....10
- FIGURA 4 Esquema representando atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos dependendo da fase do ciclo celular.....14
- FIGURA 5 Regiões do esqueleto apendicular canino mais afetado osteossarcoma: 1 - Rádio e ulna, 2 - Fêmur, 3 - Tíbia, 4 - Escápula, 5 - Úmero 6 - Falanges17
- FIGURA 6 Esquema do ciclo biossintético dos metabólitos secundários dos vegetais.....22
- FIGURA 7 A) frutos de gabiroba (*Campomanesia adamantium*); B) Flor da gabirobeira; C) gabirobeira24
- FIGURA 8 A) Árvore do jatobá *Hymenaea spp.*; B) tronco do jatobá; C) Folhas de *Hymenaea spp.*; D) frutos de *Hymenaea spp.*; F) flores de *Hymenaea spp.*.....27

CAPÍTULO 2 – BIOATIVIDADE DAS FOLHAS DE GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium*) EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO *IN VITRO*

- FIGURA 1 Distribuição aleatório do tratamento de células de Osteossarcoma canino em placa de 96 poços. Em amarelo, controle sem DMSO; em vermelho, controle com DMSO (0,3µg/mL); em verde, tratamento 1 (0,1µg/mL); em azul, tratamento 2 (10µg/mL); em roxo, tratamento 3 (100 µg/mL); em marrom, tratamento 4 (1000µg/mL)..... 51

FIGURA 2 Representação gráfica da média dos valores da VC e CT obtidos por meio do ensaio de MTT. As células de osteossarcoma foram submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto das folhas da *C. adamantium* nas concentrações 0,1µL/mL, 10µL/mL, 100µL/mL e 1000µL/mL durante 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em quintuplicata para extrato.....53

CAPÍTULO 3 – EXTRATO DAS FOLHAS JATOBÁ (*Hymenaea martiana* Hayne) AUMENTA A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO *IN VITRO*

FIGURA 1 Distribuição aleatório do tratamento de células de Osteossarcoma canino em placa de 96 poços. Em amarelo, controle com DMSO (0,3µg/mL); em vermelho, tratamento 1 (10µg/mL); em verde tratamento 2 (100µg/mL) em azul, tratamento 3 (1000µg/mL); em roxo, tratamento 4 (1000 µg/mL); em marrom, tratamento 4 (5000µg/mL).

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2 - BIOATIVIDADE DAS FOLHAS DE GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium*) EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO *IN VITRO***

TABELA 1 - Viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) de cada grupo, por concentração, tempo de exposição e dosagem de EBBFG, pelo método de redução do tetrazólio (MTT).....52

TABELA 2 - Estresse Oxidativo. Viabilidade Celular (VC) e citotoxicidade (CT) de cada grupo por concentração, tempo de exposição e dosagem de EBBFG, pelo método de redução do tetrazólio (MTT).....56

CAPÍTULO 3 – EXTRATO DAS FOLHAS JATOBÁ (*Hymenaea martiana* Hayne) AUMENTA A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO *IN VITRO*

TABELA 1 - Viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) de cada grupo, por concentração, tempo de exposição e dosagem de EBBFJ, pelo método de redução do tetrazólio (MTT).

TABELA 2 Estresse Oxidativo. Viabilidade Celular (VC), citotoxicidade (CT) de cada grupo por concentração, tempo de exposição e dosagem de EBEFJ, pelo método de redução do tetrazólio (MTT).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APAF	Apoptotic protease activating factor 1
ATM	quinase ataxia-telangiectasiamutada
Bax	<i>-BCL-2 associated protein X</i>
Bcl 2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
CT	citotoxicidade
BCRJ	<i>Cell Bank of Rio de Janeiro</i>
D-17	Linhagem celular de Osteossarcoma Canino
DMEM	Dulbecco modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
Fas	ácido graxo sintase
FASL/CD95	receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose
IC50	<i>The half maximal inhibitory concentration</i>
MAPK	proteínas quinase ativada por mitógeno
MDMm-2	<i>murine double minute-2/murina duplo minuto-2</i>
MDR	<i>multidrugresistence</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OSC	Osteossarcoma canino
P53	proteína de massa molecular 53
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	ligante de fator de apoptose
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral
TP53	Gene supressor tumoral
UV	Ultravioleta
VC	Viabilidade Celular

RESUMO

O osteossarcoma (OSA) é um tumor muito agressivo nos cães, com baixo índice de sobrevida e tratamento pouco efetivo. Na busca de fontes alternativas de terapia, o bioma brasileiro torna-se uma esperança científica, por apresentar uma diversidade de plantas medicinais de conhecimento e utilização popular. No entanto, elas podem apresentar funções biológicas controversas. O objetivo deste estudo foi verificar a bioatividade das folhas de *Campomanesia adamantium* e de *Hymenaea martiana* Hayne sobre células de Osteossarcoma Canino (OC) de cultura estabelecida e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). As células foram cultivadas e submetidas ao tratamento com as concentrações de *C. adamantium* (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL) e *H. martiana* Hayne (10µL/mL, 100µL/mL, 1000µL/mL, 2000µL/mL e 5000µL/mL), nos tempos de exposição de 24h, 48h e 72h em normoxia e 24h para células expostas ao estresse oxidativo, induzido por peróxido de hidrogênio. Os resultados foram obtidos por meio da análise da viabilidade celular e citotoxicidade pelo método de redução do tetrazólio (MTT). Este estudo traz resultados inéditos em relação aos efeitos dos extratos, pois foi possível demonstrar que possuem pouca ação citotóxica. Além disso, foi observado que, quanto maior a dosagem e maior o tempo de exposição, maior a atividade proliferativa, com aumento da viabilidade celular no grupo de 72 horas. Nas células endoteliais, de forma similar, não houve atividade citotóxica, além da ocorrência do aumento da viabilidade celular, inclusive após a submissão ao estresse oxidativo. O extrato de folhas de *C. adamantium* aumentou a viabilidade e não apresentou ação citotóxica nas células de osteossarcoma canino e nas células endoteliais sob estresse oxidativo. O extrato etanólico bruto das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne, aumentou a viabilidade celular das células de osteossarcoma canino e das células endoteliais de veia umbilical humana, submetidas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: cultivo celular, D 17, tumores ósseos, plantas do cerrado.

ABSTRACT

Osteosarcoma (OSA) is a very aggressive tumor in dogs, with low survival rate and ineffective treatment. In the search for alternative sources of therapy, the Brazilian biome becomes a scientific hope, presenting a diversity of medicinal plants of popular knowledge and use. However, they can have controversial biological functions. The aim of this study was to verify the bioactivity of the leaves of *Campomania adamantium* and *Hymenaea martiana* Hayne on canine osteosarcoma (OC) cells from cell cultures and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). As cells were cultured and subjected to treatment with *C. adamantium* (1 µg / mL, 10 µg / mL, 100 µg / mL, 1000 µg / mL) and *H. martiana* Hayne (10µL / mL, 100µL / mL, 1000µL / mL , 2000µL / mL and 5000µL / mL), in the 24h, 48h and 72h exposure periods in normoxia and 24h in cells exposed to oxidative stress, induced by hydrogen peroxide. The results were analyzed by analyzing cell viability and cytotoxicity using the tetrazolium reduction method (MTT). This study brings unprecedented results in relation to extractive effects, as it was possible to demonstrate that they have little cytotoxic action. In addition, it was observed that the higher the dosage and the longer the exposure time, the greater the proliferative activity, with increased cell viability in the 72-hour group. In endothelial cells, similarly, there was no cytotoxic activity, in addition to the occurrence of increased cell viability, even after submission to oxidative stress. *C. adamantium* leaf extract increased viability and did not show cytotoxic action in canine osteosarcoma cells and endothelial cells under oxidative stress. The crude ethanolic extract of the leaves of *Hymenaea martiana* Hayne, increased the cell viability of canine osteosarcoma cells and human umbilical vein endothelial cells, submitted to oxidative stress.

Keywords: cell culture, cerrado plants, D 17, bone tumors.

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A formação de uma nova célula acontece por meio da duplicação de uma célula pré-existente. O ciclo celular é o processo no qual o DNA é duplicado e a divisão celular (mitose) resulta na formação de uma nova célula. Essa reprodução envolve uma sequência organizada de eventos; porém, quando erros acontecem nesta sequência, um dos mecanismos de regulação deste DNA alterado é a morte celular programada denominada apoptose^{1,2}. Quando os mecanismos de regulação falham, o DNA alterado leva a formação de doenças como, por exemplo, o câncer³.

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de duzentas doenças que tem em comum a agressividade causada pela desordem do ciclo celular e na multiplicação das células. O câncer atualmente é a principal causa de morte por doenças não transmissíveis em todo o mundo e assim se apresenta como um problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento^{4,5,6}.

O principal tratamento contra o câncer é a cirurgia, seguida da quimioterapia, a radioterapia, terapia hormonal e imunoterapia^{5,7}. A quimioterapia é uma técnica que consiste na destruição das células cancerígenas, que se caracteriza por apresentar uma divisão mais rápida que a divisão de uma célula normal. Porém, ainda é uma técnica que causa efeitos adversos em células normais devido à sua alta toxicidade. É consenso entre pesquisadores e profissionais de saúde a necessidade de empregar medicamentos que apresentem maior eficiência e menor efeito adverso para o tratamento do câncer. Nesse sentido, diversos centros de excelência em pesquisa têm buscado o desenvolvimento de novos quimioterápicos a partir de plantas, atualmente 60% das drogas utilizadas em ensaios clínicos são derivados de produtos naturais⁸.

Os estudos com substâncias conhecidas como metabólitos secundários, que são extraídas de plantas, possibilitaram a descoberta de produtos químicos que possuem fundamental importância no tratamento de determinados tipos de câncer. Dentre esses, encontram-se os quimioterápicos como a vincristina e a vimblastina, que foram isoladas da vinca (*Catharanthus roseus*); os derivados da podofilotoxina, procedidos de rizomas de *Podophyllum peltatum* e *P. hexandrum*; os oriundos da camptotecina, obtidos da *Camptotheca acuminata*; o taxol e o docetaxol extraídos de *Taxus brevifolia* e *T. baccata*³.

O uso de substâncias obtidas de fontes naturais no tratamento de enfermidades é uma prática comum desde a antiguidade^{9,10,11}. Um dos relatos mais antigos que se tem notícia, da utilização de plantas para fins terapêuticos, data de 3.000 a.C., na obra *Pen Ts'ao*, do chinês Shen Nung¹¹. Estima-se que medicamentos derivados de produtos naturais possam ser empregados como tratamento de 87% das doenças humanas¹³.

Na atualidade, diversos medicamentos utilizados na terapia de várias doenças são derivados direta ou indiretamente de fontes naturais como vegetais, micro-organismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres¹⁴. Por seu potencial de apresentar efeitos adversos mais brandos, essas substâncias se apresentam como promissoras alternativas à medicina tradicional, diante da tecnologia e diversidade de estratégias e métodos disponíveis para a descoberta de novos fármacos¹⁵.

O presente estudo teve por objetivo investigar a ação do extrato etanólico bruto das folhas de *Campomanesia adamantium* e *Hymenaea martiana* Hayne, em células de osteossarcoma canino (D-17) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) submetidas ao estresse oxidativo. Considerando o potencial terapêutico dos gêneros *Campomanesia* e *Hymenaea*.

1. CICLO CELULAR

As células se dividem constantemente para manter o número ou para renovar as que não mais mantêm seu estado metabólico. Para que isso aconteça, uma sequência de eventos ocorre de forma organizada, duplicando o conteúdo celular e originando duas células filhas, geneticamente idênticas¹⁶. A divisão celular é induzida por fatores internos e externos à célula. Os fatores internos são os produtos gênicos que induzem a reprodução nos tecidos que não sofreram ou estão em fase inicial de diferenciação celular. Os fatores externos são influenciados por substâncias que agem tanto no ponto de partida do ciclo celular como nos fatores de crescimento^{16,17}.

O ciclo celular compreende o período de vida da célula desde o seu surgimento até sua divisão em células filhas, ou seja, este ciclo compreende os eventos de duplicação do DNA e divisão celular¹⁸. O ciclo celular acontece em duas etapas, a interfase e a divisão. A interfase é o período entre duas divisões sucessivas da célula.

Nessa fase, a célula passa a maior parte de seu tempo de sobrevivência e ocorre intenso metabolismo¹⁷.

A interfase é dividida nas fases G0, G1, S e G2. Na fase G0 a célula não se replica. Na fase G1 ocorre o crescimento celular, a diferenciação e produção de proteínas, enzimas e RNA. A fase S tem como evento predominante a duplicação do material genético. Durante a fase G2 acontece o término da duplicação dos componentes do citoplasma e um intervalo metabólico, para que ocorra a verificação do DNA duplicado e se a célula está preparada para mitose^{16,17,18}.

Na etapa de divisão ocorre a mitose, que corresponde a fase M, onde a célula passa pelo processo de produção do fuso mitótico e divisão do núcleo e do citoplasma. A separação final das células filhas é chamada de citocinese¹⁶. Entre os mecanismos reguladores da multiplicação da célula, estão presentes nas fases do ciclo celular os chamados pontos de checagem, que podem interromper o progresso do ciclo celular e ativar os mecanismos de reparo¹⁶. Após os pontos de checagem, a célula passa para a fase seguinte e este processo é irreversível (Figura 1). O que ocorre com a célula neoplásica é que as falhas não são reparadas e ela permanece no ciclo celular de forma indefinida, geneticamente instável, proliferando de forma descontrolada e ignorando os pontos de checagem¹⁹.

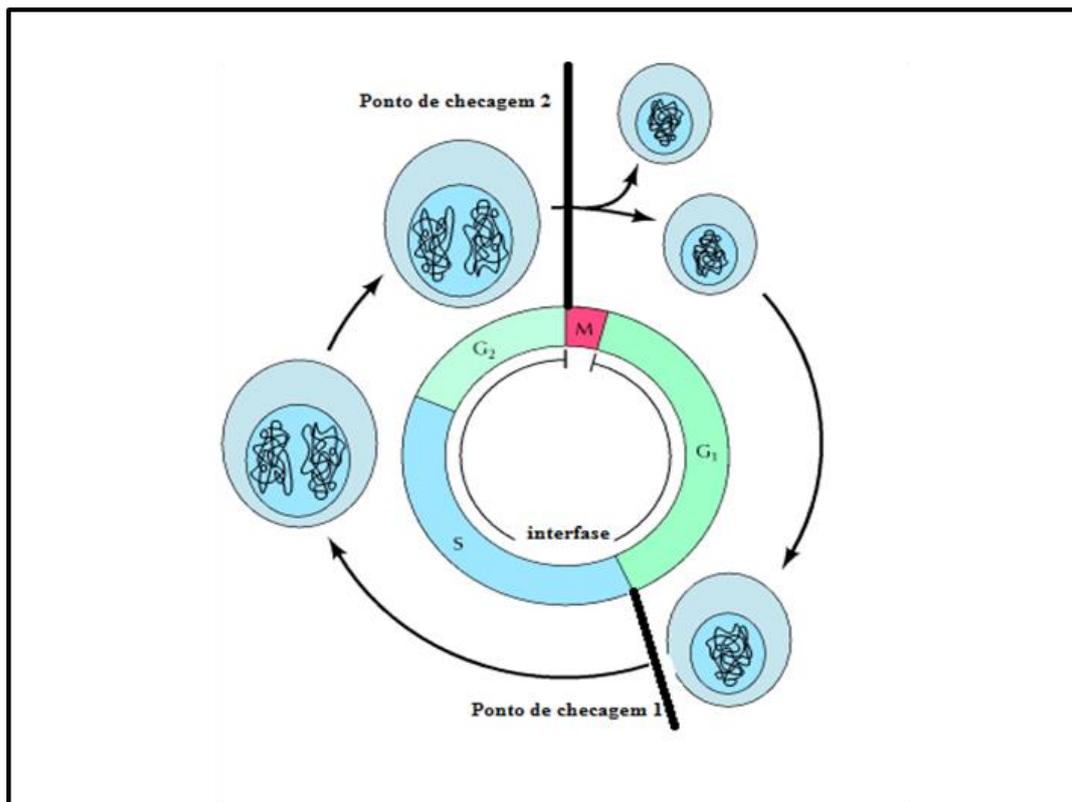


FIGURA 1 - Ciclo celular na fase G₁ ocorre a descondensação dos cromossomos e a síntese de RNA e proteínas; na transição da fase G₁ ocorre o primeiro ponto de checagem; durante a interfase o DNA nuclear é duplicado; a fase G₂ é caracterizada pelo crescimento celular e síntese de DNA; na fase G₂ está o segundo ponto de checagem; na fase M a célula é dividida em duas células filhas.

Fonte: Adaptado de Belizario¹⁶.

A morte celular programada ou apoptose é outro mecanismo regulador da multiplicação das células que podem levar à morte células que apresentam a possibilidade de se tornarem alteradas e levar a doenças¹⁷. É um processo fundamental no desenvolvimento e na homeostasia tecidual ocorrendo nos organismos multicelulares como resposta a estímulos intra ou extracelulares.

Durante a vida de um indivíduo, a apoptose é essencial como estratégia de defesa na remoção de células com mutação ou infectada, como resposta a fenômenos de citotoxicidade ou para desenvolvimento embrionário normal. Quando acontecem falhas na regulação da morte celular programada, os resultados são alterações como defeitos de desenvolvimento, doenças autoimunes, neurodegeneração ou câncer¹⁶.

Em contrapartida durante a respiração fornecemos às nossas células oxigênio necessário para produção de energia através um processo que recebe o nome

de metabolismo oxidativo. Nesse processo o oxigênio é reduzido e as ligações covalentes da glicose são quebradas liberando gás carbônico, água e energia²⁰. A mitocôndria é a principal organela celular envolvida, onde atuam várias enzimas responsáveis por catalisar esse processo. Na maior parte dessas etapas há a formação de subprodutos benéficos, porém cerca de 5% podem ser tóxicos para célula em altas concentrações²¹, causando o estresse oxidativo.

1.1. Estresse oxidativo e vias de ativação da apoptose

O oxigênio durante o transporte de elétrons na mitocôndria pode ser parcialmente reduzido gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($H\dot{O}$) e peróxidos orgânicos²¹. O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio grave entre as espécies reativas de oxigênio e o sistema oxidante, ou seja, produção e eliminação da EROs^{22,23}.

A produção da EROs ocorre a partir de fontes endógenas ou fontes exógenas. As fontes endógenas incluem tanto organelas intracelulares, bem como fontes inflamatórias. Fontes exógenas incluem xenobióticos, produtos farmacêuticos e radiação. A inibição de defesas oxidantes pode resultar no estresse oxidativo que pode gerar mutação em genes e ter como resultado a carcinogênese²⁴.

Diversos tipos de câncer incluindo, mamário, leucemias, carcinomas gástricos, prostático, e de cólon, apresentam elevados níveis de células neoplásicas que estão geralmente expostas a condições de estresse, como hipóxia e perda de célula-célula e célula-matriz extracelular, desbalanço no metabolismo oxidativo e entre outros fatores ambientais²⁵.

As EROs regulam várias etapas de transdução de sinais, e ainda podem participar de diferentes etapas de transformação e progressão de neoplasias, como a autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão e metástase, metabolismo e inflamação²⁶.

Entre as vias reguladoras das EROs as que se destacam são as proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K). A MAPK tem papel na formação de tumores principalmente por ativar fatores de transcrição como c-jun e c-fos, que atuam na expressão de genes envolvidos em proliferação

celular, diferenciação, transformação, inflamação, entre outros. Enquanto isso PI3K está relacionada à via de RAS, que tem papel fisiológico importante na sobrevivência celular. Entretanto vários mecanismos podem levar a sua desregulação e contribuir para o desenvolvimento de neoplasias. Ainda como função já relatada do estado oxidativo no controle da viabilidade celular é a relação do ciclo celular, umas das proteínas que atuam na checagem é a quinase ataxia-telangiectasiã mutada (ATM), da mesma família da PI3K^{20,26}.

O estresse oxidativo é um dos fatores que desencadeiam a apoptose. Vários fatores desencadeiam a apoptose, junto dele ainda estão: a ligação de moléculas a receptores de membrana, danos ao DNA, agentes quimioterápicos, a radiação ionizante, falta de controle dos fatores de crescimento, falta de nutrientes^{20,27}.

O processo de sinalização que desencadeia a via intrínseca é tão homogêneo quanto os estímulos iniciadores, e todos os mecanismos estão associados a uma mitocôndria²³. A via extrínseca é desencadeada por sinais de estresse extracelulares, que são sentidos e difundidos pelos receptores transmembranares específicos como o fator de necrose tumoral (TNF)²⁸.

A Via de apoptose extrínseca é mediada pelos receptores de morte: fator de necrose tumoral (TNF), ligante de fator de apoptose (TRAIL), receptor do fator de necrose tumoral (TNFR1) e ácido graxo sintase (Fas). Tais receptores estão presentes na membrana plasmática, porém na via intrínseca a mediação acontece por meio da mitocôndria⁴⁰. As duas vias têm grupos independentes de caspases iniciadoras (casp2, 8, 9 e 10) e grupos comuns de caspases efetoras (casp3, 6 e 7). Ambas executam eventos que levarão a apoptose celular²⁸.

A via extrínseca é estimulada quando os sinais de morte celular FASL/CD95 (receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose), TNFRF, ou TRAIL fazem interação²⁸. A estimulação do ligante de morte tem como consequência, a oligomerização dos receptores, recrutamento da proteína domínio de morte associada a Fas (FADD), e recrutamento da caspase iniciadora (casp8), constituindo o complexo de sinais que induzem a morte. A auto-ativação da casp8 no sinal de indução de morte, é seguida pela a ativação das caspases efetoras à jusante, levando a célula a apoptose^{28,29,30} (Figura 2).

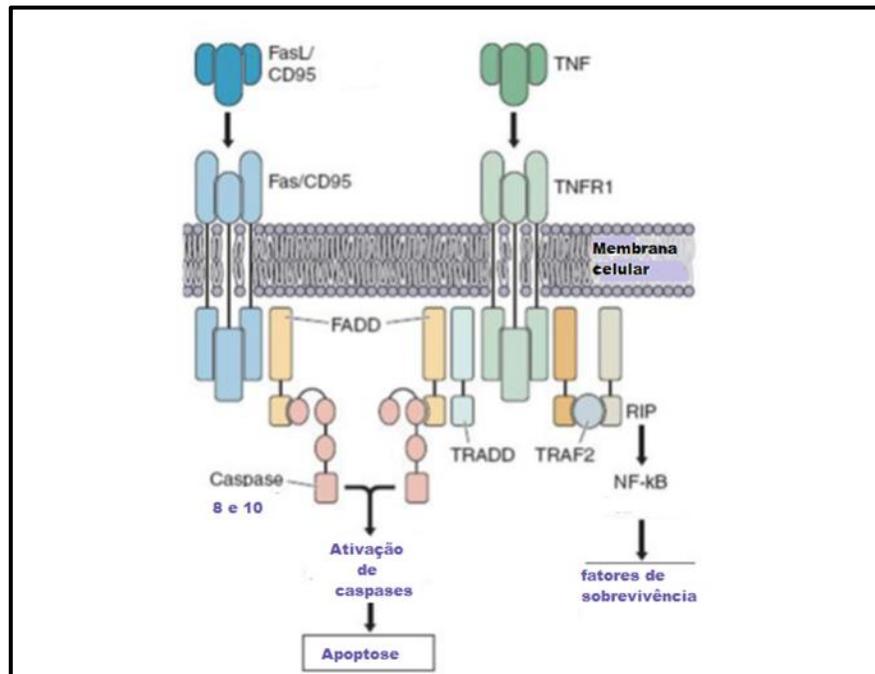


FIGURA 2 - Via extrínseca da apoptose desencadeada pela ligação de receptores de fator de necrose tumoral da membrana que ativa a cascata das Caspases levando a célula a apoptose.
Fonte: adaptado de Rao et al.³⁰.

A ativação da via de apoptose intrínseca ocorre por estresse intracelular ou extracelular, como a desregulação dos fatores de crescimento, radiações, hipóxia, alterações no DNA ou ativação da oncogenes²⁸. Os sinais que são traduzidos em resposta à ativação convergem para a mitocôndria, que integra os estímulos de morte da célula, induz a permeabilização mitocondrial e a liberação de moléculas pró-apoptóticas³¹. Assim que os sinais de morte chegam à mitocôndria, ocorre o colapso do potencial da membrana interna, bem como a transição da permeabilidade mitocondrial. Simultaneamente, a água do espaço entre as membranas passa para a matriz mitocondrial. Isso leva à ruptura da organela, o que resulta na perda da homeostase celular, na interrupção da síntese de ATP e no aumento da produção de EROs³¹. Aumentado o nível de EROs, ocorre a oxidação dos lipídeos, das proteínas e dos ácidos nucleicos, elevando o colapso da membrana interna³⁰.

A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é a via de início da apoptose. Durante a apoptose, é formado um megasporo, que possui uma diversidade de proteínas e abrange as membranas da mitocôndria. É por ele que ocorre a liberação do citocromo c e proteínas ativadoras de apoptose para o citosol. No citosol, o citocromo c forma um complexo com o fator de ativação de protease associada a apoptose 1 (APAF-1) e a caspase-9, o denominado apoptossomo, que faz a clivagem da pró-

caspase-9, e libera a caspase-9 ativa. Quando ativada, a caspase -9 faz a ativação da caspase-3 que induz a apoptose³⁰ (Figura 3).

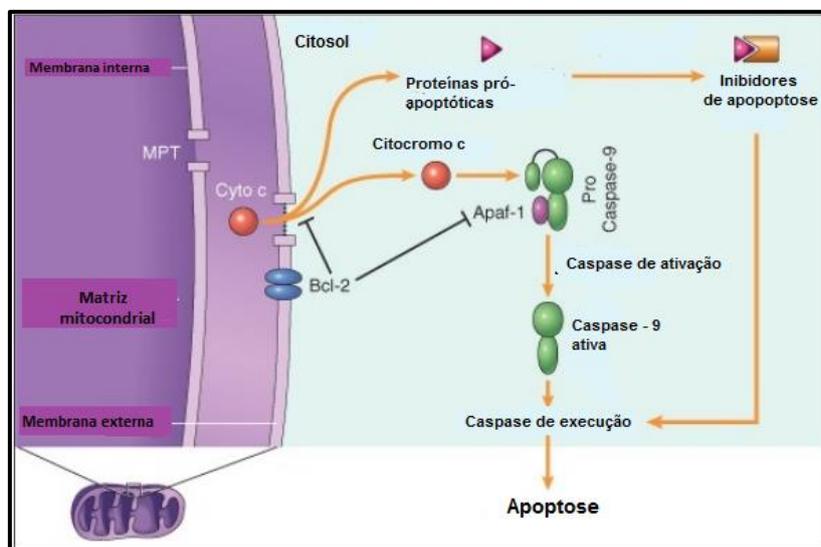


FIGURA 3 - Esquema do processo de ativação da apoptose pela via intrínseca que ocorre quando há a retirada dos fatores de crescimento ou danos ao DNA, as moléculas pró-apoptóticas como o citocromo c são ativadas, resultando na ativação das caspases iniciadoras e efetoras, levando a célula a apoptose.

Fonte: Adaptado de <http://ormigta.blogspot.com>

2. CÂNCER

A palavra câncer, de origem latina, é a tradução do termo grego carcinoma, que significa caranguejo. Essa analogia foi utilizada pela primeira vez na antiga Grécia por Hipócrates, que associou a semelhança entre as patas do crustáceo e a vascularização em volta de um tumor³². Descobertas em múmias egípcias demonstram que a doença já atingia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo no “papiro de Georg Elbers”, que data 1600 a.C, é relatado um tratamento de um tumor mamário à base de mel e ervas e que não funcionou. Segundo Hipócrates o câncer seria causado pelo excesso de bile negra, substância produzida no baço e no estômago. No século XVII foi provada que essa afirmação era falsa³³.

Aproximadamente em 1915 um experimento com ratos comprovou que agentes químicos podem induzir o câncer, comprovando a teoria de Percival Pott, que no século XVIII, observou que limpadores de chaminés da Inglaterra, quando comparado a outras pessoas, tinham maiores chances de desenvolver câncer⁴⁵. Em

1955 o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (INC) deu início ao programa de pesquisas de medicamentos com capacidade de combate ao câncer. O INC já testou mais de 500 mil tipos de diferentes substâncias em animais³⁴.

No início dos anos 60 descobriu-se que o tabaco é um agente causador de câncer. Atualmente há discussões que a tumorigênese esteja associada a padrões alimentares como produtos alimentícios ricos em carboidratos (batata, pães e cereais prontos para consumo). Ainda se discute sobre carnes e produtos à base de proteínas, pois eles poderiam causar tumorigênese devido ao conteúdo conservante genotóxico e carcinogênico^{35,36}.

O desenvolvimento de instrumentos cirúrgicos e a inovação do microscópio auxiliou não somente os médicos a detectarem os tumores, mas também os mecanismos envolvidos na formação das neoplasias³⁷. A descoberta da radioatividade pela polonesa Marie Curie e colaboradores, contribuiu para a idealização da radioterapia, este foi o primeiro tratamento capaz de tratar as células cancerosas. Nessa época ainda não havia drogas para quimioterapia³⁸.

O câncer se caracteriza por uma proliferação desordenada de células, que possuem a tendência de invadir tecidos e órgãos vizinhos^{4,23,24}. Mesmo com todos os avanços no tratamento, o câncer ainda é um problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, e é uma das maiores causas de morte em todo mundo^{39,40,41}.

O surgimento do câncer no organismo acontece a partir de mutações em genes essenciais ao funcionamento da célula, que de forma coletiva, contribuem para o desenvolvimento de tumores malignos⁴². Essas alterações mutagênicas podem propiciar às células neoplásicas propriedades como a autossuficiência em relação aos sinais de crescimento, a falta de sensibilidade a sinais que inibem o crescimento, evasão a apoptose, ilimitado potencial de replicação, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase^{42,43}.

Segundo Naoum e Naoum⁴⁴, o processo que leva à formação do câncer recebe o nome de carcinogênese. Este processo ocorre de forma lenta e pode levar muitos anos para que um conjunto de células neoplásicas se torne um tumor detectável clinicamente. A carcinogênese consiste nos estágios de iniciação, promoção e progressão⁴².

Na iniciação, as células sofrem o efeito do agente carcinogênico ou “oncoindicador”, que causa alteração em alguns genes. Nesse estágio, mesmo que a

célula esteja geneticamente modificada, ainda não é possível a detecção clínica de um tumor. Esse estágio pode ser facilitado quando houver suscetibilidade genética e/ou latência, tornando-se um risco para o desenvolvimento do câncer em uma fase tardia. Os agentes carcinogênicos ou “oncoindicadores” podem ser endógenos, quando se referem a herança genética, erros na replicação do DNA e alterações dos radicais livres durante o metabolismo celular; ou exógenos, quando relativos à radiação ionizante e agentes químicos cancerígenos^{44,45}.

Na promoção, as células que foram alteradas geneticamente passam pelos efeitos dos agentes “oncopromotores” ou cancerígenos. Ao sofrer esse processo, a célula vai se transformando lentamente e gradualmente em célula maligna. Para acontecer a transformação é necessária a exposição longa e continuada ao agente carcinogênico promotor. Caso seja suspenso o contato com este agente, ainda pode ocorrer a interrupção do processo carcinogênico nesse estágio⁴⁴.

Na progressão, ocorre o descontrole durante a multiplicação celular. Esta etapa é irreversível, ou seja, a neoplasia maligna está instalada e as manifestações clínicas da doença começam a surgir. Na fase de progressão ocorre a perda da sensibilidade aos sinais que inibem a proliferação, em função das alterações que ocorrem nos mecanismos regulatórios que controlam a multiplicação celular^{44,45}.

Células normais necessitam de sinais mitogênicos de crescimento e, assim, passam do estado quiescente para a proliferação ativa. A sinalização é transmitida para o interior da célula através de receptores transmembrana, que ativam diferentes classes de moléculas, como fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão⁴⁶. A aquisição de autonomia de sinais de crescimento foi a primeira capacidade adquirida pela célula tumoral, a ser definida de forma clara pelos pesquisadores em câncer⁴⁷. Três estratégias moleculares comuns para a autonomia envolvem alterações em sinais de crescimento extracelulares, em transdutores transcelulares da sinalização, ou de circuitos intracelulares que traduzem estes sinais em ação⁴⁷.

Os diferentes tipos de câncer são classificados de acordo com o tipo de tecido onde eles se originam. Se derivar dos tecidos epiteliais, a neoplasia é denominada carcinoma, tipo de câncer mais comum em humanos. Caso seja originada de tecido mesenquimal, recebe o nome de sarcoma. Quando se inicia no sistema linfático, é denominado linfoma e há ainda a leucemia, que é a neoplasia maligna da medula óssea⁴⁵.

Os tipos principais de tratamento para o câncer são a quimioterapia, a radioterapia, cirurgia, terapia hormonal e imunoterapia^{5,7}. A quimioterapia consiste na destruição das células cancerígenas, que se caracterizam por apresentar uma divisão com rapidez maior que a células com divisão normal. Porém, este tipo de tratamento apresenta constantemente efeitos adversos em células normais, principalmente gastrointestinais, capilares e do sistema imunológico^{3,19}.

Os fármacos quimioterápicos mais utilizados no tratamento do câncer humano são a mercaptopurina, tioguanina (antimetabólitos que causam principalmente a inibição da síntese das purinas), hidroxiureia, fluruoracila (agem inibindo a formação dos dextrorribonucleotídeos), Cisplatina (modificação do DNA por alquilação), bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, etoposídeo (interação com topoisomerase II), actinomicina D, vincristina e vimblastina (inibe a síntese do RNA ou de proteínas) e taxanos (interação com a tubulina)³ (Figura 4).

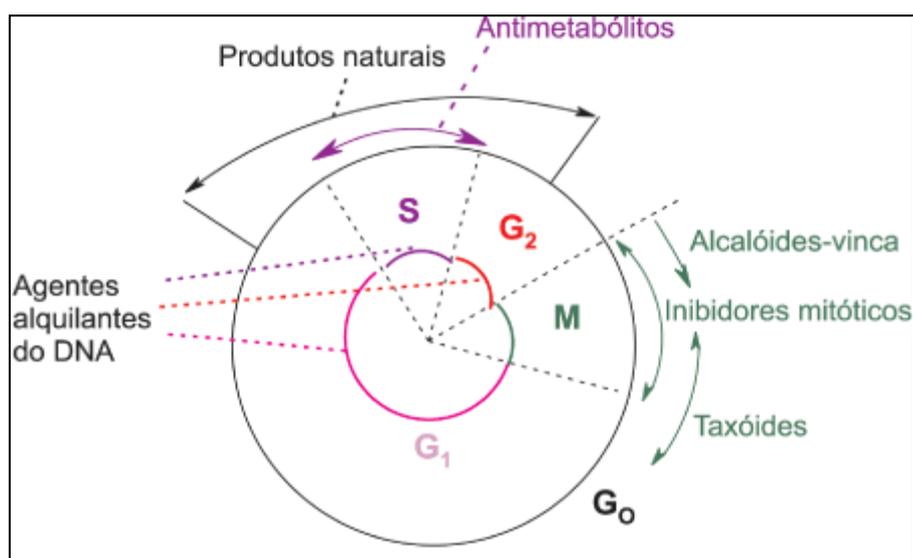


FIGURA 4 - Esquema representando atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos dependendo da fase do ciclo celular.

Fonte: Almeida et al.¹⁹.

A estratégia preferencial das terapias antineoplásicas consiste na associação de fármacos quimioterápicos, apresentando alta incidência de reações adversas em decorrência da sua alta toxicidade. Ainda, a diminuição da eficácia da terapia associativa contra as neoplasias pode ocorrer pela resistência a multifármacos (*multidrugresistence* - MDR). A multirresistência acontece quando a célula com câncer fica protegida da ação tóxica dos fármacos quimioterápicos. A MDR ocorre

frequentemente, fazendo com que seja necessária a indicação de terapias associadas de mais de um fármaco⁴⁸.

As estratégias para a descoberta de novos fármacos antineoplásicos tem sofrido uma alteração notável que acontece devido às elucidções da base molecular para transformação da célula normal em célula cancerosa. Conhecer a biologia do câncer tem possibilitado a descoberta de alvos específicos como os receptores de fatores de crescimento, vias de sinalização intracelulares, processos epigenéticos, vascularidades dos tumores, defeitos no reparo do DNA e vias de morte celular. Por exemplo, vários tumores possuem a proliferação e a sobrevivência dependente de uma única via de fatores de crescimento, inibindo assim essa via específica, ocorrerá a morte celular⁴⁹.

A fotorradiação e a imunoterapia são técnicas antineoplásicas também muito utilizadas em associação a uma das terapias supracitadas. A fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP) apresenta a vantagem de selecionar melhor a célula a ser destruída, porém ela não pode ser utilizada internamente, somente em tumores que são superficiais, pois pode haver acumulação de porfirinas nos órgãos sadios. A imunoterapia estimula as defesas do organismo com interleucina-2, interferon α , e ainda o Bacilo Calmette-Guérin (BCG), técnica utilizada principalmente para destruir células neoplásicas remanescentes de cirurgias^{3,48,50}.

É consenso entre pesquisadores e profissionais de saúde que é necessário empregar medicamentos que apresentem maior eficiência e menor efeito adverso para o tratamento do câncer. Nesse sentido, diversos centros de excelência em pesquisa têm buscado o desenvolvimento de novos quimioterápicos a partir de plantas, já que diversos fitoquímicos podem apresentar atividade antiproliferativa, inativando os eletrófilos reativos que apresentam potencial carcinogênico e eliminando espécies reativas de oxigênio que poderão dar início à carcinogênese^{31,32}. Para investigar se o fitoquímico pode potencialmente destruir uma célula com câncer, são realizados testes de citotoxicidade em linhagens neoplásicas em cultura onde o fitoquímico é colocado em contato direto com a cultura celular, observando-se a possível apoptose da célula⁵².

A atividade antiproliferativa é parâmetro para que seja detectada atividade antitumoral³³. Para avaliação desta atividade são realizados ensaios utilizando metodologias como contagem celular, ensaios clonogênicos, e medida de incorporação de nucleotídeos radioativos ou métodos colorimétricos⁵³. A maioria dos métodos

colorimétricos avalia a taxa de crescimento e multiplicação, de forma indireta, por algum indicador de crescimento por meio da revelação da coloração⁵⁴.

3. OSTEOSSARCOMA CANINO

3.1. Introdução

O câncer acomete tanto cães de raças puras, quanto mestiços, e é um problema comum, porém algumas raças puras apresentam maior risco de desenvolverem certos tipos de tumores, sugerindo uma predisposição genética. O osteossarcoma canino (OSA) é uma das neoplasias primárias mais comum em cães, expressando cerca de 80% das neoplasias que originam nos ossos^{55,56,57}. Este tipo de tumor é agressivo nos cães, tanto localmente, quanto sistemicamente, por causa do desenvolvimento de metástase. Os cães são acometidos por esta neoplasia por volta dos sete anos de idade^{58,59,60}. Geralmente os cães de porte grande e gigante desenvolvem OSA mais jovens do que os cães de porte pequeno.

O sistema esquelético é organizado em duas divisões: esqueleto axial, e esqueleto apendicular que é constituído pelos membros pélvicos e torácicos⁶¹. Em cães, 75% dos casos acometem o esqueleto apendicular^{59,60,62,63}, com ocorrência uas vezes maior em membros torácicos do que rádio, úmero proximal, fêmur distal e proximal os locais mais comuns ^{59,60} (Figura 5). Somente 25% dos casos de OSA canino afetam o esqueleto axial, composto por crânio, coluna vertebral e esterno, costelas e pelve. Embora as raças pequenas sejam pouco acometidas pelo OSA, quando este ocorre destaca-se uma frequência maior no esqueleto axial⁶⁴.

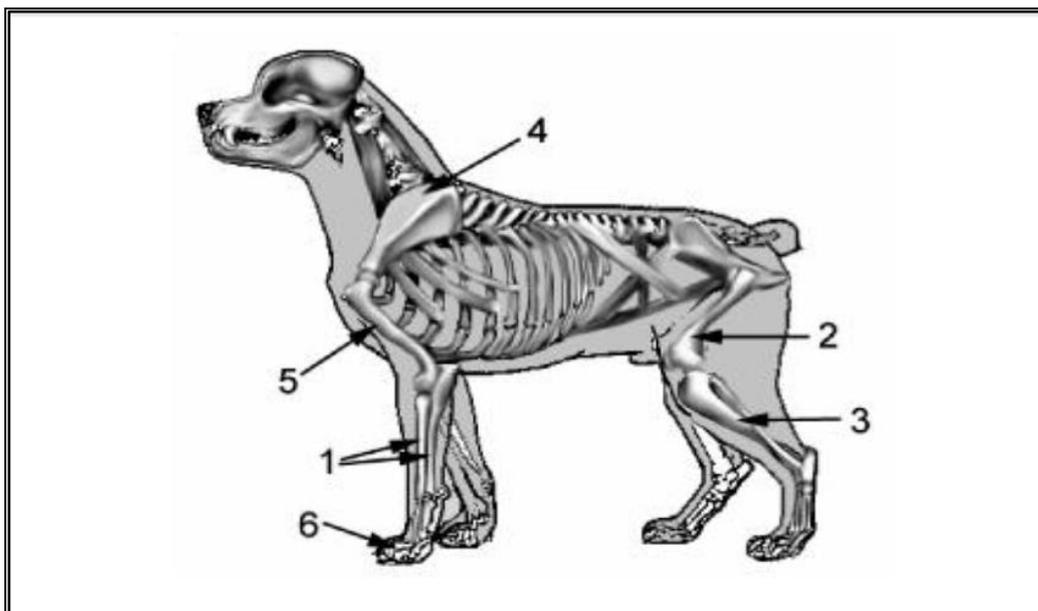


FIGURA 5- Regiões do esqueleto apendicular canino mais afetado por osteossarcoma: 1 - Rádio e ulna, 2 - Fêmur, 3 - Tíbia, 4 - Escápula, 5 - Úmero 6 – Falanges. Fonte: Adaptado de Cavalcanti et al.⁶⁵

Como supracitado os cães de raça gigante e de grande porte são os mais acometidos pelo OSA, e as raças que apresentam o maior risco para desenvolver a neoplasia são: Rottweiler, Setter Irlandês, Boxer, Fila Brasileiro, São Bernardo, Doberman, Dogue alemão, Labrador Retriever, Pastor Alemão^{64,66}. O porte provavelmente é maior fator predisposição^{67,68}, bem como os machos são mais acometidos que as fêmeas⁶⁶.

3.2 Etiologia

O osteossarcoma apresenta etiologia desconhecida, porém segundo alguns autores a causa deste tipo de tumor pode ser multifatorial^{69,70}. O que as evidências mostram é que há a tendência de que a neoplasia se desenvolva em ossos que suportam maior peso^{70,71}, e em especial às fises que se fecham tardiamente nos ossos longos e que possuem maior atividade celular. Segundo alguns autores o desenvolvimento de tumores pode ocorrer em cães de raças grandes e gigantes em razão do crescimento rápido das cartilagens epifisárias e devido à predisposição a pequenos e múltiplos traumas^{55,69,72}. As neoplasias também podem se desenvolver em locais de velhas fraturas, principalmente aquelas de lenta cicatrização⁷². Fatores genéticos podem ser etiologicamente importantes no osteossarcoma. A radiação ionizante também pode induzir surgimento de tumores⁷³.

3.3. Sinais clínicos

O osteossarcoma caracteriza-se por apresentar crescimento rápido e progressivo e baixos índices progressivos de sobrevida⁷⁵. A manifestação clínica mais observada geralmente é a claudicação. A claudicação aguda, em geral, ocorre devido à microfraturas ou fragmentação do periósteo⁷². Outros sinais clínicos observados incluem edema e dor, que geralmente estão associados distensão periósteo^{55,75}. Junto a esses sinais e com o processo crônico da doença, ainda é observado muito comumente a atrofia muscular por desuso do membro afetado⁷⁶.

Outros sinais clínicos associados ao OSA no esqueleto axial dependerão de onde o tumor estará localizado. Quando localizado na mandíbula e na maxila pode apresentar sinais como dor, edema, sangramento oral e desconforto ao abrir e fechar a boca. O OSA quando localizado nos seios nasais pode apresentar sinais como epistaxe, exoftalmia, dispneia e deformidade facial e neoplasias na coluna vertebral que apresentam hiperestesia com ou sem sinais neurológicos⁷⁷. Os tumores localizados nas costelas em sua maioria podem ser palpáveis sendo observável ainda dispneia secundária. Quando localizada na pelve os sinais observados são: tremores, atrofia dos músculos por desuso, dificuldades de levantar e incontinência urinária e fecal, letargia e anorexia⁷². As taxas de metástases são altas e acontecem por via hematogêna para outros ossos, para órgãos viscerais, pele, pulmões, cérebro, linfonodos⁶⁴.

3.4. Diagnóstico

O diagnóstico do OSA é realizado com base no histórico clínico, exame físico, exame radiográfico^{71,72,77}, cintilografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética⁷², mensuração da fosfatase alcalina e análise citológica. Entretanto, a biópsia do tecido neoplásico e avaliação histopatológica são as formas mais eficientes para o diagnóstico definitivo^{72,73}.

O exame radiográfico apresenta grande relevância para determinação da extensão do envolvimento ósseo e distinção dos tumores ósseos de outras enfermidades não neoplásicas tais como fraturas, osteomielite e doenças ósseas metabólicas. Radiograficamente a lesão causada pelo OSA canino apresenta aspecto agressivo podendo ser lítica, proliferativa ou mista, com lise de osso cortical ou medular e produção de novo tecido ósseo no interior do tumor ou sob periósteo, demonstrando-se com aspecto que se assemelha a “explosão solar”^{78,79}.

A cintilografia é altamente sensível para diagnosticar metástases ósseas. Ela é utilizada para avaliar a remodelação óssea^{78,80}, e apresenta eficácia para identificação de lesões não neoplásicas como osteoartrose e osteomielite⁸¹. A utilização da tomografia computadorizada é principalmente para a caracterização de lesões primárias de OSA em cães, porém ela ainda avalia a distribuição de metástases^{81,82}, sendo mais eficaz para a identificação de metástases pulmonares⁷⁸. A tomografia ainda pode avaliar a lise óssea e é útil nos casos em que o esqueleto axial está acometido⁷⁸. Pode ser utilizada ainda para identificar o OSA localizado no perióstio devido à visualização da porção cortical do osso⁷⁸.

A ressonância magnética pode ser utilizada para avaliação da extensão do tumor e sua relação com estruturas adjacentes, sendo necessária em casos em que o tumor está localizado no esqueleto axial devido à proximidade com o canal vertebral, demonstrando ser a melhor utilização para diagnóstico nestes casos⁷⁹. A ressonância possibilita a visualização da imagem em diversos cortes e planos, demonstrando melhor resolução de tecidos moles. O ponto negativo desta técnica é o custo elevado e seu acesso é limitado na medicina veterinária⁸².

A fosfatase alcalina sérica quando em valores elevados pode estar associada a um diagnóstico ruim em cães acometidos por OSA^{71,75,83}. Animais com fosfatase alcalina óssea e total normais antes e durante o tratamento sobrevivem significativamente mais do que os animais que possuem essa taxa elevada⁸². Em casos de níveis elevados depois de 40 dias de remoção cirúrgica há chances altas de desenvolvimentos de metástases a curto prazo⁷⁵.

A análise citológica abrange a biópsia óssea para o exame histopatológico como padrão para o diagnóstico de OSA em cães e a citologia aspirativa com agulha fina (CA)⁷². A avaliação histopatológica apresenta precisão para obtenção do diagnóstico. Classifica-se o tumor baseado na formação de diferentes tipos de matriz nos subtipos osteoblástico, fibroblástico, condroblástico ou telangiectásico⁷¹ não sendo observada diferença em relação ao comportamento biológico entre esses subtipos em cães⁷². Porém, não permite uma avaliação da gradação da morfologia do tecido, particularmente no que se refere à invasibilidade de tecidos adjacentes e se os vasos linfáticos foram comprometidos.

3.5. Estadiamento

O estadiamento clínico conhecido como Sistema TNM, é estabelecido a partir de dados dos exames do primeiro diagnóstico e antes do primeiro tratamento antineoplásico⁸³. O TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) as siglas incluem, tamanho do tumor primário (T), o envolvimento de linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M)⁸⁴. O conhecimento do estadiamento tumoral é de fundamental importância para que seja estabelecido o diagnóstico e a terapia que deverá ser utilizada. Segundo Loukopoulos & Robinson⁸³ algumas características clínicas determinam maior malignidade ao OSA, dentre elas pode-se citar cães com menos de quatro anos, os OSA osteoblásticos e tumores distais.

3.5. Tratamento

O tratamento de OSA canino quando acomete o esqueleto apendicular o tratamento utilizado é amputação do membro ou ressecção do tumor combinada com a cirurgia buscando poupar o membro, quimioterapia e radioterapia^{63,85,86}. Para esse tipo de tumor é indicada a cirurgia para remoção do tumor primário e alívio da dor^{64,79}. A radioterapia é oferecida como tratamento paliativo com o objetivo de controle do tumor localmente e da dor, aproximadamente 70% dos pacientes apresentam resposta positiva ao tratamento.

A quimioterapia é utilizada para diminuir a incidência das metástases pulmonares e ósseas, a resposta de cada animal ao tratamento quimioterápico é variável, podendo resultar em insucesso⁷². Cisplatina, doxorrubicina ou carboplatina são utilizadas, individualmente ou associadas, na prevenção a recorrência e o desenvolvimento de metástases após a cirurgia^{63,79}. Após o tratamento, a sobrevida média proporcionada por todos os protocolos quimioterápicos descritos é em por volta de um ano e nenhum dos protocolos se apresenta de forma mais eficaz.

Apesar dos avanços científicos relacionados aos diversos tipos de terapia, o prognóstico para OSA é ruim⁵⁷, com uma sobrevida média que vai de três meses a um ano, sendo que menos que 20% dos cães sobreviverão por mais que dois anos a partir do diagnóstico⁷¹. A busca de novos medicamentos é importante e cada vez mais intensa, pois ainda não há um tratamento efetivo que seja seletivo. É necessário inovar nas estratégias de impedimento do avanço do câncer, por meio da seleção de moléculas que possuam mecanismo específico para cada tipo de neoplasia. Extratos obtidos de

plantas, que apresentam uma variedade de moléculas que atuam por diversos mecanismos, têm sido progressivamente úteis como terapia anticâncer¹¹. Entre as 174 drogas anticâncer que foram comercialmente disponíveis nas últimas décadas, 10% são de origem e 25% são derivados de produtos naturais¹³.

4. METABOLISMO SECUNDÁRIO DAS PLANTAS

O metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorre ininterruptamente em cada célula. Essas reações visam, primariamente, o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais das células⁵⁴. As plantas continuamente produzem muitos componentes orgânicos que são classificados em metabólitos primários e secundários. Para sua sobrevivência, as plantas realizam o processo denominado fotossíntese, em que a energia luminosa é transformada em energia química, utilizando a energia do sol para oxidar água, fazer a liberar oxigênio, produzir dióxido de carbônico e compostos orgânicos como glicose e outros carboidratos. Estes compostos são chamados de metabólitos primários orgânicos formando o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial à vida do organismo produtor. São usados como fonte de energia na respiração, no crescimento e como precursores na síntese, por meio de reações enzimáticas, de outros compostos e do metabolismo secundário^{54,87}.

O metabolismo secundário pode ser definido como um conjunto metabólico cujos produtos não são essenciais à vida do produtor e que garantem vantagens na sobrevivência e na perpetuação da espécie em seu ecossistema. É um arsenal de metabólitos como enzimas e coenzimas que tem a capacidade de produção, transformação e acumulação de inúmeras substâncias. Essas substâncias exercem funções como defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra radiação ultravioleta (UV), competição entre plantas, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes. Outra característica interessante do metabolismo secundário é sua alta capacidade biossintética, tanto relacionada com a quantidade de substâncias produzidas quanto na variedade numa mesma espécie⁸⁸.

A disponibilidade dos metabólitos pode ser alterada pelo ritmo circadiano da sua biossíntese por ser diretamente ligado pela interação entre a planta e meio em que vive. Haverá variações decorrentes de fatores como o desenvolvimento da planta,

temperatura, altitude, índice pluviométrico, raios UV, macro e micronutrientes, altitude, condições ecológicas ou ambientais, estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Por outro lado, resultados de análises laboratoriais de metabólitos podem sofrer a influência dos métodos de coleta, estabilização e estocagem⁸⁸.

Os metabólitos secundários nas plantas são classificados em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Os terpenos derivam do isopreno e são produzidos a partir do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato. Os compostos fenólicos derivam do ácido chiquímico ou do ácido mevalônico. Os alcaloides, por sua vez, se originam de aminoácidos, como os aromáticos (triptofano, tirosina) derivados do ácido chiquímico, ou podem ter sua biossíntese mediada por aminoácidos alifáticos^{54,87,88} (Figura 5).

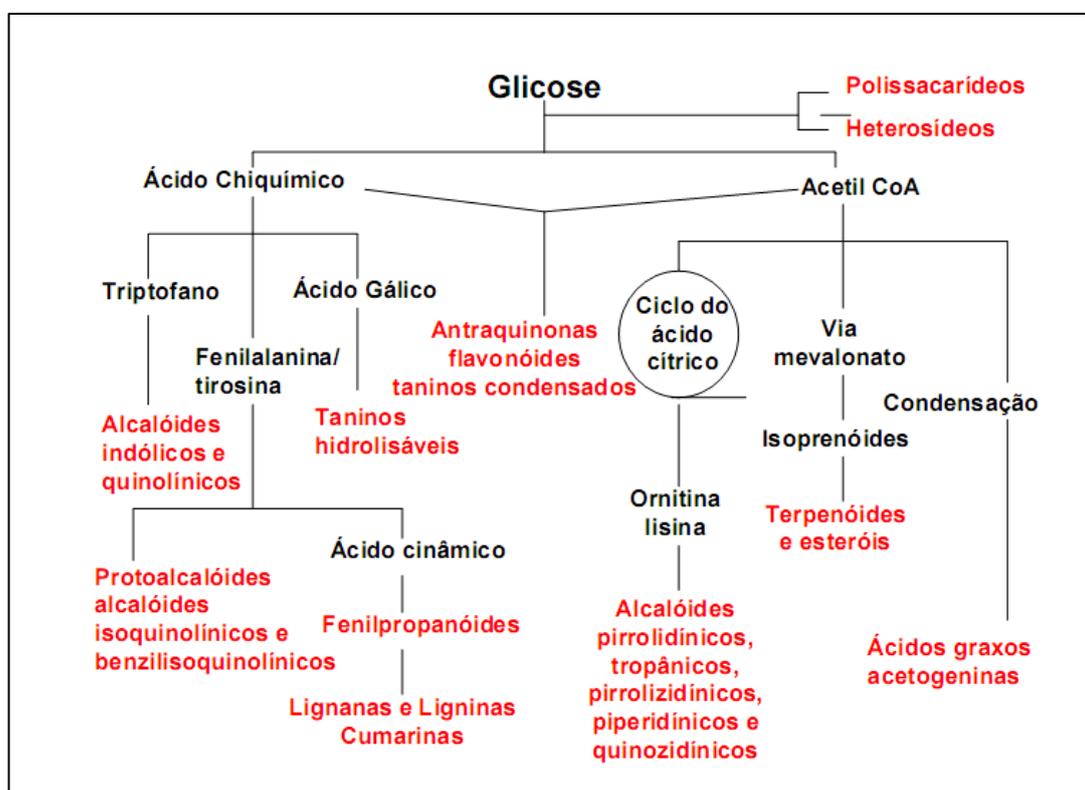


FIGURA 5 – Esquema do ciclo biossintético dos metabólitos secundários dos vegetais. Fonte: Simões & Guerra⁵⁴.

Os terpenos estão presentes nos óleos essenciais, que são conhecidos também como óleos voláteis ou etéreos, por evaporar rápido quando expostos ao ar. Os óleos essenciais são encontrados em diversas partes da planta e são eles que conferem o odor característico dos vegetais. Nas plantas eles servem para atrair

polinizadores e também como repelente de insetos e herbívoros. Entre as propriedades medicinais estão o uso como antisséptico, anti-inflamatório e antipirético⁵⁴.

Além dos aminoácidos, outros precursores como os terpenos esteroides participam da formação da estrutura final dos alcaloides. Estes podem ser encontrados em qualquer parte da planta e estão presentes em representantes de todos os grupos vegetais, porém sua maior ocorrência é nas angiospermas⁵⁴. Plantas produtoras de alcaloides são evitadas na dieta de animais e insetos e são repelidas por herbívoros, provavelmente devido à toxicidade ou ao gosto amargo da maioria dos alcaloides. Ainda assim, são utilizados por determinado grupo de borboletas para defesa contra predadores e até como síntese de feromônios por aranhas. Uma possível função deste metabólito para o vegetal seria a proteção contra radiação UV, pois seu núcleo aromático possui alta capacidade de absorção dessa radiação⁵⁴.

Diversos alcaloides são utilizados na terapêutica, puros, em associação e como matéria-prima para a síntese de fármacos. Como exemplo de maior importância nesse grupo podem ser citados os alcaloides da vinca (*Catharanthus roseus*) como a vincristina e vimblastina, que são utilizados como antineoplásicos⁸⁷.

Os flavonoides são os que estão presentes em maior abundância entre os metabólitos, sendo conhecidos mais de 6.000 flavonoides diferentes. São formados pela combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, por biossíntese mista. São responsáveis pela proteção das plantas contra a radiação UV, insetos, fungos, vírus e bactérias, além de controle da ação dos hormônios vegetais. A proteção contra a fotodestruição proporcionada por esses compostos ocorre devido às suas propriedades de absorver e dissipar a energia solar. Os flavonoides que são encontrados nas folhas podem ser diferentes dos presentes nas demais partes da planta. Este metabólito apresenta propriedades medicinais como: anticarcinogênico, anti-inflamatório, antialérgico, antiulcerogênico, antitrombótica, vasoprotetora, e antivirais^{54,87,88}.

Entretanto, ainda são poucas as pesquisas referentes ao conhecimento científico de compostos bioativos produzidos pelas espécies vegetais, o bioma cerrado brasileiro é um exemplo, embora exista uma utilização em ampla escala de plantas medicinais pelo conhecimento popular, ainda existem lacunas no campo científico o que torna importante o aprofundamento em estudos⁸⁹. Um exemplo disso são as plantas conhecidas popularmente como gabirobeira e jatobá.

4.1. *Campomanesia* spp.

As plantas conhecidas popularmente como gabirola, gabirola-do-mato, ou guavira pertencem a espécies do gênero *Campomanesia* (família Myrtaceae) e compreendem mais de 30 espécies, das quais 24 ocorrem no Brasil⁹⁰. São subarbustos a arbustos decíduos, apresentando altura de 0,5 a 1,5 m, encontrados com grande abundância na região do Cerrado. O florescimento ocorre geralmente de agosto a outubro, e a frutificação de novembro a dezembro. As flores são brancas e solitárias. Os frutos exalam aroma agradável e cítrico, possuem formato redondo e coloração que varia do verde escuro ao verde claro e amarelo⁹¹ (Figura 6).



FIGURA 6 - A) frutos de gabirola (*Campomanesia adamantium*); B) flor da gabirola; C) gabirola.

Fonte: arquivo pessoal

Na medicina popular as cascas e folhas das espécies de *Campomanesia*, são preparadas por infusão e utilizadas como depurativo, antidiarreico, antirreumático, antiinflamatório, antipirético, antisséptico das vias urinárias, no tratamento de

diabetes, de problemas estomacais e para redução dos níveis sanguíneos de colesterol^{92,93,94,95,96,97}.

Estudos realizados com extratos bioativos de frutos de *C. pubescens* mostraram seu efeito citotóxico *in vitro* nas células cancerosas humanas U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NC1-ADR/RES (ovário resistente), 786,0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), K562 (leucemia) e em VERO (linhagem celular não cancerígena, epitelial de rim de macaco verde). O extrato hexânico e os compostos isolados de chalconas 1e 2 mostraram efeito antiproliferativo potente contra linhagens de células cancerosas com valores de inibição de crescimento total (TGI) menores do que aqueles observados na linhagem celular controle. A atividade mais elevada das chalconas 1e 2 foi detectada nas células MCF-7, PC-3 e HT-29⁹⁸.

Estudos confirmaram que os extratos de folhas e frutos de *C. xanthocarpa* possuem amplo espectro de efeitos terapêuticos, incluindo: propriedades antioxidantes⁹⁹, efeitos antibacterianos¹⁰⁰, efeitos antiulcerogênicos¹⁰¹, efeitos antidiabéticos¹⁰², redução dos níveis de colesterol¹⁰³ e obesidade¹⁰⁴. No entanto, a maioria dos estudos anteriores focou apenas na baixa massa molar compostos e os benefícios de saúde acima mencionados foram atribuídos à presença de vitaminas (principalmente ácido ascórbico), flavonoides, óleos voláteis, carotenoides e fenólicos compostos. Um estudo mais profundo foi realizado com o isolamento da pectina do extrato bruto de frutos da *C. Xanthocarpa*, e mesmo em pequena quantidade as pectinas purificadas apresentaram efeito citotóxico sobre a linhagem de Glioblastoma^{105,106}.

Pesquisas com o óleo essencial e o extrato bruto das folhas de outra espécie, a *C. phaea*, contra bactérias e fungos como o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, demonstraram que o óleo teve ação inibitória para *S. aureus*, *C. albicans* e *A. niger*, e o extrato bruto inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*⁹⁶. A extração com acetona 80% em frutos da *C. cambessedebaba*, apresentou atividade antiproliferativa em células tumorais hepáticas (HepG2)¹⁰⁷.

A partir da investigação química do extrato metanólico das sementes de *Campomanesia lineatifolia*, foram isolados três pigmentos do tipo β -tricetonas. Estes pigmentos apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microorganismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Seraatia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Streptococcus faecalis*¹⁰⁸.

Na medicina tradicional as folhas e frutas de *C. adamantium* são usados como antiinflamatório, antidiarreico e são eficazes contra doenças infecciosas urinárias, e as raízes são utilizadas no tratamento do diabetes⁹⁶.

Vallilo e colaboradores (2006)⁹¹ em pesquisa com frutos da *C. adamantium* demonstraram o potencial no tratamento de câncer de próstata, pâncreas e mama, decorrente da presença do D-limoneno. Outros estudos ainda relatam eficácia como antimicrobianos^{98,109}, antiproliferativa^{110,111}, antiinflamatório, antidepressivo, anti-hiperalgésico, e atividades antidiarréicas dos frutos^{112,113}. Uma pesquisa com os óleos essenciais das sementes e frutos demonstraram atividade anticeptiva e antiinflamatória¹¹⁴. As raízes exibem atividades antioxidantes e efeitos anti-hiperlipidêmicos¹¹⁵. O óleo essencial das folhas apresentam atividade antimicrobiana e propriedades antioxidante¹¹⁶. Os extratos foliares apresentam propriedades antiinflamatórias, antinociceptivo¹¹⁷, antioxidante^{110,116} e atividade antiproliferativa contra as células cancerígenas da próstata diminuiu a expressão de NFkB1 e indução de apoptose¹¹⁰. Extratos aquosos das folhas e raízes de *C. adamantium* causaram citotoxicidade dependente da concentração em células Jurkat (linfoma das células T)¹¹⁸.

4.2. *Hymenaea* spp.

As espécies do gênero *Hymenaea* são conhecidas popularmente como “jatobás” e ocorrem na Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pantanal. O gênero *Hymenaea* é representado por 12 espécies no Brasil, podemos citar como exemplos a *Hymenaea aurea*, *H. courbaril*, *H. intermedia*, *H. maranhensis*, *H. stigonocarpa* e *H. martiana* Hayme¹¹⁹.

As árvores de “jatobás” possuem troncos retos e cilíndricos, de súber liso e de coloração cinza. A floração e a frutificação iniciam entre oito e doze anos de idade da planta, o fruto possui forma de legume unicarpelar e apresenta sabor adocicado, aspecto farináceo, e apresenta alto valor nutritivo para alimentação humana e animal^{120,121}. Paes et al.¹²² relatam que as espécies desse gênero têm elevado valor econômico, devido à alta resistência ao ataque de insetos e fungos que costumam destruir a madeira (Figura 7).

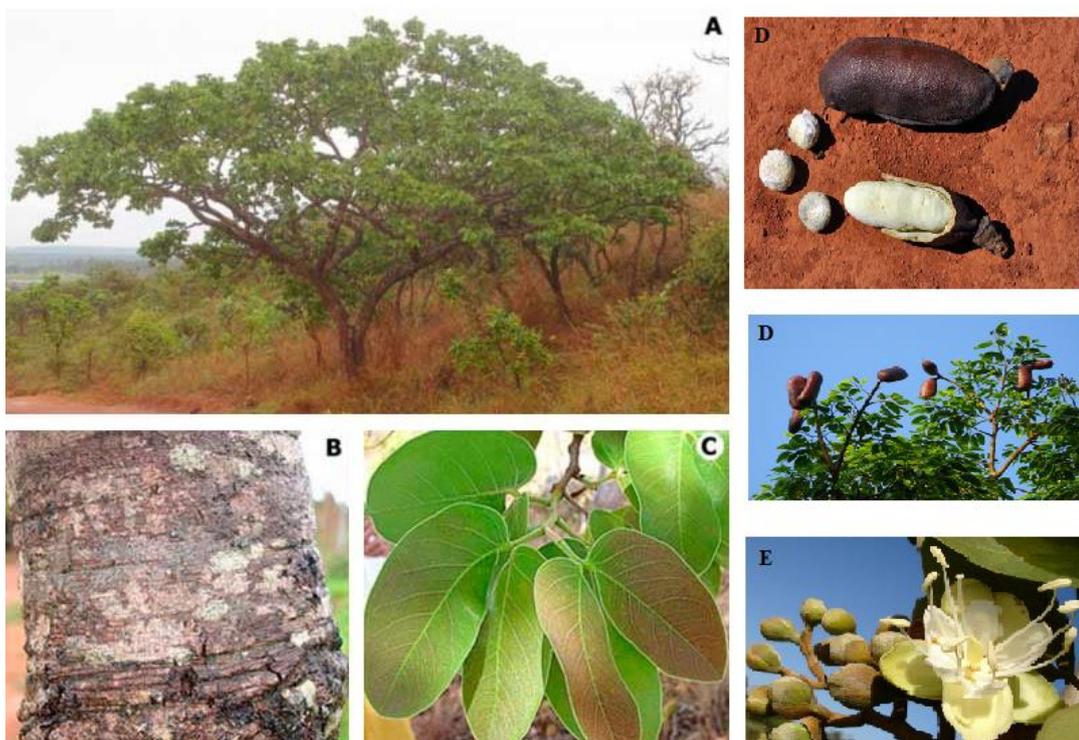


FIGURA 7 - A) Árvore do jatobá *Hymenaea* spp.; B) tronco do jatobá; C) Folhas de *Hymenaea* spp.; D) frutos de *Hymenaea* spp.; F) flores de *Hymenaea* spp.

FONTE: www.taodocerrado.eco.br

As plantas do gênero *Hymenaea* são utilizadas como medicinais no tratamento de processos inflamatórios e infecções bacterianas¹²³. Estudo realizado por Souza et al.¹²⁴ (2009) demonstrou atividade antifúngica e antimicrobiana. Outras pesquisas apresentaram atividade antibacteriana¹²⁴ larvicida¹²⁵; antimicrobiana¹²⁶; antiinflamatório e antioxidante^{128,129}, tratamento de diabéticos¹³⁰. A maioria dos usos tradicionais de *Hymenaea* spp. foram substanciadas por estudos farmacológicos. A literatura revelou que *Hymenaea* spp. apresenta atividades biológicas, incluindo antibacteriano^{131,132,133}, antidiarreico¹²⁸, antifúngico¹³⁴, antiinflamatório¹³⁵, antileishmanial¹³⁶, antinociceptivo¹³⁷, antioxidante^{126,138,139,140}, antiplasmodial¹⁴¹, antiproliferativo^{142,143,144}, antiulcera¹⁴⁵, antiviral¹⁴⁶, hepatoprotetor¹⁴⁷, larvicida^{126,148} e atividades miorelaxantes¹⁴⁹, antimicrobiana^{150,151,152}.

5. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo investigar a ação do extrato etanólico bruto das folhas de *Campomanesia adamantium* e *Hymenaea martiana* Hayne, em células de osteossarcoma canino (D17) e células endoteliais de veia umbilical humana

(HUVEC) submetidas ao estresse oxidativo. Considerando o potencial terapêutico dos gêneros *Campomanesia* e *Hymenaea*.

5.1. Objetivos específicos

- Avaliar a ação do extrato de *Campomanesia adamantium* em células de osteossarcoma canino de cultura estabelecida.
- Avaliar a ação do extrato *Campomanesia adamantium* em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) submetidas ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio
- Avaliar a ação do extrato de *Hymenaea martiana* Hayne em células de osteossarcoma canino de cultura estabelecida.
- Avaliar a ação do extrato e *Hymenaea martiana* Hayne em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) submetidas ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio

REFERÊNCIAS

1. Tanaka T, Shimizu M, Kochi, T, Moriwaki, H. Chemical- induced carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*. 2013; 5 (6) 203-209. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jecm.2013.10.009>
2. TANAKA T. Role of apoptosis in the chemo prevention of cancer. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*. 2013; 5 (3) 89-91. <https://doi.org/10.1016/j.jecm.2013.04.001>
3. Chu CS, Rubin SC. Basic Principles of Chemotherapy. In: *Clinical Gynecologic Oncology (Ninth Edition)*. 2018; 449-469. 2e.
4. Marzo-Castillejo M, Bellas-Beceiro B, Vela-Vallespín C, Nuin-Villanueva M, Bartolomé-Moreno C, Melús-Palazón EE, Vilarrubí-Estrella M. Recomendaciones de prevención del cáncer. Actualización 2016. *Atención Primaria*, 2016; 48: 39-59. DOI: 10.1016/S0212-6567(18)30362-7
5. Rokhforoz P, Jamshidi AA, Sarvestani NN. Adaptive robust control of cancer chemotherapy with extended Kalman filter observer. *Informatics in Medicine Unlocked*. 2017; 8: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2017.03.002>
6. Ministério da Saúde. Estimativa 2019: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
7. Miller KD, Siegel, RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016; 66 (4)271-289. <https://doi.org/10.3322/caac.21349>
8. Zilla MK, Nayak D, Amin H, Nalli Y, Rah B, Chakraborty S, Ali A. 4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside isolated from *Podophyllum hexandrum* exhibits potential anticancer activities by altering Chk-2 signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Chemico-biological interactions*. 2014; 224:100-107. doi: 10.1016/j.cbi.2014.09.022.
9. Giordani C, Santin R, Cleff MB. Survey of plant extracts with anti-Candida activity in the 2005-2013 period. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2015;17 (1): 175-185. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_072
10. Santos-Lima TM, Santos DR, Souza RM, Bastos NG, Santos MAVD, Nunes ES, Lima AGD. Plantas medicinais com ação antiparasitária: conhecimento tradicional na etnia Kantaruré, aldeia Baixa das Pedras, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas*. 2016;18 (1, supl. I): p.240-247. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_063
11. Conceição LO, Aoyama EM. Leaf anatomy and histochemistry of species known as stonebreaker (*Euphorbia prostrata* Aiton, *Euphorbia hyssopifolia* L., *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn, and *Phyllanthus tenellus* Roxb.). *Revista*

- Brasileira de Plantas Mediciniais. 2016;18 (2) 571-581.
http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_226
12. França ISX, De Souza JA, Baptista RS, De Sousa Britto VR. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista brasileira de enfermagem*. 2008; 61(2): 201-208.
 13. Newman DJ, Cragg GM, Snader, KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. *Journal of natural products*. 2003; 66(7): 1022-1037.
 14. Owen C, Patron NJ, Huang A, Osbourn A. Harnessing plant metabolic diversity. *Current opinion in chemical biology*. 2017; 40 : 24-30.
[10.1016/j.cbpa.2017.04.015](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.04.015)
 15. Ahmad R, Ahmad N, Naqvi AA, Shehzad A, Al-Ghamdi MS. Role of traditional Islamic and Arabic plants in cancer therapy. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2017;7(2)195-204.
 16. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. (Eds.). (2011). DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology (Vol. 2). Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 384p.
 17. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., ... & Hunt, T. (2010). *Biologia molecular da célula*. Artmed Editora; 2010. 1464p.
 18. Kierszenbaum, A. L., Kierszenbaum, A., & Tres, L. (2016). *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Elsevier Brasil; 2016. 752p.
 19. Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopez MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. *Revista Quim. Nova* 2005; 28: 118. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>
 20. Hall, JE. *Guyton & Hall Fundamentos de Fisiologia*. Elsevier Brasil. 2017.568p.
 21. Silva CTD, Jasiulionis MG. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. *Ciência e Cultura*. 2014; 66(1):38-42.
 22. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Bitto A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. doi: 10.1155/2017/8416763

23. Carocho M, Morales P, Ferreira IC. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in food science & technology*. 2018; 71: 107-120.
24. Zhong G, Qin S, Townsend D, Schulte, BA, Tew KD, Wang GY. (2019). Oxidative stress induces senescence in breast cancer stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019; 514(4): 1204-1209.
25. Dhillon A S, Hagan S, Rath O, Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007; 26(22): 3279.
26. Takashima A, Faller, DV. Targeting the RAS oncogene. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2013; 17(5): 507-531.
27. Ramirez-Mares M, Chandra S, Gonzalez de Mejia E. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research*. 2004; 554: 53-65
28. Hail JRN, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in diferente keys. *Apoptosis*. 2006; 11:889–904.
29. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson V.L. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012; 19:107–120.
30. Rao YK, Fang SH, TZENG YM. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004; 12(10):2679-2686.
31. Jendiroba DB, Klostergaard J, Keyhani A, Paliaro L, Freireich EJ. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapy-resistant leukemia cell lines by N-N-dimethylsphingosine. *Leukemia Research*. 2002; 26: 301-310.
32. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 2011.128 p. : il.
33. Mukherjee, S. O imperador de todos os males: uma biografia do câncer, São Paulo, Companhia das Letras, 2012. 634 p.p. 978-85-359-2006-2,
34. Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. Fundamentos de toxicologia. 3. ed. São Paulo (SP): Atheneu, 2008. 704p.
35. Ferguson LR. Meat and cancer. *Meat Science*. 2010; 84(2): 308-313

36. Javanmardi F, Rahmani J, Ghiasi F, Hashemi Gahrue H, Mousavi Khaneghah A. (2019). The Association between the Preservative Agents in Foods and the Risk of Breast Cancer. *Nutrition and cancer*, 1-12.
37. Bynum W. História da medicina. Porto Alegre: LP&M. 2011. 192p.
38. Barros KA. Estudo químico-quântico do potencial carcinogênico de agrotóxicos (Mestre), Universidade Federal de Pernambuco. 2010.
39. Cheng C, Zhao X, Zhang M, Bai F. Absence of Rtt109p, a fungal-specific histone acetyltransferase, results in improved acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*. 2016;16(2): fow 10. <https://academic.oup.com/femsyr/article/16/2/fow010/2570166>
40. Vieira VS, Cruz VDS P, Peixoto NP, Faquin SRCPF, ARAÚJO EG. Câncer de pulmão de não pequenas células. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia*. 2017; (14): 1512-1532. DOI: 10.18677/EnciBio_2017A126
41. Chang MT, Bhattarai TS, Schram AM, Bielski CM, Donoghue MT, Jonsson P, Gorelick A. Accelerating discovery of functional mutant alleles in cancer. *Cancer Discovery*. 2018; 8(2): 174-183. <https://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/8/2/174.abstract>
42. Siddiqui MM, Rais-Bahrami S, Turkbey B, George AK, Rothwax J, Shakir, N, Merino MJ. Comparison of MR/ultrasound fusion–guided biopsy with ultrasound-guided biopsy for the diagnosis of prostate cancer. *European urology*. 2015; 313(4): 390-397. <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2091987>
43. Landis-Piwowar KR, Iyer N R. Cancer chemoprevention: current state of the art. *Cancer growth and metastasis*. 2014; 7: CGM-S11288. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.4137/CGM.S11288>
44. Naoum PC, Naoum FA. *Biologia médica do câncer humano [Livro eletrônico]- São José do Rio Preto, SP: Vitrine Literária Editora, 2016,4 Mb; PDF.*
45. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. (Eds.). (2011). *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology (Vol. 2)*. Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 384p.
46. De Palma M, Biziato D, Petrova, TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2017; 17(8): 457. <https://www.nature.com/articles/nrc.2017.51>
47. Rak J, Finkenzeller G, Grugel S, Marmé D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Reviews*. 1995; 14: 263-277. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00690598>
48. LI Y, Atkinson K, Zhang T. Combination of chemotherapy and cancer stem cell targeting agents: Preclinical and clinical studies. *Cancer Letters*. 2017; 396: 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.008>

49. Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*. 2006; 3 (8): 448. DOI:[10.1038/nrponc0558](https://doi.org/10.1038/nrponc0558)
50. Le QV, Yang G, Wu Y, Jang HW, Shokouhimehr M, Oh YK. Nanomaterials for modulating innate immune cells in cancer immunotherapy. *Asian Journal of pharmaceutical Sciences*. 2018; 14 (1) 16-29. <https://doi.org/10.1016/j.aips.2018.07.003>
51. Casanova LM, Costa SS. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. *Revista Virtual de Química*. 2017; 9 (2) http://rvq.s bq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=745
52. Sacoman JL, Monteiro KM, Possenti A, Figueira GM, Foglio MA, Carvalho JE. Cytotoxicity and antitumoral active of dichloromethane extract and its reactions from *Pothomorphe umbellata*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 41: 411-415.
53. Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. In *Seminars in cancer biology* Academic Press. 2006; 16 (4) 318-330.
54. Simões CMO, Schenkel EP, De Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora. 2016. 502p.
55. Pimenta VDSC, Braga KMDS, Machado PA, Prado YCLD, Araújo EGD. Osteossarcoma canino e humano: uma visão comparada. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia*. 2013; 9 (17) 1971- 1991. <http://www.conhecer.org.br>
56. Cruz VS, Rodrigues FA, Braga K, Machado PA, Bianchi Filho C, Prado Y C, Araújo EG. β Lapachone blocks the cell cycle and induces apoptosis in canine osteosarcoma cells. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2018; 38(12) 2224-2232.
57. Ong SM, Saeki K, Kok MK, Nakagawa T, Nishimura R. YM155 enhances the cytotoxic activity of etoposide against canine osteosarcoma cells. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2019: 19-0029. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/advpub/0/advpub_19-0029/article/-char/ja/
58. Gardner HL, Fenger JM, London CA. Dogs as a model for cancer. *Annual review of animal biosciences*. 2016;4:199-222.
59. Simpson S, Dunning MD, De Brot S, Grau-Roma L, Mongan NP, Rutland CS. (2017). Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Veterinaria Scandinavica*.

- 2017; 59 (1) 71. <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-017-0341-9>
60. Isani G, Bertocchi M, Andreani G, Farruggia G, Cappadone C, Salaroli R, Bernardini C. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. and Pure Artemisinin on the D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019; 1-9. <https://doi.org/10.1155/2019/1615758>
61. Getty Sisson S, Grossman JD, Getty R. *Anatomia dos Animais Domésticos*. vol. 1. Rio de Janeiro. 5ª Edição Editora Guanabara. 1986. 2048p.
62. Gomide PRS, Brandão CVS, Babicsack VR, Minto BW. Intrathoracic Axial Osteosarcoma. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2018; 4: 6.
63. Santamaria AC, Simcock JO, Kuntz CA. Adverse events and outcomes in dogs with appendicular osteosarcoma treated with limb amputation and a single subcutaneous infusion of carboplatin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2019; 255(3), 345-351.
64. Dixon A, Chen-Allen A, Rossmeisl Jr JH, Sturges B, Vernau K, Levine JM, Thomovsky S. Surgical decompression, with or without adjunctive therapy, for palliative treatment of primary vertebral osteosarcoma in dogs. *Veterinary and comparative oncology*. 2019; 1-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31099165>
65. Cavalcanti JN, Amstalden EMI, Guerra JL, Magna LC. (2004). Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2004; 41(5) 299-305.
66. Gabriel GH, Nepomuceno LL, Pimenta VDS, Araújo EG. Agentes antineoplásicos para o tratamento do osteossarcoma. *Cent Cient Conhecer-Goiânia*. 2017; 14(26) 152-66.
67. Andrade SAF. Osteossarcoma canino. *UNILUS Ensino e Pesquisa*. 2013; 6 (10) 5-12.
68. Dobson JM. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Veterinary Science*, v.2013, article ID941275, 23p.
69. Mendonça FD, Dória R, Freitas S, Pires M, Camargo L, Evêncio Neto J. Osteossarcoma Vertebral em Cão—relato de caso. *Clinica Veterinária*. 2008; 76: 48-52.
70. Ryu, S., Park, S., Lim, W., & Song, G. (2019). Quercetin augments apoptosis of canine osteosarcoma cells by disrupting mitochondria membrane potential and regulating PKB and MAPK signal transduction. *J. cell biochem*. 2019 ;120(10):17449-17458. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31131468>

71. Selvarajah GT, Kirpensteijn J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *The Veterinary Journal*. 2010; 185(1), 28-35.
72. Daleck CR, De Nardi AB. *Oncologia em cães e gatos*. Grupo Gen-Editora Roca Ltda. 2016. 766p.
73. Morris J. *Oncologia em pequenos animais*. Editora Roca. 2007. 312p.
74. Goldschmidt MH, Thrall DE (1985). Malignant bone tumors in the dog. NEWTON CD; NUNAMAKER, DM *Textbook of Small Animal Orthopaedics*. Ithaca: International Veterinary Information Service.
75. Dernell WS. Tumours of the skeletal system. In *BSAVA manual of canine and feline oncology*. 2011:159-177.
76. Thompson KG, Pool RR. Tumors of bones. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in domestic animals*. 4th edn. EUA: IowaState Press. 2002:245-317.
77. Farcas N, Arzi B, Verstraete FJM. (2012). Oral and maxillofacial osteosarcoma in dogs: a review. *Veterinary and comparative oncology*. 2012; 12(3) 169-180.
78. Vanel M, Blond L, Vanel D. Imaging of primary bone tumors in veterinary medicine: Which differences?. *European journal of radiology*. 2013; 82(12) 2129-2139.
79. Lima RT, Gomes MS, Negreiros VM, Nascimento LFM. Osteossarcoma canino: Relato de caso. *PUBVET*. 2017; 11: 1188-1297.
80. Leibman NF, Kuntz CA, Steyn PF, Fettman MJ, Powers BE, Withrow SJ, Dernell WS. Accuracy of radiography, nuclear scintigraphy, and histopathology for determining the proximal extent of distal radius osteosarcoma in dogs. *Veterinary Surgery*. 2001; 30(3) 240-245.
81. Oblak ML, Boston SE, Woods JP, Nykamp S. (2015). Comparison of concurrent imaging modalities for staging of dogs with appendicular primary bone tumours. *Veterinary and comparative oncology*. 2015; 13(1), 28-39.
82. Mattoon JS, Bryan JN. The future of imaging in veterinary oncology: learning from human medicine. *The Veterinary Journal*. 2013; 197(3), 541-552.
83. Loukopoulos P, Robinson WF. Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. *Journal of comparative Pathology*. 2007; 136(1), 65-73.
84. Cassali GD, Lavallo GE, Ferreira E, Estrela-Lima A, De Nardi AB, Ghever C, Beserra HE. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine

- mammary tumors-2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2014; 7(2) 38-69.
85. Schultz M. Paleohistopathology of bone: a new approach to the study of ancient diseases. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*. 2001; 116(S33), 106-147.
86. Timercan A, Brailovski V, Petit Y, Lussier B, Séguin B. (2019). Personalized 3D-printed endoprostheses for limb sparing in dogs: Modeling and in vitro testing. *Medical engineering & physics*. 2019; 71: 17-29. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1350453319301328>
87. Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora. 2017. 888p.
88. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas Mediciniais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova*. 2007; 30(2): 374-381.
89. Bessa, N. G. F., Borges, J. C. M., Beserra, F. P., Carvalho, R. H. A., Pereira, M. A. B., Fagundes, R., ... & Alves, A. (2013). Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde-Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(4), 692-707.
90. Landrum LR, Kawasaki ML. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*. 1997; 49(4) 508-536.
91. Vallilo MI, Bustillos OV, AguiarOTD. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg-Myrtaceae. *Rev Inst Flor*. 2006: 18: 15-22.
92. Barroso GF. BMLP- Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura. Programa de Monitoramento Ambiental. Protocolo para Análise de clorofila *a* e feopigmentos pelo método fluorímetro TD- 700. Vitória, Espírito Santo, 1998. p.1-21.
93. Cravo AB. **Frutas e ervas que curam**: panaceia vegetal. 4 ed. São Paulo: Hemus, 1994. 438p.
94. Alice CB. (1995). Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico (Vol. 7). Editora da ULBRA. 1995. 208p.
95. Ramos DD, Cardoso CAL. (2007). Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Biociências*. 2007; 5(S2), 774-776.

96. Coutinho ID, Coelho RG, Kataoka VMF, Honda NK, Silva JRM, Vilegas W, Cardoso CAL. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. *Ecletica química*. 2008; 33(4), 53-60.
97. Kuster VC, Vale FHA. Leaf histochemistry analysis of four medicinal species from Cerrado. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016; 26: 673–678.
98. Cardoso CAL, Salvador MJ, Carvalho JE, Coelho RG. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2013; 72(4):309-15.
99. Pereira MC, Steffens RS, Jablonski A, Hertz PF, Rios AO, Vizzotto M. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. *Journal of Agricultural and Food Chemistr*. 2012 : 60: 3061-3067.
100. Czaikoski K, Mesomo MC, Krüger RL, Queiroga CL, Corazza ML. Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2015; 98: 79-85.
101. Markman BEO, Bacchi EM, Kato ETM. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 94: 55-57.
102. Vinagre AS, Rönnau ADSRO, Pereira SF, Silveira LU, Wiilland EF, Suyenaga ES. (2010). Anti-diabetic effects of (Berg) leaf decoction. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. 2010; 46: 169-177.
103. Viecili PRN, Borges DO, Kirsten K, Malheiros J, Viecili E, Melo RD. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. *Atherosclerosis*. 2014; 234: 85-92.
104. Biavatti, M. W., Farias, C., Curtius, F., Brasil, L. M., Hort, S., Schuster, L., et al. (2004). Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 93: 385-389.
105. Costa Amaral S, Barbieri SF, Ruthes AC, Bark JM, Winnischofer SMB, Silveira JLM. Cytotoxic effect of crude and purified pectins from *Campomanesia xanthocarpa* Berg on human glioblastoma cells. *Carbohydrate Polymers*. 2019: 115140.
106. Adati RT, Ohara MT, Ferro VO. Óleo essencial de *Campomanesia phae* (Myrtaceae): avaliação de atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo. 2000 (36) 56, Res. FM04, Supl1.

107. Malta LG, Ghiraldini FG, Reis R, Vale Oliveira M, Silva L B, Pastore G M. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. *Food Research International*. 2012; 49(1), 604-611.
108. Bonilla A, Duque C, Garzon C, Takaishi Y, Yamaguchi K, Hara N, Fujimoto Y. Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Phytochemistry*. 2005 66 (14) 1736-1740.
109. Pavan FR, Leite CQF, Coelho RG, Coutinho ID, Honda NK, Cardoso CAL, Sato DN. Evaluation of anti-Mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Química Nova*. 2009; 32(5) 1222-1226.
110. Pascoal A, Ehrenfried C, Lopez B, Araujo T, Pascoal V, Gilioli R, Salvador M. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules*. 2014; 19(2), 1843-1855.
111. Lima e Silva, M. C., Bogo, D., Alexandrino, C. A., Perdomo, R. T., Figueiredo, P. D. O., do Prado, P. R., ... & Sarmiento, U. C. (2018). Antiproliferative activity of extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and isolated compound dimethylchalcone against B16-F10 murine melanoma. *Journal of medicinal food*, 21(10), 1024-1034.
112. Lescano CH, Oliveira IP, Zaminelli T, Silva Baldivia D, Silva LR, Napolitano M, Sanjinez-Argandona E J (2016). *Campomanesia adamantium* peel extract in antidiarrheal activity: the ability of inhibition of heat-stable enterotoxin by polyphenols. *PloS one*, 2016; 11(10), e0165208.
113. Souza JC, Piccinelli AC, Aquino, D. F., de Souza, VV, Schmitz WO, Traesel GK, Arena AC. Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. *Nutritional neuroscience*. 2017 20(1), 23-31.
114. Viscardi DZ, Silva Arrigo J., Correia, C. D. A. C., Kassuya, C. A. L., Cardoso, C. A. L., Maldonade, I. R., & Argandoña, E. J. S. (2017). Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. *PloS one*, 12(2), e0157107.
115. Espindola PPDT, Rocha PDS, Carollo CA, Schmitz WO, Pereira ZV, Vieira MDCP, Souza K. (2016). Antioxidant and antihyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg root. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016. title ID 7910340, 8 pages. <https://doi.org/10.1155/2016/7910340>.

116. Coutinho ID, Kataoka VM, Honda NK, Coelho RG, Vieira MC, Cardoso CA. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. Rev. Bras. Farmacogn. 2010; 20(3), 322-327.
117. Ferreira LC, Grabe-Guimarães A, Paula C A, Michel MC, Guimarães R G, Rezende SA, Saúde-Guimarães DA. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. Journal of ethnopharmacology. 2013; 145(1), 100-108.
118. Campos JF, Espindola PP, Torquato HF, Vital WD, Justo GZ, Silva D B, Santos EL. (2017). Leaf and root extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) promote apoptotic death of leukemic cells via activation of intracellular calcium and caspase-3. Frontiers in pharmacology. 2017; 8: 466.
119. Boniface PK, Ferreira SB, Kaiser CR. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. Journal of ethnopharmacology. 2017; 206: 193-223.
120. Esteves E, Batista A, Dessimoni-Pinto NAV, Oliveira LG, Pires ST, Santana RC. (2011). Chemical composition of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour and its effect on growth of rats Composição química da farinha de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) e seus efeitos no crescimento de ratos. Alimentos e Nutrição Araraquara. 2011; 22(2) 173-180.
121. Cipriano J, Martins L, Deus MDSM, Peron AP. (2014). O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do. Caderno de Pesquisa. 2014; 26(2), 41-51.
122. Paes J.B, Morais VM, Lima CR. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a fungos causadores da podridão-mole. Revista Árvore. 2005; 29: 365e371.
123. Agra MDF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJLD, Coelho VPM. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. Journal of ethnopharmacology. 2007; 111(2), 383-395.
124. Souza ACM, Kato L, Silva CC, Cidade AF, Oliveira CMA, Silva MD RR. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. Mycoses. 2010; 53(6), 500-503.
125. Gomes CHM, Souza FR, Fonseca C, Casemiro LA, Furtado NAJC, Ambrosio SR, Cunha WR. Determinação in vitro da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaea courbaril* L. Investigaçao. 2010; 10:2-3.

126. Aguiar JCD, Santiago GM, Lavor PL, Veras HN, Ferreira YS, Lima M A, Alves PB. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. *Natural product communications*. 2010; 5(12), 1934578X1000501231.
127. Sales GWP, Batista AHDM, Rocha LQ, Nogueira NAP. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2015; 35(4).
128. Orsi PR, Seito LN, Di Stasi LC. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2014; 151(1), 380-385.
129. Roy A, McDonald P, Timmermann BN, Gupta M, Chaguturu R. Bioactivity Profiling of Plant Biodiversity of Panama by High Throughput Screening. *Natural Product Communications*. 2019; 14(1), 1934578X1901400119.
130. Silva CP, Soares-Freitas RAM, Sampaio GR, Santos MCB, Nascimento TP, Cameron LC, Arêas JAG. Identification and action of phenolic compounds of Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) on α -amylase and α -glucosidase activities and flour effect on glycemic response and nutritional quality of breads. *Food research international*. 2019; 116, 1076-1083.
131. De Souza AC, Kato L, Silva CC, Cidade AF, Oliveira CM, Silva MR. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*. 2010; 53: 500-503.
132. Garcia CS, Ueda SMY, Mimica LMJ. Evaluation of in vitro antibacterial activity of hydro-ethanol from vegetable extracts against MRSA and MSSA *Staphylococcus aureus*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 2011 :70: 589-598.
133. Dimech GS, Soares LA, Ferreira MA, Oliveira AG, Carvalho MC, Ximenes EA. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *Sci. World J*. 2013: 862763.
134. Da Costa MP, Bozinis MC, Andrade WM, Costa CR, Silva AL, Alves Oliveira CM, Kato L, Fernandes OF, Souza LK, Silva MR. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. *BMC Complement. Altern. Med*. 2014 : 14: 245.
135. Takagi K, Itoh S, Nasu S, Yamada S, Nomura S, Shimomura K, Ohnishi, K. Anti-inflammatory effect and pigmentation inhibitory effect of the pericarp of Jatoba (*Hymenaea courbaril* L.). *J. Nat. Med*. 2002: 56: 108-112.

136. Ribeiro TG, Chávez-Fumagalli MA, Valadares DG, Franca JR, Lage PS, Duarte MC, Andrade PH, Martins VT, Costa LE, Arruda AL, Faraco AA, Coelho EA, Castilho R.O. 2014. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Exp. Parasitol.* 2014; 143: 60-68.
137. Silva MEGC, Oliveira ACB, Sá PGS. Guimarães, A.L., de Oliveira, A.P., Nunes X.P., Almeida, J.R.G. da S., 2011. Atividade antinociceptiva das fases obtidas por partição do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* (Fabaceae). Jornada de Iniciação Científica da UNIVASF. Anais da VI JIC/UNIVASF. pp. 2.
138. Imai T, Inoue S, Ohdaira N, Matsushita Y, Suzuki R, Sakurai MH.J, Ozaki SK, Finger Z, Fukushima K. 2008. Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecontei* and their antioxidant activities. *J. Wood Sci.* 2008; 54: 470-475.
139. Silva CMEG, Guimarães AL, Oliveira AP, Souza Araújo C, Siqueira Filho JA, Fontana AP, Silva Almeida, JRG. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 2012; 4(2), 1160-1166.
140. Maranhão CA, Pinheiro IO, Santana ALBD, Oliveira LS, Nascimento MS, Bieber LW 2013. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2013; 79: 9-13.
141. Köhler I, Jenett-Siems K, Siems K, Hernández MA, Ibarra RA, Berendsohn WG, Bienzle U, Eich E. In vitro antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. *Z. Naturforsch C.* 2002; 57: 277-281
142. Vieira DS, Moura J B, Silva FES, Taniwaki F, Cardoso TC. (2018). Atividade antitumoral da folha da *Hymenaea martiana hayne* em células mamárias de cães. *PUBVET.* 2018; 12, 133.
143. Lacerda LP, Malaquias G, Peron AP. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. 2014; 86:1147-1150.
144. Monteiro A.F. Estudo químico e avaliação do potencial efeito biológico das folhas e flores de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae). Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, para obtenção do título de Mestre em Química. Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Brazil, pp. 157.
145. Orsi RP, Bonamin F, Aparecida Severi J, Cássia Santos R, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Stasi LCD. (2012). *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A

- Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *Journal of ethnopharmacology*. 2012 Aug 30;143(1):81-90.
146. Cecílio AB, Faria DB, Oliveira PC, Caldas S, Oliveira DA, Sobral ME, Duarte MG, Moreira CP, Silva CG, Almeida, V.L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *J. Ethnopharmacol*. 2012; 141:975-981.
147. Closa D, Torres M, Hotter G, Bioque G, León OS, Gelpí E, Rósello-Catafau. Prostanoids and free radicals in C14C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 1997; 56: 331-334.
148. Valente PP, Amorim JM, Castilho RO, Leite RC, Ribeiro MF. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res*. 2014; 113: 417-423.
149. Bezerra GP, Góis RW, Brito TS, Lima FJ, Bandeira MA, Romero NR, Magalhães PJ, Santiago G.M, 2013. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. *J. Ethnopharmacol*. 2013; 149: 62-69.
150. Peixoto RDM, Silva W, Almeida, JRGS, Branco A, Costa M. (2016). Antibacterial potential of native plants from the caatinga biome against *Staphylococcus spp.* Isolates from small ruminants with mastitis. *Revista Caatinga*. 2016; 29(3), 758-763.
151. Da Silva VF, Franco I, Damasceno TEF, Silva Almeida, JRG, Costa M. M. Potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de plantas frente a bacilos gram negativos isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas criadas na região de Petrolina-PE. *Semina: Ciências Agrárias*. 2014; 35(2), 883-890.
152. Vieira DS, Peixoto RM, Costa MM, Freire DP, Silva TMG, Silva TMS. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne frente às *Staphylococcus spp.* e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2018; 38(3), 462-469.

CAPÍTULO 2 – BIOATIVIDADE DAS FOLHAS DE GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium*) EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO *IN VITRO*

RESUMO

O câncer acomete tanto cães de raças puras, quanto mestiços, e é um problema comum. O osteossarcoma canino é um tipo de tumor agressivo, tanto localmente como sistemicamente, devido ao desenvolvimento de metástase. A busca por novos medicamentos é importante pois ainda não há um tratamento efetivo que seja seletivo. O objetivo deste estudo foi verificar a bioatividade das folhas de *Campomanesia adamantium* sobre células de Osteossarcoma Canino (OC) de cultura estabelecida e células endoteliais humanas submetidas a estresse oxidativo. As células OC foram cultivadas e submetidas ao tratamento com o extrato, de acordo com diferentes concentrações (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL) e tempos de exposição (24h, 48h e 72h). As células endoteliais foram submetidas ao estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio e tratadas com o extrato nas mesmas concentrações que osteossarcoma por 24 h. Os resultados foram obtidos por meio da análise da viabilidade celular e citotoxicidade pelo método de redução do tetrazólio (MTT). Os efeitos do extrato de folhas de *C. adamantium* sobre células de osteossarcoma canino de cultura estabelecida, apresentou aumento da viabilidade celular com o aumento do tempo de exposição ao extrato, e foi possível demonstrar que o extrato tem pouca ação citotóxica. Aumento da atividade proliferativa foi maior no tempo de exposição 72 horas, tanto nas células de osteossarcoma como nas células endoteliais. Nas células endoteliais não houve nenhuma atividade citotóxica.

Palavras-chave: cultivo celular, D17, tumores ósseos, plantas do cerrado.

CHAPTER 2 – BIOACTIVITY OF GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium*) LEAVES IN CANINE OSTEOSSARCOMA CELLS AND *IN VITRO* HUMAN UMBILICAL CORD VENEUS CELLS

ABSTRACT

Cancer affects both purebred and crossbred dogs, and is a common problem. Canine osteosarcoma is an aggressive type of tumor, both locally and systemically, due to the development of metastasis. The search for new drugs is important because there is still no effective treatment that is selective. The aim of this study was to verify the bioactivity of *Campomanesia adamantium* leaves on Canine Osteosarcoma (OC) cells from established culture and human endothelial cells subjected to oxidative stress. OC cells were cultured and subjected to treatment with the extract, according to different concentrations (1 µg / mL, 10 µg / mL, 100 µg / mL, 1000 µg / mL) and exposure times (24h, 48h and 72h). Endothelial cells were subjected to oxidative stress with hydrogen peroxide and treated with the extract in the same concentrations as osteosarcoma for 24 h. The results were obtained by analyzing cell viability and cytotoxicity using the tetrazolium reduction method (MTT). The effects of the leaf extract of *C. adamantium* on canine osteosarcoma cells of established culture, showed an increase in cell viability with the increase in the time of exposure to the extract, and it was possible to demonstrate that the extract has little cytotoxic action. Increased proliferative activity was greater in the 72 hour exposure time, both in osteosarcoma cells and in endothelial cells. In the endothelial cells there was no cytotoxic activity

Keywords: bone tumors, cell culture, cerrado plants, D 17.

1. INTRODUÇÃO

O estado de Goiás possui um bioma com potencial terapêutico vegetal de grande importância. O Cerrado é a principal vegetação nativa do centro oeste e ocupa cerca de dois milhões de quilômetros quadrados. Representa 23% do território brasileiro, aproximadamente 40% de suas plantas de características endêmicas¹. A área apresenta fragilidade, pois tem sido devastada progressivamente nos últimos anos, principalmente para ser substituída por pastagens artificiais, monocultura de grãos e silviculturas de *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp., em um ritmo que poderá extinguir o bioma até 2030^{2,3}. Essa situação preocupante poderá apresentar como uma das consequências a perda do potencial terapêutico de sua biodiversidade vegetal, muito utilizado pela sabedoria popular e pouco explorado no meio científico³, como é o caso das plantas do gênero *Campomanesia*.

Estudos realizados com extratos bioativos de frutos de *C. pubescens* mostraram seu efeito citotóxico *in vitro* nas células cancerosas humanas U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NC1-ADR/RES (ovário resistente), 786,0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon), K562 (leucemia) e em VERO (linhagem celular não cancerígena, epitelial de rim de macaco verde). O extrato hexânico e os compostos isolados de chalconas 1 e 2 demonstraram efeito antiproliferativo potente contra linhagens de células cancerosas com valores de inibição de crescimento total (TGI) menores do que aqueles observados na linhagem celular controle. A atividade mais elevada das chalconas 1 e 2 foi detectada nas células MCF-7, PC-3 e HT-29⁴.

Diversos tipos de câncer estão geralmente expostos a condições de instabilidade no metabolismo oxidativo, entre outros fatores ambientais⁵. O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio grave entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema oxidante⁶. O osteossarcoma corresponde a 6% das neoplasias e é o tumor ósseo maligno primário mais comum encontrado em cães, representando mais de 80% de incidência^{5,7,8}. No tratamento, a amputação ajuda a amenizar a dor, porém sem a função de prolongar a vida dos cães, pois frequentemente a neoplasia evolui para metástase. Desta forma, é necessário o estabelecimento de um programa agressivo de quimioterapia simples ou combinada, além da utilização da imunoterapia e radioterapia, quando possível⁹.

As drogas mais utilizadas para quimioterapia incluem a carboplatina, cisplatina e doxorubicina, essas drogas associadas aos procedimentos cirúrgicos reduzem a ocorrência de metástases, mas vários são os efeitos tóxicos dos medicamentos utilizados¹⁰. Nesse sentido, diversos centros de excelência em pesquisa têm buscado o desenvolvimento de novos quimioterápicos a partir de plantas^{11,12}.

Os estudos experimentais podem ser realizados em testes *in vitro*, com utilização de linhagens de células neoplásicas, para avaliar extratos e substâncias puras isoladas. Sendo assim, os ensaios biológicos para investigação de possíveis atividades, que são ou não atribuídas a várias espécies vegetais, tornam-se importantes e até mesmo um instrumento essencial para seguimento de estudos visando à busca por substâncias bioativas¹³.

O presente estudo teve por objetivo investigar a ação do extrato etanólico bruto das folhas de *C. adamantium*, em células de osteossarcoma canino (D17) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) submetidas ao estresse oxidativo. Considerando o potencial anticancerígeno do gênero *Campomanesia*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório Multiusuário de Avaliação de Moléculas, Células e Tecidos, na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

2.1. Material botânico e obtenção do extrato

O extrato etanólico bruto das folhas da gabirobeira (EBFG) foi obtido a partir de folhas secas e fragmentadas da *C. adamantium*, através do método de extração por maceração. As folhas foram coletadas no início do mês dezembro, no período de frutificação (vegetativo) da planta, na região de mata, dentro da Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí (UFG) (S 16° 17' 26.6", W 048° 57' 21.1") e identificado pela Prof^a. Dr^a. Luzia Francisca de Souza.

As folhas foram lavadas e secas em estufa a 35°C por sete dias, a fim de eliminar a umidade e estabilizar o conteúdo enzimático. Posteriormente, foram trituradas em moinho elétrico de facas. A extração do extrato ocorreu por meio da maceração do material vegetal em álcool absoluto, na proporção de 2.200mL de

álcool/480g de pó, durante 72 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi filtrado e concentrado em rota-vapor (Modelo Ika-Werk) a uma temperatura constante de 45°C.

2.2. Cultivo celular

As células de Osteossarcoma (D-17, BCRJ 0276, Lote 000573, Passagem 239, Espécie *Canis familiaris*) e as células endoteliais (EA. Hy 926, BCRJ 0345, Lote 001100) originárias da ATCC (American Type Culture Collection -Manassas, VA, USA) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ –Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina (10.000 U.I./ml -10 mg/ml), anfotericina B e L glutamina (todos os reagentes da Cultilab, Campinas, Brasil) e mantidas em incubadora umidificada a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂, de acordo com adaptação de YU et al.¹⁴ e Manea et al.¹⁵

2.3. Delineamento experimental

Os ensaios foram realizados em quintuplicata, com 3 experimentos independentes. Após a etapa de cultivo, as células foram quantificadas na câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços contendo 200µL de meio DMEM, na concentração de 1x10⁴ por poço, respectivamente, para o ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio [MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphnyl-2H-tetrazólio)]. A placa foi mantida em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas.

Em seguida, o meio foi desprezado e os poços tratados ou não com o extrato das folhas da gabirobeira (EBFG), por 24 (G24), 48 (G48) e 72 horas (G72), nas concentrações de 1µL/mL, 10µL/mL, 100µL/mL e 1000µL/mL. O grupo controle (GC) negativo, foi tratado unicamente com dimetilsulfóxido (DMSO, Cultilab, Campinas, Brasil), com a finalidade de verificar se a viabilidade presente nos grupos tratados com os extratos é decorrente unicamente ao efeito desses, uma vez que os extratos são diluídos no DMSO. Os poços foram tratados de forma aleatória (Figura1).

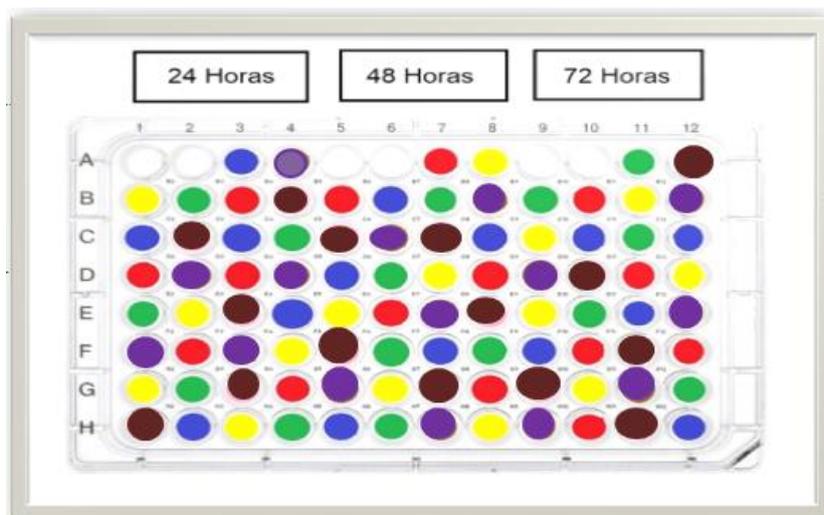


FIGURA 01 - Distribuição aleatório do tratamento de células de Osteossarcoma canino em placa de 96 poços. Em amarelo, controle sem DMSO; em vermelho, controle com DMSO (0,3 $\mu\text{L}/\text{mL}$); em verde, tratamento 1 (0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$); em azul, tratamento 2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); em roxo, tratamento 3 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); em marrom, tratamento 4 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Ao término do período de tratamento, o meio foi descartado e foi adicionado 10 μl de tetrazólio (MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-diphnyl-2H-tetrazólio) em cada poço. As placas foram incubadas por três horas. A fim de parar a reação, acrescentou-se 50 μl de sodium dodecyl sulfato (SDS – Vivantis Biochemical) a 10% diluído em HCl (0,01N) por poço e as placas permaneceram incubadas por 24 horas em temperatura ambiente.

O ensaio de estresse oxidativo, da mesma forma, foi realizado em três experimentos independentes e o tratamento em quintuplicata, as células foram semeadas em placas de 96 poços contendo 200 μL de meio DMEM, na concentração de 1×10^4 por poço. A placa foi mantida em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas. Após as 24 horas o meio foi descartado e 200 μL da solução previamente preparada de Peróxido de hidrogênio a 1%, foi colocada em cada poço. Nessa fase do experimento a luz do fluxo e da sala foram apagadas para evitar a oxidação da solução. Após o tratamento de todos os poços, a placa foi envolvida em papel alumínio e colocada novamente na incubadora. Após 6 horas foi iniciado o protocolo padrão do MTT, onde o meio foi descartado e foi adicionado 10 μl de tetrazólio (MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-diphnyl-2H-tetrazólio) em cada poço. As placas foram incubadas por três horas. A fim de interromper a reação, acrescentou-se 50 μl de sodium dodecyl sulfato (SDS – Vivantis Biochemical) a 10% diluído em

HCl (0,01N) por poço e as placas permaneceram incubadas por 24 horas em temperatura ambiente.

A densidade óptica foi quantificada em espectrofotômetro (Awareness Technology Inc/ Stat Fax 2100, 425nm - 540nm, Palm City, FL, USA). Os resultados obtidos do espectrofotômetro foram transformados em porcentagens para análise, através das equações seguintes:

Análise de variância e teste de Tukey (5% de significância) para comparar médias de viabilidade celular (%).

A citotoxicidade foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ CT} = 100 - [(\text{abs tratamento} / \text{abs controle}) \times 100]$$

na qual, CT é a citotoxicidade; e abs é a absorbância.

A viabilidade celular foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ VC} = (\text{abs tratamento} / \text{abs controle}) \times 100$$

na qual, VC é a viabilidade celular; e abs é a absorbância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do extrato bruto de folhas da *Campomanesia adamantium* em células de osteossarcoma *in vitro* encontra-se tabela 1. Nas dosagens 1µL/mL e 100µL/mL, quanto maior o tempo de exposição, maior foi a viabilidade celular. A dosagem de 10µL/mL apresentou um aumento no G48 e teve uma leve queda em G72. A maior dosagem, 1000µL/mL, teve menor viabilidade em G48 e um aumento progressivo em G72 e, foi também, a dosagem que apresentou o maior efeito citotóxico deste estudo, que ocorreu em G48. Na tabela 1 ainda é possível observar a percentagem média relativa dos tratamentos em relação ao controle negativo, pelo teste Tukey não houve diferença significativa na viabilidade celular.

TABELA 1 - Viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) de cada grupo, por concentração, tempo de exposição e dosagem de EBF, pelo método de redução do tetrazólio (MTT). Os resultados expressos em percentagem média. Letras iguais expressam resultados significativamente iguais (Teste Tukey).

Tempo de exposição	Parâmetro	C	1µL/mL	10µL/mL	100µL/mL	1000 µL/MI
24 HORAS	VC	100%	98,36%	105,44%	92,22%	97,96%
	CT	-	1,68%	-	7,78%	2,04%
	Tukey	a	a	a	a	a
48 HORAS	VC	100%	110,07%	111,53%	95,72%	77,25%
	CT	-	-	-	4,28%	22,74%
	Tukey	a	a	a	a	a
72 HORAS	VC	100%	132,8%	102,96%	113,54%	110,64%
	CT	-	-	-	-	-
	Tukey	a	a	a	a	a

No estudo realizado por Silva¹⁶, em osteossarcoma humano (MG-63), com o mesmo extrato utilizado nesta pesquisa, também não foi observada ação citotóxica dose e tempo dependente. Em relação a citotoxicidade os trabalhos corroboraram, o G48 com a maior dosagem foi o que apresentou maior ação citotóxica e a dosagem no G72 não teve ação citotóxica em nenhuma das dosagens e houve um progressivo aumento da viabilidade celular, demonstrando que a ação citotóxica diminui com o aumento do tempo de exposição.

O IC₅₀, que é a dosagem de extrato necessária para inibir 50% da viabilidade celular em relação ao grupo controle, neste trabalho não foi encontrado, pois houve um aumento da viabilidade celular mesmo nas menores dosagens especialmente em relação ao tempo de exposição G72. Segundo Reynertson et al.¹⁷, um valor de IC₅₀ menor de 50 µL/mL é considerado muito ativo, 50–100 µL/mL 1 moderadamente ativo, 100–200 µL/mL ligeiramente ativo e acima de 200 µL/mL estão inativos. Em estudo com óleos essenciais de *C. Adamantium*, Alves et al.¹⁸ encontraram IC₅₀ de moderadamente ativo a inativo em linhagens de células tumorais humanas: adenocarcinoma de mama (77.2µL/mL MCF-7), adenocarcinoma cervical (80.5µL/mL HeLa) e glioblastoma (79.9µL/mL M059J), além de, uma linhagem celular humana normal de fibroblastos pulmonares (369.8µL/mL GM07492A).

Enquanto isso, Pascoal et al.¹⁹, em pesquisa com o extrato bruto de *C. adamantium*, apresentaram resultados promissores frente a algumas linhagens celulares tumorais, como ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES) (IC₅₀ 3,28 µg/mL), ovário (IC₅₀ OVCAR-03) (IC₅₀ 11,25 µg/mL), glioma (U251) (IC₅₀ 22,32 µg/mL), mama (MCF-7) (IC₅₀ 28,90 µg/mL), rim (786-O) (IC₅₀ 30,26

µg/mL), todos com ação muito ativa. Campos et al.²⁰ em estudo utilizando o extrato aquoso das folhas e raízes da mesma espécie em leucemia, constatou, respectivamente, IC₅₀ de 40µg/mL e 80µg/mL em células Jurkat (linfócitos T neoplásicos).

Ramos et al.²¹ estudaram uma fração hexânica do extrato bruto de folhas de *C. adamantium*, frente ao potencial citotóxico do extrato em *Artemia sp.*, e constataram que o mesmo não demonstrou ação nas condições estudadas. O extrato aquoso das folhas da *C. adamantium*, não apresentou efeito significativo nas células mononucleares do sangue periférico. Pascoal et al.²², em estudo sobre o potencial citotóxico das folhas e frutos de *C. adamantium*, com o isolamento da chalcona cardomina, notaram a inibição da proliferação celular de câncer de próstata e diminuição da expressão de gene NFκB1, proteína chave no processo inflamatório). O potencial de inibição deste gene pode apresentar significativa contribuição na busca de novos fármacos para o tratamento do câncer e inflamação¹⁹.

Uma consideração relevante ao extrato da *C. adamantium* é a relação entre o material botânico utilizado e o seu potencial citotóxico. Um estudo realizado por Oliveira et al.²³ avaliou a quantidade e quais óleos essenciais as folhas de *C. adamantium* possuem. Perceberam apenas dois óleos essenciais, sesquiterpeno e espatulenol, que apresentaram moderada ação citotóxica frente a linhagem celular tumoral humana de carcinoma epidermóide de boca (KB)^{24,25,26}. No entanto, os óleos supracitados foram encontrados em baixa quantidade, atestando mais uma vez baixa capacidade citotóxica da espécie pesquisada. Outros estudos químicos com as folhas, frutos e flores foram realizados e demonstraram baixo rendimento de óleos essenciais nessa espécie^{27,28,28}.

Coutinho et al.²⁹ realizaram pesquisa que buscou quantificar os óleos essenciais obtidos de folhas de *C. adamantium* em três diferentes épocas do ano (floração, frutificação e período vegetativo). Eles associaram com a avaliação das atividades antioxidantes, bem como com a variabilidade da composição química de quatro amostras coletadas em diferentes regiões geográficas. Desta forma, demonstraram que a quantidade de óleos essenciais varia de acordo com a localidade de coleta e com os estágios que a planta passa incluindo a frutificação, que é o período que foram coletadas as folhas para essa pesquisa^{30,31}.

Diante do exposto, uma possível explicação para o fato observado em nosso estudo, com relação a baixa eficiência do extrato utilizado, pode estar relacionado ao

período em que ocorreu a coleta das folhas, durante a frutificação. Destaca-se que este período foi descrito como o de menor quantidade de óleos essenciais, como sesquiterpeno, e o monoterpenos β -pineno α -pineno, D-limoneno, que são descritos como atuante em atividades citotóxicas e antitumoral^{27,30}.

Ademais, as flavonas e chalconas são metabólitos também importantes nos estudos citotóxicos. Coutinho et al.³², citam que teor de flavanóides nas folhas sofre influência de acordo com a variação sazonal, isso também pode explicar a diferença de ação do extrato e da quantidade de substância em diferentes estudos. Nas suas pesquisas com *Campomanesia adamantium*, Kurter & Vale³³, não detectaram a presença de flavanóides no extrato das folhas. Enquanto Pascoal et al.²² encontraram a chalcona cardamonina como metabólito predominante em extratos das folhas (coletadas em época de floração, período com maior presença de metabólitos nos óleos essenciais) os maiores valores antiproliferativos atividade associada às folhas foi correlacionada com as maiores concentração de chalconas.

Ainda pode ser citado a relação com a secagem das folhas, estudos recentes demonstram que há uma diferença de quantidade de metabólitos que se consegue manter de acordo com o método de secagem das folhas. De acordo com Oliveira et al.²³ as folhas perdem parte dos seus óleos essenciais inclusive sesquiterpeno e monoterpenos durante a secagem mecânica, em relação ao que é encontrado nas folhas frescas e na secagem natural a sombra, principalmente em relação ao D- limonemo que é descrito como altamente citotóxico. Sendo assim a avaliação dos metabólitos flavonas e chalconas são importantes para estudos citotóxicos.

Uma provável explicação para o aumento da viabilidade celular, observado nesse estudo, seria uma possibilidade de proteção celular exercida por meio da atividade antioxidante. Essa propriedade já foi observada em outras condições experimentais^{21,22}.

Para averiguar essa hipótese, células endoteliais humanas foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para simular as lesões e os mecanismos do estresse oxidativo. Essas células foram utilizadas por ter comportamento mitótico intenso assim com a neoplásica, para que fosse observado se ação do extrato seria somente de proteção a célula neoplásica.

No ensaio de submissão ao estresse oxidativo, induzido por peróxido de hidrogênio, em células endoteliais de veia umbilical humana, notou-se um aumento da viabilidade dose dependente 100 μ L/mL e 1000 μ L/mL. O EBFM protegeu as células

dos danos oxidativos (tabela 2). Esses dados sugerem que a extrato pode proteger as células da ação das EROS. Estudos in vitro com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células endoteliais demonstraram que ele pode induzir ao estresse oxidativo diminuindo a viabilidade da célula causando parada do ciclo celular, inibição da proliferação celular, e indução de apoptose^{34,35,36,37}. Na análise estatística o teste Tukey demonstra uma diferença estatística a partir da dosagem 10µL/mL.

TABELA 2 – Estresse Oxidativo. Viabilidade Celular (VC) e citotoxicidade (CT) de cada grupo por concentração, tempo de exposição e dosagem de EBF. Ensaio de viabilidade pelo método MTT em células de osteossarcoma submetidas ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. Os resultados expressos em percentagem média. Letras iguais expressam resultados significativamente iguais (Teste Tukey).

Tempo de exposição	Parâmetro	C	1µL/mL	10µL/mL	100µL/mL	1000µL/mL
24 HORAS	VC	100%	100%	100%	125%	250%
	CT	-	-	-	-	-
	Tukey	b	b	a	a	a

Este estudo com H₂O₂, vem confirmar a atividade antioxidante da espécie, outrora descrita por outros autores. Nas folhas^{21,22,29,32}, em extratos etanólicos a 70% da polpa e da casca/semente da *C. adamantium* houve efeito protetor na viabilidade de células hepáticas HepG2 induzidas por CCl₄, as raízes exibiram atividade antioxidante³⁹.

O extrato pesquisado, além de não apresentar efeito citotóxico significativo, ainda aumentou a viabilidade celular de forma dose dependente. Os dados sugerem uma dupla interpretação, já que o aumento da viabilidade em células neoplásicas poderia estar relacionado com a possibilidade de indução de mitose, o que seria indesejável. No entanto, o aumento da viabilidade em células endoteliais, submetidas ao estresse oxidativo, pode estar relacionado com um efeito protetor, possivelmente ligado a uma ação antioxidante, o que seria hipoteticamente promissor. Frente ao exposto, percebeu-se que existe um vasto campo de descobertas sobre a *Campomanesia adamantium*, como a avaliação dos genes envolvidos na progressão do ciclo celular, bem como das proteínas relacionadas com a formação dos pontos de

checagem no processo da divisão celular. O que pode sugerir a possibilidade de projetos futuros.

4. CONCLUSÃO

O extrato de folhas de *C. adamantium* aumenta a viabilidade e não apresenta ação citotóxica nas células de osteossarcoma canino e nas células endoteliais sob estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

1. Ramirez-Mares M, Chandra S, Gonzalez de Mejia E. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research*. 2004; 554: 53-65.
2. Machado RB, MB RN, Pereira E, Caldas D, Gonçalves N, Santos K, Tabor & M. Steininger. 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Conservation International do Brasil, Brasília.
3. Brannstrom C, Jepson W, Filippi AM, Redo D, Xu Z, Ganesh S. Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado), 1986-2002: Comparative analysis and implications for land-use policy. *Land Use Policy*, v. 25, p. 579-595, 2008.
4. Cardoso CAL, Salvador MJ, Carvalho JE, Coelho RG. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2013; 72(4):309-15.
5. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007; 26(22): 3279.
6. Carocho M, Morales P, Ferreira IC. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in food science & technology*. 2018; 71: 107-120.
7. INCA, Instituto Nacional de Câncer (2018). Estimativas 2018: Incidências do câncer no Brasil. [acesso 10 setembro 2018]. Disponível em: <http://www,inca.gov.br/estimativa/2018/>
8. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ellison DW. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*. 131(6), 803-820.
9. Sethi P, Treece J, Pai V, Onweni C, Rahman Z, Singh, S. The Mystery of Multiple Masses: A Case of Anaplastic Astrocytoma. *Cureus*, 2017: 9(6), e1384. doi:10.7759/cureus.
10. Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek, G, Kaspera W. Diagnostic and therapeutic biomarkers in glioblastoma: Current status and future perspectives. *BioMed research international*. v. 2017, ID 8013575, 13.

11. See SJ, Gilbert MR: Anaplastic astrocytoma: diagnosis, prognosis, and management *SeminOncol.* 2004, 31:618-34. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2004.07.004>Get rights and content
12. Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA, Perry A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Archiv*, 2017;471(2), 257-269.
13. Cardoso CAL, Salvador MJ, Carvalho JE, Coelho RG. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2013; 72(4):309-15.
14. Yu HY, Kim SOK, Jin CY, Kim GY, Kim WJ, Yoo YH, Choi YH. β -lapachone-induced apoptosis of human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K/Akt pathway. *Biomol Ther.* 2014;22(3):184-92.
15. Manea SA, Fenyo IM, Manea A. c-Src tyrosine kinase mediates high glucose-induced endothelin-1 expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2016;123–130.
16. Silva NC. Citotoxicidade de extratos das folhas de gabirobeira (*Campomanesia adamantium*) em células de osteossarcoma in vitro. 2018. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.
17. Reynertson KA, Basile MJ, Kennelly EJ. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. *Ethnobotany Research and Applications.* 2005; 3, 025-036.
18. Alves CCF, Oliveira JD, Estevam EBB, Xavier MN, Nicolella HD, Furtado RA, Miranda MLD. Antiproliferative activity of essential oils from three plants of the Brazilian Cerrado: *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), *Protium ovatum* (Burseraceae) and *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae). *Brazilian Journal of Biology*, (ahead). *Braz. J. Biol.* 2019, Ahead of Print. 1-5.
19. Pascoal ACRF. *Campomanesia adamantium e Campomanesia guaviroba: fitoquímica e estudo in vitro e in vivo visando a determinação da atividade biológica e toxicidade.* 2015. 197 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/317578>>. Acesso em: 27 ago. 2018.
20. Campos JF, Espindola PP, Torquato HF, Vital WD, Justo GZ, Silva DB, Santos E L. Leaf and root extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) promote apoptotic death of leukemic cells via activation of intracellular calcium and caspase-3. *Frontiers in pharmacology.* 2017; 8, 466.

21. Ramos DD, Cardoso CAL. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Biociências*. 2007;5(S2),774-776.
22. Pascoal A, Ehrenfried C, Lopez B, Araujo T, Pascoal V, Gilioli R, Salvador M. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules*. 2014; 19(2), 1843-1855.
23. Oliveira JD, Alves CCF, Miranda MLD, Martins CHG, Silva TS, Ambrosio MAL. V, Silva JP. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. *Rev Bras Pl Med*. 2016; 18, 502-510.
24. Chinou IB, Roussis V, Perdetzoglou D, Loukis A. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. *Planta medica*. 1996;62(04), 377-379.
25. Santos RF, Isobe MTC, Lalla JG, Haber LL, Marques MOM, Ming LC. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2012; 224-234.
26. Limberger RP, Sobral MEG, Henriques AT, Menut C, Bessière JM. (2004). Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química nova*. São Paulo. Vol. 27, n. 6, 2004; p. 916-919.
27. Vallilo MI, Bustillos OV, Aguiar OTD (2006a). Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg-Myrtaceae. *Rev Inst Flor*. 2006;18, 15-22.
28. Vallilo MI, Lamardo LCA, Gaberlotti ML, Oliveira ED, Moreno PRH. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. *Ciência e tecnologia de alimentos*. 2006; 26(4), 725-955.
29. Coutinho ID, Coelho RG, Kataoka VMF, Honda NK, Silva JRM, Vilegas W, Cardoso CAL. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. *Ecletica química*. 2008; 33(4), 53-60.
30. Coutinho, I. D., Cardoso, C. A. L., Ré-Poppi, N., Melo, A. M., Vieira, M. D. C., Honda, N. K., & Coelho, R. G. (2009). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential

- oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 45(4), 767-776.
31. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química nova. 2007; 30(2), 374.
 32. Coutinho ID, Kataoka VM, Honda NK, Coelho RG, Vieira MC, Cardoso CA. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. Rev. Bras. Farmacogn. 2010; 20(3), 322-327.
 33. Kuster VC, Vale FHA. Leaf histochemistry analysis of four medicinal species from Cerrado. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2016; (26),673–678.
 34. Seto S, Chang D, Ko W, Zhou X, Kiat H, Bensoussan A, Liu J. Sailuotong prevents hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced injury in EA. hy926 cells. International journal of molecular sciences. 2017; 18(1), 95.
 35. Asahina T, Kashiwagi A, Nishio Y, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y, Takagi Y, Saeki Y, Kikkawa R, Shigeta Y. Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cells exposed to H₂O₂ in high-glucose medium. Diabetes. 1995;44:520–526. doi: 10.2337/diab.44.5.520.
 36. Belkhir A, Richards C, Whaley M, McQueen SA, Orr FW. Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ exposure. Lab. Investig. 1997;77:533–539.
 37. Jia LQ, Yang GL, Ren L, Chen WN, Feng JY, Cao Y, Zhang L, Li XT, Lei P. Tanshinone IIA reduces apoptosis induced by hydrogen peroxide in the human endothelium-derived EA.hy926 cells. J. Ethnopharmacol. 2012;143:100–108. doi: 10.1016/j.jep.2012.06.007.
 38. Fernandes OT, Ávila RI, Moura SS, Almeida Ribeiro G, Naves MMV, Valadares MC. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. Toxicology reports. 2015; 2, 184-193.
 39. Espindola PPDT, Rocha PDS, Carollo CA, Schmitz WO, Pereira ZV, Vieira MDCP, Souza K. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg root. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016. ticle ID 7910340, 8 pages. <https://doi.org/10.1155/2016/7910340>.

CAPÍTULO 3 – EXTRATO DAS FOLHAS JATOBÁ (*Hymenaea martiana* Hayne) AUMENTA A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO *IN VITRO*

RESUMO

As plantas do gênero *Hymenaea* são conhecidas pela grande quantidade de compostos fenólicos e flavanoides. Compostos bioativos são substâncias que possuem capacidade de trazer efeitos benéficos a saúde, auxiliando o sistema metabólico e reduzir o estresse oxidativo e a incidência de doenças como por exemplo o câncer. O osteossarcoma canino é um tumor agressivo, quase sempre evoluindo para metástase e tem sobrevida do paciente muito curta. O presente estudo teve por objetivo investigar a ação do extrato etanólico bruto das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne, em células de osteossarcoma canino (D17) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) submetidas ao estresse oxidativo. Os resultados foram obtidos por meio da análise da viabilidade celular e citotoxicidade pelo método de redução do tetrazólio (MTT). O efeito do extrato bruto de folhas *Hymenaea martiana* Hayne em células de osteossarcoma *in vitro* nas dosagens 10 μ L/mL promoveu ação citotóxica dose e tempo dependente. Já na dosagem de 100 μ L/mL, houve aumento progressivo da viabilidade, até 24 horas expostas ao tratamento, seguido de uma queda na viabilidade e ação citotóxica em 72 horas de exposição. Em 1000 μ L/mL, 2000 μ L/mL, e 5000 μ L/mL houve aumento da viabilidade dose e tempo dependente, quanto maior o tempo de exposição, maior foi a viabilidade celular. Por outro lado, nas células de veia umbilical humana, que em condições normais apresentam multiplicação celular semelhante à observada nas células neoplásicas, ao serem submetidas ao estresse oxidativo, apresentaram aumento da viabilidade nos grupos tratados com doses maiores de extrato. Neste caso o extrato promoveu multiplicação celular benéfica, pois é possível que tenha protegido as células dos danos oxidativos.

Palavras-chave: câncer, citotoxicidade, cultivo celular, HUVEC, neoplasia óssea.

ABSTRACT

Popularly known as jatobá, the species *Hymenaea martiana* Hayne is a typical tree of the cerrado and caatinga biomes. The genus *Hymenaea* is known for the large amount of phenolic compounds and flavanoids. Bioactive compounds are substances that have the ability to bring beneficial health effects, helping the metabolic system and reducing oxidative stress and the incidence of diseases such as cancer. The search for new sources of natural compounds with biological activity has great relevance for the discovery of new drugs to treat cancer. Canine osteosarcoma is an aggressive tumor, almost always progressing to metastasis and has very short patient survival. The present study aimed to investigate the action of the crude ethanolic extract of the leaves of *Hymenaea martiana* Hayne, on canine osteosarcoma cells (D17) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) submitted to oxidative stress. The effect of the crude leaf extract *Hymenaea martiana* Hayne on osteosarcoma cells in vitro at 10 μ L / mL dosages had a dose-dependent and time-dependent cytotoxic action. At the dosage of 100 μ L / mL, there was a progressive increase in viability up to 24 hours exposed to treatment, followed by a drop in viability and cytotoxic action in 72 hours of exposure. In 1000 μ L / mL, 2000 μ L / mL, and 5000 μ L / mL, there was an increase in dose viability and time dependent, the longer the exposure time, the greater the cell viability. On the other hand, in human umbilical vein cells, which under normal conditions have cell multiplication similar to that observed in neoplastic cells, when subjected to oxidative stress, showed increased viability in groups treated with higher doses of extract. In this case, the extract promoted beneficial cell multiplication, as it is possible that it protected the cells from oxidative damage.

Key words: HUVEC, bone neoplasia, cell culture, cytotoxicity, cancer.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui cinco biomas com grande abundância de plantas nativas, entre eles está o bioma Cerrado¹, que é considerado um *hotspot* mundial, ou seja, ele é uma área prioritária de conservação da biodiversidade². O Cerrado vem sendo destruído por causa da intensa implantação de pastagens e plantação de grãos podendo ser completamente extinto até 2030³. Isso é preocupante pois grande parte do potencial terapêutico poderá ser perdido, por este motivo pesquisas devem ser incentivada, buscando à descoberta de novas fontes de flavonóides, que podem proporcionar vários benefícios à saúde humana. e a possibilidade de desenvolvimento de novos medicamentos pela indústria farmacêutica⁴.

Entre os desafios para determinar do efeito farmacológico de um extrato, está a elucidação de compostos ativos. As plantas possuem inúmeros constituintes em seus extratos. Quando testados estes compostos podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos, esses efeitos podem ocorrer devido a presença de inúmeros e diferentes compostos químicos presentes nesse extrato⁵.

Conhecida popularmente com jatobá ou jatobá-do-mato a espécie *Hymenaea martiana* Hayne é uma árvore típica dos biomas cerrado e caatinga, sendo essa espécie um dos representantes utilizados na medicina popular, assim como os de outras espécies gênero^{6,7,8}. O gênero *Hymenaea* é conhecida pela grande quantidade de compostos fenólicos e flavanoides estão amplamente distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores das plantas^{9,10}. Compostos bioativos são substâncias que possuem capacidade de trazer efeitos benéficos a saúde, auxiliando o sistema metabólico e reduzir o estresse oxidativo e a incidência de doenças como por exemplo o câncer¹⁰.

As plantas do gênero *Hymenaea* são utilizadas como medicinais no tratamento de processos inflamatórios e infecções bacterianas¹¹. Estudo realizado por Souza et al.¹² (2009) demonstrou atividade antifúngica e antimicrobiana. Outras pesquisas apresentaram atividade antibacteriana¹³; larvicida¹⁴; antimicrobiana¹⁵; antiinflamatório e antioxidante^{16,17} tratamento de diabéticos¹⁸. A maioria dos usos tradicionais de *Hymenaea spp.* foram substanciadas por estudos farmacológicos. A literatura revelou que *Hymenaea spp.* apresenta atividades biológicas, incluindo antibacteriano^{19,20,21}; antidiarréico²², antifúngico²³, antiinflamatório²⁴, antileishmanial²⁵, antinociceptivo²⁶, antioxidante^{14, 26,27, 28}, antiplasmodial²⁹,

antiulcera³⁰, antiviral³¹, hepatoprotetor³¹, larvicida^{14,32} e atividades miorelaxantes³³, antimicrobiana^{34,35,36} e antiproliferativo em células cancerígenas^{14,37,38}.

O osteossarcoma (OSA) canino é a câncer primário mais comum em cães, expressando cerca de 80% das neoplasias que originam nos ossos^{39,40,41}. Este tipo de tumor é agressivo nos cães, tanto localmente, quanto sistematicamente, por causa do desenvolvimento de metástase. Apesar dos avanços científicos relacionados aos diversos tipos de terapia, o prognóstico para OSA é ruim⁴¹, com uma sobrevida média que vai de três meses a um ano, sendo que menos que 20% dos cães sobreviverão por mais que dois anos a partir do diagnóstico⁴².

A busca de novos medicamentos é importante e cada vez mais intensa, pois ainda não há um tratamento efetivo que seja seletivo. É necessário inovar nas estratégias de impedimento do avanço do câncer, por meio da seleção de moléculas que possuam mecanismo específico para cada tipo de neoplasia⁴³.

Compostos bioativos são substâncias que possuem capacidade de trazer efeitos benéficos a saúde, auxiliando o sistema metabólico e reduzir o estresse oxidativo e a incidência de doenças como por exemplo o câncer⁴⁴. A pesquisa por novas fontes de compostos naturais com atividade biológica, apresenta grande relevância para a descoberta de novas drogas para tratamento do câncer, pois as drogas utilizadas atualmente são agressivas e apresentam efeitos adversos as células normais do corpo^{45,46}.

O presente estudo teve por objetivo investigar a ação do extrato etanólico bruto das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne, em células de osteossarcoma canino (D17) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) submetidas ao estresse oxidativo.

3. METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido no Laboratório Multiusuário de Avaliação de Moléculas, Células e Tecidos, na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

2.1. Material botânico e obtenção do extrato

A coleta das folhas foi feita de um exemplar, depositado no herbário Vale do São Francisco identificado como exsiccata da planta 21868. Produção do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne foi realizada seguindo o método de Peixoto et al.⁴⁷, com uma pequena adaptação, após a coleta das folhas, elas permaneceram sete dias em estufa com circulação de ar a 45°C, para depois passar pelo processo de maceração.

O extrato foi analisado por dois métodos, análise por HPLC-DAD e por cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE-DAD. Na análise por HPLC-DAD, o extrato das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne foi extraído em SPE C-18 (Extração em fase sólida). O cartucho foi ativado previamente utilizando 10mL de metanol e 10mL de água ultrapura. Foi solubilizado 100mg do extrato em 500µL de água acidificada (pH=2 com HCl) e 500µL de MeOH. Em seguida a aplicação do extrato no cartucho, foram adicionados 10mL de água ultrapura e logo após a fração com os compostos orgânicos foi eluída com 10mL de metanol. Esta fração metanólica foi analisada por CLAE-DAD.

A análise por CLAE-DAD foi realizada através um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Shimadzu Prominence LC-20AT com um detector de arranjo de diodo (SPDM20), injetor automático SIL-20AC, forno CTO-20A e degaseificador DGU-20A5. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Luna C-18 (250mm x 4,6mm x 5µm, Phenomenex). Foi utilizada como fase móvel a mistura de H₂O: ácido fórmico (99:1, Solvente A) e metanol (Solvente B), com sistema de eluição: 0-10min, 90-100% de B, 10-30min, 100% de B fluxo de 1,0mL/minuto, temperatura de 35°C e para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 320nm. Para a filtração das amostras foram utilizados filtros de nylon (Whatman) 0,45µm. Todos os solventes utilizados foram grau HPLC.

2.2. Cultivo celular

As células de osteossarcoma osteogênico metastático canino (D-17, BCRJ 0276, Lote 000573, Passagem 239, Espécie *Canis familiaris*) e as células endoteliais de veia umbilical humana (EA. Hy 926, BCRJ 0345, Lote 001100) originárias da ATCC (American Type Culture Collection -Manassas, VA, USA) foram adquiridas

do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ –Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina (10.000 U.I./ml -10 mg/ml), anfotericina B e L glutamina (todos os reagentes da Cultilab, Campinas, Brasil)e mantidas em incubadora umidificada a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂, de acordo com adaptação de YU et al.⁴⁸e Mane a et al⁴⁹.

2.3. Delineamento experimental

Foram realizados ensaios em quintuplicata, com 3 experimentos independentes. As células de osteossarcoma foram semeadas em placas de meio de cultura de 96 poços. Ao término da etapa de cultivo, as células foram quantificadas na câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços contendo 200µL de meio DMEM, na concentração de 1×10^4 por poço, respectivamente, para o ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio [MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphnyl-2H-tetrazólio)]. A placa foi mantida em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas.

Depois, o meio foi desprezado e os poços tratados ou não com o extrato das folhas de jatobá (EBFJ), por 24 (G24), 48 (G48) e 72 horas (G72), nas concentrações de 10µL/mL, 100µL/mL, 1000µL/mL, 2000µL/mL e 5000µL/mL. O grupo controle (GC) negativo, foi tratado unicamente com dimetilsulfóxido (DMSO, Cultilab, Campinas, Brasil), com a finalidade de verificar se a viabilidade presente nos grupos tratados com os extratos é decorrente unicamente ao efeito desses, uma vez que os extratos são diluídos no DMSO. Os poços foram tratados de forma aleatória (Figura1).

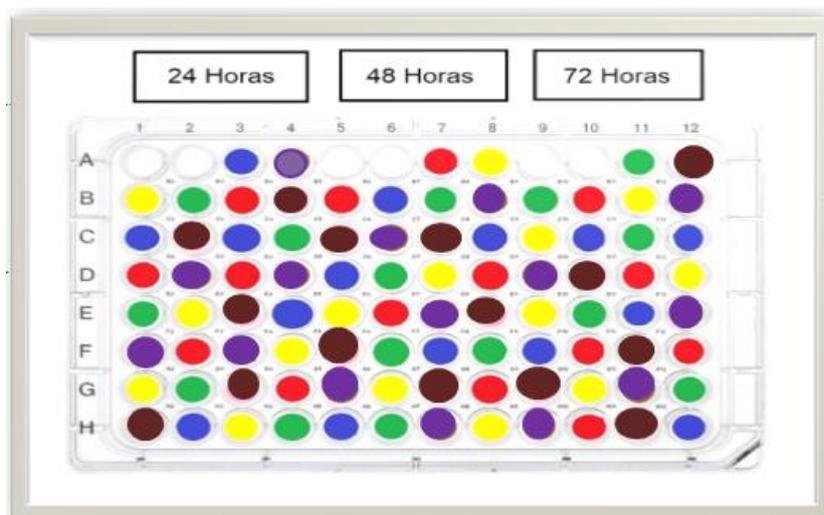


FIGURA 01 - Distribuição aleatório do tratamento de células de Osteossarcoma canino em placa de 96 poços. Em amarelo, controle com DMSO ($0,3\mu\text{g/mL}$); em vermelho, tratamento $10\mu\text{g/mL}$; em verde tratamento $2 (100\mu\text{g/mL})$ em azul, tratamento $3 (1000\mu\text{g/mL})$; em roxo, tratamento $4 (1000\mu\text{g/mL})$; em marrom, tratamento $5 (5000\mu\text{g/mL})$.

Após o período de tratamento, o meio foi descartado e foi adicionado $10\mu\text{L}$ de tetrazólio (MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-diphnyl-2H-tetrazólio) em cada poço. As placas foram incubadas por três horas. A fim de parar a reação, acrescentou-se $50\mu\text{L}$ de sodium dodecyl sulfato (SDS – Vivantis Biochemical) a 10% diluído em HCl ($0,01\text{N}$) por poço e as placas permaneceram incubadas por 24 horas em temperatura ambiente.

O ensaio de estresse oxidativo da mesma forma, foi realizado tratamentos em quintuplicata em três experimentos independentes, as células foram semeadas em placas de 96 poços contendo $200\mu\text{L}$ de meio DMEM, na concentração de 1×10^4 por poço. A placa foi mantida em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 , por 24 horas. Após as 24 horas o meio foi descartado e $200\mu\text{L}$ da solução previamente preparada de Peróxido de hidrogênio a 1%, foi colocada em cada poço. Nessa fase do experimento a luz do fluxo e da sala foram apagadas para evitar a oxidação da solução. Após o tratamento de todos os poços, a placa foi envolvida em papel alumínio e colocada novamente na incubadora. Após 6 horas foi iniciado o protocolo padrão do MTT, onde o meio foi descartado e foi adicionado $10\mu\text{L}$ de tetrazólio (MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-diphnyl-2H-tetrazólio) em cada poço. As placas foram incubadas por três horas. A fim de interromper a reação, acrescentou-

se 50 µl de sodium dodecyl sulfato (SDS – Vivantis Biochemical) a 10% diluído em HCl (0,01N) por poço e as placas permaneceram incubadas por 24 horas em temperatura ambiente.

A densidade óptica foi quantificada em espectrofotômetro (Awareness Technology Inc/ Stat Fax 2100, 425nm - 540nm, Palm City, FL, USA). Os resultados obtidos do espectrofotômetro foram transformados em porcentagens para análise, através das equações seguintes:

Análise de variância e teste t (5% de significância) para viabilidade celular.

A citotoxicidade foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ CT} = 100 - [(\text{abs tratamento} / \text{abs controle}) \times 100]$$

na qual, CT é a citotoxicidade; e abs é a absorbância.

A viabilidade celular foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ VC} = (\text{abs tratamento} / \text{abs controle}) \times 100$$

na qual, VC é a viabilidade celular; e abs é a absorbância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação a percentagem média relativa dos tratamentos utilizando extrato bruto de folhas *Hymenaea martiana* Hayne, em células de osteossarcoma *in vitro*, houve diferença significativa na viabilidade celular, em relação ao controle negativo, pelo teste t, as diferenças estão demonstradas na tabela 1 através das letras acima das médias percentuais. Na dosagem 10µL/mL houve ação citotóxica dose e tempo dependente, porém essa ação foi muito baixa não sendo significativa. Já na dosagem de 100µL/mL houve um aumento progressivo da viabilidade até G₄₈, seguido de uma queda na viabilidade e ação citotóxica em G₇₂, também baixa e não significativa.

Em 1000µL/mL, 2000 µL/mL, e 5000 µL/mL houve aumento da viabilidade dose e tempo dependente, quanto maior o tempo de exposição, maior foi a viabilidade celular. Na dosagem de 2000 µL/mL em todos os tempos houve um aumento de mais de 400% da viabilidade celular, na dosagem de 5000 µL/mL chegou a mais de 600%, o que é muito negativo quando se trata de uma célula neoplásica que já possui um comportamento de multiplicação celular descontrolado, quando é observado o aumento que houve em relação ao grupo sem tratamento, percebemos uma atividade que pode ter levado a indução de mitose (Tabela 1).

TABELA 1 -Viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) de cada grupo, por concentração, tempo de exposição e dosagem de EBBFJ, pelo método de redução do tetrazólio (MTT). Os resultados expressos em percentagem média. Letras iguais expressam resultados significativamente iguais, letras diferentes expressam resultados significativamente diferentes (Teste t).

TRATAMENTO	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
	%VC	%CT	%VC	%CT	%VC	%CT
C	100 ^{ab}	-	100 ^{ab}	-	100 ^{ab}	-
10 µL/mL	91,32 ^{ab}	8,68	88,7 ^{ab}	11,26	83,33 ^{ab}	16,67
100 µL/mL	101,84 ^{ab}	-	367,25 ^b	-	85,18 ^{ab}	14,82
1000µL/mL	220,01 ^b	-	215,20 ^b	-	243,70 ^b	-
2000 µL/mL	422,68 ^a	-	415,91 ^a	-	446,30 ^a	-
5000 µL/mL	256,20 ^b	-	687,57 ^a	-	559,26 ^a	-

Este trabalho com folhas *Hymenaea martiana* Hayne, apresenta grande importância pela escassez de estudo até mesmo com o gênero, em células animais, pois não há resultados sobre a ação de folhas da espécie ou gênero em células animais por isso a discussão a seguir é com trabalhos realizados com outras partes da planta.

Em pesquisa realizada com o mesmo extrato descreveu ação antitumoral frente às células de adenocarcinoma mamário caninas (AF-720), porém a dosagem onde foi encontrada essa ação foi alta, 25mg/mL. A observação foi realizada somente em G₂₄, difere do que foi observado neste estudo, onde houve ação citotóxica da menor dose 10µL/mL tempo dependente e da dosagem 100µL/mL no G₇₂ de exposição ao Extrato bruto das folhas *Hymenaea martiana* Hayne⁵⁰.

Neste trabalho não foi encontrado o IC₅₀, que é a dosagem de extrato necessária para inibir 50% da viabilidade celular em relação ao grupo controle, mesmo havendo atividade citotóxica na dosagem de 10µL/mL, pois houve um aumento da viabilidade das células nas outras dosagens testadas, especialmente em relação ao tempo de exposição G₇₂. Segundo Reynertson et al.⁵¹, um valor de IC₅₀ menor de 50 µL/mL é considerado muito ativo, 50 -100 µL/mL 1 moderadamente ativo, 100 - 200 µL/mL ligeiramente ativo e acima de 200 µL/mL estão inativos. Partindo dos dados descritos a ação dos extratos na linhagem estudada por Vieira et al.¹⁰ seria inativo por ter a dosagem muito alta. Figueiredo¹⁰ em pesquisas com células de linhagem melanoma murinho B16F10-Nex2 obteve resultado moderadamente ativo com 50% da

viabilidade celular na dosagem de concentração de 50µg/mL de extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* em G₂₄.

Monteiro⁵², em estudos com linhagem de Sarcoma (S-180), o extrato da folha de *Hymenaea stigonocarpa* não inibiu a viabilidade celular, o extrato do caule foi o extrato mais citotóxico, pois inibiu a viabilidade celular do tumor de Sarcoma com IC₅₀ estimado em 20,2 µg/mL. O extrato da raiz apresentou valor de IC₅₀ (87,8 µg/mL) cerca de quatro vezes maior, e por isso foi considerado não promissor para atividade antiproliferativa.

Jayaprakasam et al.⁵³ isolaram os tepernoides que são metabólitos secundários dos frutos de *Hymenaea courbaril* e testaram sobre as linhagens tumorais humanas MCF-7 (mama), SF-268 (Sistema neural central) HCT-116 (côlon) e AGS (gástrico), neste estudo assim como no nosso houve aumento viabilidade celular. Silveira⁵⁴ em pesquisas com polissacarídeos de xiloglucana de reserva do fruto de *Hymenaea courbaril* sobre de células HeLa (carcinoma de cérvix uterino humano), tiveram como resultado um aumento na viabilidade celular corroborando com este trabalho, sugerindo também um efeito indutor da proliferação celular.

A angiogênese é importante para o crescimento e metástase do tumor. As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) são tipos de células endoteliais primárias comumente usadas para estudar a angiogênese *in vitro*^{55,56}. Por ter comportamentos semelhantes, foi utilizado neste estudo também células endoteliais para observar se o comportamento de multiplicação acontecia somente em relação as células tumorais.

No ensaio de submissão ao estresse oxidativo, induzido por peróxido de hidrogênio, em células endoteliais de veia umbilical humana, na percentagem média relativa dos tratamentos utilizando extrato bruto de folhas *Hymenaea martiana* Hayne, em relação ao controle negativo, pelo teste t, houve diferença significativa na viabilidade celular. A diferença está demonstrada pelas letras diferentes acima do percentual. Notou-se um aumento da viabilidade nas dosagens 1000µL/mL, 2000µL/mL e 5000µL/mL. O EBFJ protegeu as células dos danos oxidativos nas maiores dosagens. Esses dados sugerem que o extrato pode proteger as células da ação das EROS. Estudos *in vitro* com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células endoteliais demonstraram que ele pode induzir ao estresse oxidativo diminuindo a viabilidade da célula causando parada do ciclo celular, inibição da proliferação celular, e indução de apoptose^{57,58,59,60}.

TABELA 2 – Estresse Oxidativo em células endoteliais. Viabilidade Celular (VC) e citotoxicidade (CT) de cada grupo por concentração, tempo de exposição e dosagem de EBEFJ, pelo método de redução do tetrazólio (MTT). Os resultados expressos em percentagem média. Letras iguais expressam resultados significativamente iguais, letras diferentes significativamente diferentes (Teste t).

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO 24 HORAS	
	%VC	%CT
C	100 ^b	-
10 µL/mL	95,24 ^b	4,76
100 µL/mL	90,47 ^b	9,52
1000µL/mL	187,30 ^b	-
2000 µL/mL	782,42 ^a	-
5000 µL/mL	236,50 ^{ab}	-

Orsi et al.⁶¹ testaram a ação protetora do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* contra inflamação induzida pelo ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em ratos, e houve proteção e inibição da peroxidação lipídica em membranas do cólon, os autores relacionaram a atividade protetora com propriedades antioxidante.

Este estudo vem confirmar a atividade antioxidante vastamente descrita no gênero *Hymenaea*, que é reconhecido como fonte de compostos fenólicos^{9,10,60,63,64,65}. Outro estudo sugere que a sua atividade antioxidante esteja relacionada à presença de polifenóis e flavonoides⁶⁶. Sabe-se que existe uma forte relação entre a quantidade de conteúdo fenólico e atividade antioxidante.

Este trabalho com folhas *Hymenaea martiana* Hayne, apresenta grande relevância pela escassez de estudos do gênero em células animais. Nas células de osteossarcoma canino houve ação citotóxica tempo dependente em baixa concentração. No entanto, em doses maiores houve um aumento progressivo da viabilidade celular, sugerindo um efeito indutor da proliferação celular neoplásica. Por outro lado, nas células de veia umbilical humana, que em condições normais apresentam multiplicação celular semelhante à observada nas células neoplásicas, ao serem submetidas ao estresse oxidativo, apresentaram aumento da viabilidade nos grupos tratados com doses maiores de extrato. Neste caso o EBFJ promoveu multiplicação celular benéfica, pois é possível que tenha protegido as células dos danos oxidativos promovidos pela ação das EROS.

4. CONCLUSÃO

O extrato etanólico bruto das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne, aumentou a viabilidade celular das células de osteossarcoma canino e das células endoteliais de veia umbilical humana, submetidas ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

1. Neto, G. G., & Morais, R. D. (2003). Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica*, 17(4), 561-58.
2. Aguiar, L. D. S., Machado, R. B., & Marinho-Filho, J. (2004). A diversidade biológica do Cerrado. *Ecologia e caracterização do Cerrado*, 19-42.
3. Machado RB, MB RN, Pereira E, Caldas D, Gonçalves N, Santos K, Tabor & M. Steininger. 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Conservation International do Brasil, Brasília.
4. Peixoto, J. D. C., Neves, B. J., Vasconcelos, F. G., Napolitano, H. B., Barbalho, M. G. D. S., & Rosseto, L. P. (2019). Flavonoids from Brazilian Cerrado: Biosynthesis, Chemical and Biological Profile. *Molecules*, 24(16), 2891.
5. SANTOS, K. K. A. Atividade antiépimastigota, citotóxica e fungicida de plantas medicinais da Região do Cariri. Dissertação de mestrado. Universidade Regional do Cariri, 2011.
6. SILVA, M.S.; LEITE, K.R.B.; SABA, M.D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae-Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. v. 14, n. 4, p. 673-679, 2012.
7. Silva Oliveira, F. G., de Lima-Saraiva, S. R. G., Oliveira, A. P., Rabelo, S. V., Rolim, L. A., & da Silva Almeida, J. R. G. (2016). Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* Hayne. *Pharmacognosy research*, 8(4), 270.
8. Pacheco, A. G. M., Branco, A., Câmara, C. A., Silva, T. M. S., Silva, T. M. G., de Oliveira, A. P & Mendonça, J. N. (2019). Identification of flavonoids in *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) by HPLC-DAD-MSn analysis. *Natural product research*, 1-6.
9. Miranda AR., Castro CFS., Silvério M DO. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2014 (16) 3, supl. I, 693-699.
10. Figueiredo PA. Avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e fotoprotetor de extratos de *Hymenaea courbaril* L. e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex

- Hayne. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, Assis, 2014.
11. Agra MDF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJLD, Coelho VPM. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of ethnopharmacology*. 2007; 111(2), 383-395.
 12. Souza ACM, Kato L, Silva CC, Cidade AF, Oliveira CMA, Silva MD RR. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*. 2010; 53(6), 500-503.
 13. Gomes CHM, Souza FR, Fonseca C, Casemiro LA, Furtado NAJC, Ambrosio SR, Cunha WR. Determinação in vitro da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaea courbaril L.* *Investigação*. 2010: 10:2-3.
 14. Aguiar JCD, Santiago GM, Lavor PL, Veras HN, Ferreira YS, Lima M A, Alves PB. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. *Natural product communications*. 2010; 5(12), 1934578X1000501231.
 15. Sales GWP, Batista AHDM, Rocha LQ, Nogueira NAP. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril L.* *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2015; 35(4).
 16. Orsi PR, Seito LN, Di Stasi LC. *Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne*: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2014; 151(1), 380-385.
 17. Roy A, McDonald P, Timmermann BN, Gupta M, Chaguturu R. Bioactivity Profiling of Plant Biodiversity of Panama by High Throughput Screening. *Natural Product Communications*. 2019; 14(1), 1934578X1901400119.
 18. Silva CP, Soares-Freitas RAM, Sampaio GR, Santos MCB, Nascimento TP, Cameron LC, Arêas JAG. Identification and action of phenolic compounds of Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa Mart.*) on α -amylase and α -glucosidase activities and flour effect on glycemic response and nutritional quality of breads. *Food research international*. 2019; 116, 1076-1083.

19. De Souza AC, Kato L, Silva CC, Cidade AF, Oliveira CM, Silva MR. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*. 2010; 53: 500-503.
20. Garcia CS, Ueda SMY, Mimica LMJ. Evaluation of in vitro antibacterial activity of hydro-ethanol from vegetable extracts against MRSA and MSSA *Staphylococcus aureus*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 2011 :70: 589-598.
21. Dimech GS, Soares LA, Ferreira MA, Oliveira AG, Carvalho MC, Ximenes EA. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *Sci. World J*. 2013: 862763.
22. Da Costa MP, Bozinis MC, Andrade WM, Costa CR, Silva AL, Alves Oliveira CM, Kato L, Fernandes OF, Souza LK, Silva MR. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. *BMC Complement. Altern. Med.*2014 : 14: 245.
23. Takagi K, Itoh S, Nasu S, Yamada S, Nomura S, Shimomura K, Ohnishi, K. Anti-inflammatory effect and pigmentation inhibitory effect of the pericarp of Jatoba (*Hymenaea courbaril* L.). *J. Nat. Med*. 2002: 56: 108-112.
24. Ribeiro TG, Chávez-Fumagalli MA, Valadares DG, Franca JR, Lage PS, Duarte MC, Andrade PH, Martins VT, Costa LE, Arruda AL, Faraco AA, Coelho EA, Castilho R.O. 2014. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Exp. Parasitol*. 2014: 143: 60-68.
25. Silva MEGC, Oliveira ACB, Sá PGS. Guimarães, A.L., de Oliveira, A.P., Nunes X.P., Almeida, J.R.G. da S., 2011. Atividade antinociceptiva das fases obtidas por partição do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* (Fabaceae). *Jornada de Iniciação Científica da UNIVASF. Anais da VI JIC/UNIVASF*. pp. 2.
26. Imai T, Inoue S, Ohdaira N, Matsushita Y, Suzuki R, Sakurai MH.J. J Ozaki SK, Finger Z, Fukushima K. 2008. Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. *J. Wood Sci*. 2008: 54: 470-475.
27. Silva CMEG, Guimarães AL, Oliveira AP, Souza Araújo C, Siqueira Filho JA, Fontana AP, Silva Almeida, JRG. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2012; 4(2), 1160-1166.
28. Maranhão CA, Pinheiro IO, Santana ALBD, Oliveira LS, Nascimento MS, Bieber LW 2013. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts

- and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Int. Biodeterior. Biodegradation. 2013: 79: 9-13.
29. Köhler I, Jenett-Siems K, Siems K, Hernández MA, Ibarra RA, Berendsohn WG, Bienzle U, Eich E. In vitro antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. Z. Naturforsch C. 2002: 57: 277-281.
 30. Cecílio AB, Faria DB, Oliveira PC, Caldas S, Oliveira DA, Sobral ME, Duarte MG, Moreira CP, Silva CG, Almeida, V.L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. J. Ethnopharmacol. 2012: 141:975-981.
 31. Closa D, Torres M, Hotter G, Bioque G, León OS, Gelpí E, Rósello-Catafau. Prostanoids and free radicals in C14C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 1997: 56: 331-334.
 32. Valente PP, Amorim JM, Castilho RO, Leite RC, Ribeiro MF. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 2014: 113: 417-423.
 33. Bezerra GP, Góis RW, Brito TS, Lima FJ, Bandeira MA, Romero NR, Magalhães PJ, Santiago G.M, 2013. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. J. Ethnopharmacol. 2013: 149: 62-69.
 34. Peixoto RDM, Silva W, Almeida, JRGS, Branco A, Costa M. (2016). Antibacterial potential of native plants from the caatinga biome against *Staphylococcus spp.* Isolates from small ruminants with mastitis. Revista Caatinga. 2016; 29(3), 758-763.
 35. Da Silva VF, Franco I, Damasceno TEF, Silva Almeida, JRG, Costa M. M. Potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de plantas frente a bacilos gram negativos isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas criadas na região de Petrolina-PE. Semina: Ciências Agrárias. 2014; 35(2), 883-890.
 36. Vieira DS, Peixoto RM, Costa MM, Freire DP, Silva TMG, Silva TMS. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne frente às *Staphylococcus spp.* e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2018; 38(3), 462-469.
 37. Lacerda LP, Malaquias G, Peron AP. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. 2014: 86:1147-1150.

38. Monteiro AF. Estudo químico e avaliação do potencial efeito biológico das folhas e flores de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae). Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, para obtenção do título de Mestre em Química. Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Brazil, pp. 157
39. Pimenta VDSC, Braga KMDS, Machado PA, Prado YCLD, Araújo EGD. Osteossarcoma canino e humano: uma visão comparada. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia. 2013; 9 (17) 1971- 1991. <http://www.conhecer.org.br>
40. Cruz VS, Rodrigues FA, Braga K, Machado PA, Bianchi Filho C, Prado Y C, Araújo EG. β Lapachone blocks the cell cycle and induces apoptosis in canine osteosarcoma cells. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2018; 38(12) 2224-2232.
41. Ong SM, Saeki K, Kok MK, Nakagawa T, Nishimura R. YM155 enhances the cytotoxic activity of etoposide against canine osteosarcoma cells. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2019: 19-0029. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/advpub/0/advpub_19-0029/_article/-char/ja/
42. Selvarajah GT, Kirpensteijn J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *The Veterinary Journal*. 2010; 185(1), 28-35.
43. Newman DJ, Cragg GM, Snader, KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. *Journal of natural products*. 2003; 66(7): 1022-1037.
44. Dias LS, Luzia DM., Jorge N. (2013). Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. *Industrial Crops and Products*, 49, 610-618.
45. Steenkamp V., Gouws MC (2006). Cytotoxicity of six South African medicinal plant extracts used in the treatment of cancer. *South African Journal of Botany*, 2006 72(4), 630-633.

46. Ochwang'i, DO., Kimwele CN, Oduma JA, Gathumbi PK, Mbaria, JM, Kiama, SG. Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014; 151(3), 1040-1055.
47. Peixoto, RM, Araújo RMP, Peixoto LJS, Bomfim SAG., Silva TMG., Silva T M S, Costa MM. 2015. Treatment of Goat Mastitis Experimentally Induced By *Staphylococcus aureus* A Formulation Containing *Hymenaea martiana* Extract. *Small Ruminant Research*, 2015; 130, 29-235.
48. Yu HY, Kim SOK, Jin CY, Kim GY, Kim WJ, Yoo YH, Choi YH. β -lapachone-induced apoptosis of human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K/Akt pathway. *Biomol Ther*. 2014;22(3):184-92.
49. Manea SA, Fenyó IM, Manea A. c-Src tyrosine kinase mediates high glucose-induced endothelin-1 expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016;123–130.
50. Vieira DS., Moura J B, da Silva F ES., Taniwaki F, Cardoso TC. (2018). Atividade antitumoral da folha da *Hymenaea martiana* Hayne em células mamárias de cães. *PUBVET*, 12, 133.
51. Reynertson KA, Basile MJ, Kennelly EJ. Antioxidant potential of seven *myrtaceous* fruits. *Ethnobotany Research and Applications*. 2005; 3, 025-036.
52. Monteiro AF. Estudo químico e avaliação do potencial efeito biológico das folhas e flores de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae). Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Goiás. 2014. 157f.
53. Jayaprakasam, B., Alexander-Lindo, R. L., DeWitt, D. L., & Nair, M. G. (2007). Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. *Food chemistry*. 2007; 105(2), 485-490.
54. Silveira JDC. Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de *Chorisia Speciosa* e *Hymenaea Courbaril*. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. 2010. 97f.

55. Yuan, A., Chen, Y. F., Chen, J. J., Yu, S. L., Chen, H. W., Chen, H. Y., ... & Yang, P. C. (2007). HUVEC-cancer cells interaction increases cytoskeleton rearrangement, microvessel tubular formation and decreases apoptosis, and induces gene expression profile changes in HUVEC in non-small cell lung cancer. *Kuster VC, Vale FHA. Leaf histochemistry analysis of four medicinal species from Cerrado. Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2016; (26),673–678.
56. Huang, Z., Zhang, M., Chen, G., Wang, W., Zhang, P., Yue, Y., ... & Fan, J. (2019). Bladder cancer cells interact with vascular endothelial cells triggering EGFR signals to promote tumor progression. *International journal of oncology*, 54(5), 1555-1566.
57. Seto S, Chang D, Ko W, Zhou X, Kiat H, Bensoussan A, Liu J. Sailuotong prevents hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced injury in EA. hy926 cells. *International journal of molecular sciences.* 2017; 18(1), 95.
58. Asahina T, Kashiwagi A, Nishio Y, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y, Takagi Y, Saeki Y, Kikkawa R, Shigeta Y. Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cells exposed to H₂O₂ in high-glucose medium. *Diabetes.* 1995; 44:520–526. doi: 10.2337/diab.44.5.520.
59. Belkhiri A, Richards C, Whaley M, McQueen SA, Orr FW. Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ exposure. *Lab. Investig.* 1997; 77:533–539.
60. Orsi PR., Seito LN. Di Stasi LC. 2014. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 380-385.
61. Aguiar JCD. **Estudo fitoquímico e biológico de *Hymenaea courbaril* L.** Dissertação(Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Química. Fortaleza: Universidade Federal do Paraná, 2009.
62. Almeida JRGS., Silva MEGC., Guimarães AL., Oliveira AP., Araújo CS., Filho JAS., Fontana AP., Damasceno PKF., Branco CRC, Branco A. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.** 2012 (40), 160-1166.

63. Rocha MS, Figueiredo RD., Araújo MDM., Moreira-Araújo RDR. (2013). Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado piauiense. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2013. 35(4), 933-941.
64. Menezes Filho ACP; Souza Castro CF. Identificação das classes de metabólito secundários em extratos etanólicos foliares de *Campomanesia adamantium*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Kielmeyera lathrophytum* e *Solanum lycocarpum*. *Estação Científica (UNIFAP)*. 2019. 9(1), 89-101.
65. Silva Oliveira FG, Lima-Saraiva, SRG., Oliveira AP., Rabelo SV., Rolim LA., Silva Almeida JRG. Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* hayne. *Pharmacognosy research*, 2016, 8(4), 270.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos tipos de câncer estão geralmente expostos a condições de instabilidade no metabolismo oxidativo, entre outros fatores ambientais. O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio grave entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema oxidante. O osteossarcoma corresponde a 6% das neoplasias e é o tumor ósseo maligno primário mais comum encontrado em cães, representando mais de 80% de incidência.

Os dois extratos pesquisados, tanto o do jatobá como da gabirobeira são plantas endêmicas do cerrado que é um bioma que tem sido muito degradado ao longo do tempo e essa degradação pode extinguir plantas com grande potencial farmacêutico, e esse é um dos motivos da importância de estudos como este.

Este trabalho traz resultados inéditos, pois os extratos pesquisados, além de não apresentaram efeito citotóxico significativo, ainda aumentaram a viabilidade celular de forma dose dependente. Os dados sugeriram uma dupla interpretação, já que o aumento da viabilidade em células neoplásicas poderá estar relacionado com a possibilidade de indução de mitose, o que seria indesejável. No entanto, o aumento da viabilidade em células endoteliais, submetidas ao estresse oxidativo, pode estar relacionado com um efeito protetor.

A possível ligação a uma ação antioxidante, pode ser relacionada hipoteticamente, sendo isso promissor quando se fala de estresse oxidativo.