



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

NATHALIA ALEXIA NASCIMENTO DOS SANTOS

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DOS EXTRATOS DAS PLANTAS
DA ORDEM MALPIGHIALES (*Bonnetia Stricta* (Ness) Ness & Mart e *Clusia Lanceolata*
Cambes) EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

Rio de Janeiro

2024

Nathalia Alexia Nascimento dos Santos

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DOS EXTRATOS DAS PLANTAS
DA ORDEM MALPIGHIALES (*Bonnetia Stricta* (Ness) Ness & Mart e *Clusia Lanceolata*
Cambes) EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientador(a):

Prof.^a Dr.^a Eliane Fialho de Oliveira

Coorientador:

Dr. Christian Ferreira

Rio de Janeiro

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

N244a Nascimento dos Santos, Nathalia Alexia
ANÁLISE FITOQUÍMICA E ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DOS
EXTRATOS DAS PLANTAS DA ORDEM MALPIGHIALES
(Bonnetia Stricta (Ness) Ness & Mart e Clusia
Lanceolata Cambes) EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER
DE MAMA / Nathalia Alexia Nascimento dos Santos. --
Rio de Janeiro, 2024.
109 f.

Orientadora: Eliane Fialho de Oliveira.
Coorientadora: Christian Ferreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de
Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2024.

1. Câncer de mama. 2. Produtos naturais. 3.
Bonnetia stricta (Ness) Ness & Mart. 4. Clusia
lanceolata Cambess . 5. Malpighiales. I. Fialho de
Oliveira, Eliane, orient. II. Ferreira, Christian,
coorient. III. Título.

Nathalia Alexia Nascimento dos Santos

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DOS EXTRATOS DAS PLANTAS
DA ORDEM MALPIGHIALES (*Bonnetia Stricta* (Ness) Ness & Mart e *Clusia Lanceolata*
Cambes) EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro,
como requisito para parcial à obtenção do título de
mestre em Nutrição Humana.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Eliane Fialho de Oliveira (Titular)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Tatiana El-Bacha Porto (Titular/Interno)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Simony Carvalho Mendonça (Titular/Externo)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr.^a Ísis Salviano Soares de Amorim (Titular/Revisor)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Mariana Costa Monteiro (Suplente/Interno)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. André Luiz Mencialha (Suplente/Externo)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Alimentos Funcionais (LABAFs), do Instituto de Nutrição Josué de Castro, no Centro Nacional de Bioimagem (CENABIO) e na Central Analítica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos (CA-DPNA) da Faculdade de Farmácia, ambos localizados no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Prof.^a Eliane Fialho de Oliveira e coorientação do Dr. Christian Ferreira. O projeto contou com a colaboração do Prof. Jerson Lima Silva do Instituto de Bioquímica Médica (IBqM) da UFRJ, Prof.^a Lidilhone Hamerski Carbonezi, M.^a Caroline Evangelista Nogueira, ambas do Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais (IPPN) da UFRJ e Prof.^a Simony Carvalho Mendonça da Central Analítica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos (CA-DPNA) da Faculdade de Farmácia da UFRJ, na vigência de auxílios financeiros concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

**Dedico este trabalho a Deus e minha família que
foram os pilares para esta conquista.**

AGRADECIMENTOS

Aqui, deixo registrada a minha gratidão a vocês que foram essenciais para a elaboração e realização desta dissertação.

Em primeiro lugar, te agradeço Deus por sua misericórdia e graça que me fez chegar até aqui. Sem Ti eu não conseguiria. Toda honra e glória pertence ao Senhor.

Aos melhores pais que eu poderia ter, Ana Paula e Robson, que sempre estiveram presentes em todos os momentos, me incentivando e acolhendo. Obrigada por cada oração e afago, vocês são o meu farol. Amo vocês.

A minha irmã Maria Eduarda, desde tão pequena sempre esteve ao meu lado nessa jornada e mesmo sem saber me apoiou e fortaleceu. Essa vitória também é sua, Nana. Te amo.

Ao meu irmão Júnior, a minha cunhada Juliana e sobrinha/filha Eloá, vocês foram essenciais para esta conquista. Mesmo de longe pude receber o amor e apoio de vocês. Amo vocês.

A minha orientadora professora Eliane Fialho, carinhosamente Lili. Agradeço por ser sua eterna aluna. Obrigada por ser essa orientadora e pessoa maravilhosa, genuína e gentil que me permitiu fazer parte do laboratório e confiou no meu potencial. Obrigada pelo respeito, pela paciência e por seu apoio. Obrigada por tudo!

Ao meu coorientador Christian, agradeço por seu empenho, ajuda, apoio, conselhos e amizade. Obrigada por estimular sempre o meu lado pesquisadora e a fazer o meu melhor. Obrigada por acreditar em mim e estar presente sempre que precisei. Você foi essencial nessa jornada e conquista.

Ao Luan, meu primeiro contato com a pesquisa científica, meu colaborador e amigo que me acolheu como aluna de IC e me ensinou tudo o que sei juntamente com o Christian. Agora já estou concluindo o mestrado e indo para o doutorado e você foi um dos que contribuiu para isso. Obrigada por tanto!

A Ísis, a quem hoje posso chamar de amiga. Obrigada por seu apoio, pelas conversas, dicas e por revisar cuidadosamente a redação desta dissertação. Te agradeço pela parceria pois sempre que eu precisei você não mediu esforços em me ajudar. Você é uma excelente pesquisadora e pessoa. Eu acredito em você!

Ao Daniel, meu parceiro do Cenabio, limpeza de estufa e perrengues do 410 (risos). Agradeço pela amizade e por sempre me ajudar quando eu precisei. Sei que você irá longe, acredito no seu potencial.

Aos alunos e companheiros do laboratório, Maria Eduarda, Yasmin, Julia, Yuri e Gustavo, vocês são maravilhosos! Obrigada pela troca de conhecimento, pela ajuda, pelo apoio e os momentos mais engraçados. Torço muito por vocês, contem comigo!

Agradeço a Thaís pelo companheirismo, conselhos e o cuidado em sempre trazer uma lembrancinha dos lugares que visita. Obrigada pelas dicas de doramas e comidinhas coreanas que tanto gostamos.

A Ana Clara e Isabelle, alunas de IC que acompanhei de perto e contribuíram para o meu crescimento profissional. Obrigada pela paciência e ajuda, meninas. Desejo sucesso para vocês.

A professora Denise Bouts que me acompanha desde a graduação, obrigada por seus sábios conselhos e trocas de experiência. Guardei com carinho cada conversa nossa.

As professoras Mariana Monteiro e Tatiana El-Bacha que me acompanharam desde o processo seletivo do mestrado até a defesa do mesmo. Obrigada pela oportunidade e confiança, não estaria aqui sem vocês.

Ao professor Jerson Lima e todos do Cenabio que contribuíram com o meu trabalho, disponibilizando reagentes, equipamentos e instalações dos laboratórios.

A professora Lidilhone Carbonezi e Caroline Evangelista que me forneceram os extratos das espécies de plantas que utilizei para realização dos experimentos que compõe esta dissertação.

A professora Simony Carvalho e todos da Central Analítica que foram tão solícitos e me receberam tão bem em seu laboratório, não apenas para fazer a caracterização química dos extratos, mas também para me ajudar a trabalhar e a compreender os meus resultados. Obrigada, pessoal!

Gostaria de agradecer aos professores membros da banca examinadora deste trabalho por terem aceitado ao meu convite de forma solícita. Obrigada pela dedicação, contribuição,

por terem identificado os pontos fracos e altos deste trabalho e por todas as sugestões que me permitiram alcançar o melhor.

As agências de fomento que forneceram o auxílio de bolsa para realização deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Aquele que leva a preciosa semente, andando e chorando, voltará, sem dúvida, com alegria trazendo consigo os seus molhos.”

Salmos 126.6

LISTA DE ILUSTRAÇÃO, FIGURAS E TABELAS

Fluxograma 1. Fluxograma de obtenção dos extratos hidroalcoólicos das folhas da *Clusia lanceolata* (EHFCl) e frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBs) e análises fitoquímicas e biológicas.

Figura 1. Distribuição global da incidência de câncer mais comum entre mulheres no ano de 2022.

Figura 2. Distribuição global da mortalidade por câncer mais comum entre mulheres no ano de 2022.

Figura 3. Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma no Brasil. Fonte: Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil.

Figura 4. Os tipos de câncer de mama são agrupados por Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo-Negativo. Exemplos de linhagens celulares de câncer de mama; características adicionais também são mencionadas.

Figura 5. Imagem representativa das células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231.

Figura 6. Linha do tempo de descoberta e extração de produtos naturais representativos, como flavonoides, polifenóis e alcaloides.

Figura 7. Número de plantas citadas por bioma e artigos que citam cada bioma.

Figura 8 - Recorte da árvore filogenética do clado Clusoide (Malpighiales).

Figura 9. Imagens da *Clusia lanceolata* Cambess.

Figura 10. Imagens da *Bonnetia stricta*.

Figura 11. Cromatogramas dos perfis químicos do EHFBs e EHFCl por UHPLC-ESI(-) MS/MS com os íons previstos destacados.

Figura 12. Cromatogramas dos perfis químicos do EHFBs e EHFCl por UHPLC-ESI(+) MS/MS com os íons previstos destacados.

Figura 13. Rede molecular dos constituintes químicos do EHFBs e EHFCl através dos dados de LC-MS/MS no modo de ionização negativo pelo software Cytoscape versão 3.10.

Figura 14. Rede molecular dos constituintes químicos do EHF B_s e EHF Cl através dos dados de LC-MS/MS no modo de ionização positivo pelo software Cytoscape versão 3.10.

Figura 15. Estruturas químicas e fragmentação proposta da isovitexina, homoorientina, ácido oleanólico e vitexina-2-O-ramnosídeo.

Figura 16. Efeito in vitro do extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHF B_s) e das folhas da *Clusia lanceolata* (EHF Cl) na viabilidade das células de câncer de mama pelo método de MTT.

Figura 17. Efeito in vitro do extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHF B_s) na viabilidade das células de câncer de mama pelo método Azul de Tripán.

Figura 18. O EHF B_s induz alterações morfológicas nas células tumorais de mama MDA-MB-231.

Figura 19. O EHF B_s induz alterações morfológicas nas células tumorais de mama MCF-7.

Figura 20. O EHF B_s altera as fases do ciclo celular e os níveis de expressão de Ciclina A e CDK-2 em células tumorais de mama MDA-MB-231

Figura 21. O EHF B_s altera as fases do ciclo celular em células tumorais de mama MCF-7.

Figura 22. O EHF B_s reduz a migração celular e níveis de expressão de MMP-2 em células tumorais de mama MDA-MB-231.

Figura 23. O EHF B_s reduz a migração em células tumorais de mama MCF-7.

Figura 24. O EHF B_s induz apoptose e altera os níveis de expressão de Caspase 3 e 9 em células de câncer de mama MDA-MB-231.

Figura 25. O EHF B_s induz apoptose em células de câncer de mama MCF-7.

Figura 26. Efeito do extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHF B_s) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de câncer de mama MDA-MB-231.

Tabela 1. Classificação imunohistoquímica do câncer de mama.

Tabela 2. Caracterização fitoquímica do EHF B_s e EHF Cl por UHPLC-ESI(-) MS/MS.

Tabela 3. Caracterização fitoquímica do EHF*Bs* e EHF*Cl* por UHPLC-ESI(+) MS/MS.

Tabela 4. Valores de IC₅₀ para as células MDA-MB-231, MCF-7, após 24 e 48 horas de tratamento, com EHF*Bs* e EHF*Cl* pelo método de MTT.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A375	Células de melanoma humano
A549	Células epiteliais de carcinoma de pulmão
A59	Células de adenocarcinoma humano
AKT	Proteína quinase A
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
CDC	do inglês, <i>Cell division cycle 25 A</i>
CDK	do inglês, <i>Cyclin-dependent kinase</i>
CK2	Caseína Quinase 2
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência
Da	Dalton
DCFH-DA	do inglês, 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DOX	Doxorrubicina
DPPH	do inglês, <i>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical</i>
EHFB _s	Extrato hidroalcoólico dos frutos da <i>Bonnetia stricta</i>
EHFC _l	Extrato hidroalcoólico das folhas da <i>Clusia lanceolata</i>
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FRAP	do inglês, <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
G1	do inglês, <i>Gap phase 1</i>
G2	do inglês, <i>Gap phase 2</i>
GLO1	Glioxalase 1
GNPS	do inglês, <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HCL	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HER 2	Receptor de Crescimento Epidermal Humano do Tipo 2
Hs578T	Células epiteliais mamárias aneuplóides
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50 % da população
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LC-DAD	do inglês, <i>Liquid Chromatography with Diode Array Detector</i>
LC-ESI-MS/MS	do inglês, <i>Liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>
MCF-10A	Células epiteliais de mama humano não tumorigênica
MCF-7	Células humanas de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Células humanas de adenocarcinoma de mama metastático
MMP	Metaloproteinases de matriz
MS	do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio
NF-κB	do inglês, <i>Factor nuclear kappa B</i>

NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
Nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARP	do inglês, <i>Poli-ADP-ribose polimerase</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PI	Iodeto de propídio, do inglês <i>Propidium Iodide</i>
PI3K	do inglês, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
RE	Receptor de estrogênio
RNase	Ribonuclease
RP	Receptor de progesterona
ROS	do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SiHa	Células de Carcinoma espinocelular cervical
SUS	Sistema Único de Saúde
TEAC	do inglês, <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TNBC	do inglês, <i>Triplo Negative Breast Cancer</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHPLC	do inglês, <i>Ultra-high Performance Liquid Chromatography</i>
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia do câncer de mama a nível mundial e nacional.....	1
1.2 Câncer de mama.....	3
1.3 Tratamento do câncer de mama	7
1.4 Produtos naturais e câncer de mama	8
1.5 Mata Atlântica e Projeto Biota.....	12
1.6 Ordem Malpighiales.....	13
1.7 Família Clusiaceae	15
1.8 Família Bonnetiaceae	18
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVO.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Material vegetal	21
4.2 Obtenção dos extratos	22
4.3 Preparo das amostras e análises por LC-MS/MS	24
4.4 Parâmetros MZmine 2.53	24
4.5 Reagentes.....	25
4.6 Linhagens celulares	25
4.7 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT	26
4.8 Determinação do IC ₅₀	26
4.9 Teste de exclusão por Azul de Tripán.....	26
4.10 Ensaio de migração celular	27
4.11 Análise morfológica	27
4.12 Análise do ciclo celular	27

4.13 Identificação de morte celular	28
4.14 Produção de espécies reativas de oxigênio	28
4.15 Preparo do extrato proteico celular	28
4.16 Análise por Western Blotting	29
4.17 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Perfil químico por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS) e redes moleculares do EHFBS e EHFCI... ..	30
5.2 Os EHFBS e EHFCI reduzem a viabilidade das linhagens celulares tumorais MDA-MB-231 e MCF-7.....	39
5.3 O EHFBS altera a morfologia de células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7.....	43
5.4 EHFBS promove parada do ciclo celular em linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.	46
5.5 EHFBS reduz a migração celular em células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7	49
5.6 Efeito do EHFBS na morte celular das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.. ..	53
5.7 Efeito do extrato hidroalcoólico dos frutos da <i>Bonnetia stricta</i> (EHFBS) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.....	55
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	62
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS	76
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	85

Resumo

O câncer de mama é o mais diagnosticado e mais incidente entre as mulheres mundialmente. Esta neoplasia possui tipos histológicos e moleculares distintos que somados às características individuais definirão o prognóstico e o tipo de tratamento empregado. Os quimioterápicos, embora eficazes, não são específicos para às células cancerígenas e também atuam nas células não tumorais o que gera os efeitos colaterais no organismo. As plantas são as fontes naturais utilizadas na medicina tradicional capazes de produzir metabólitos com propriedades farmacológicas distintas, incluindo a atividade anticâncer, e apresentam menores chances de toxicidade. *Clusia lanceolata* Cambess (Clusiaceae) e *Bonnetia stricta* (Ness) Ness & Mart (Bonnetiaceae) são plantas endêmicas no Brasil e potenciais fontes de compostos fenólicos, xantonas e antraquinonas. Logo, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBs) e das folhas da *Clusia lanceolata* (EHFCl) linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7. Nossos resultados demonstraram que os extratos atuaram de forma citotóxica nas células de câncer de mama mais agressivas, MDA-MB-231, com IC₅₀ de 168,2 e 76,96 µg/mL de EHFBs após 24 e 48h de tratamento, respectivamente e 62,66 µg/mL de EHFCl após 48 horas. Enquanto que, nas células MCF-7, foi visto um efeito citostático com IC₅₀ de 106,9 e 171,4 µg/mL após 24 e 48 horas de tratamento com EHFBs, respectivamente, ao passo que o EHFCl exerceu efeito citotóxico mais significativo após 48 horas de tratamento com valor de IC₅₀ de 74,72 µg/mL. Através da análise fitoquímica por UHPLC-MS/MS, propomos as seguintes substâncias anotadas: ácido quínico, orientina, quercetina 3-vicianosídeo, vitexina-2-O-ramnosídeo, isovitexina, homoorientina e ácido oleanólico, por meio do perfil de fragmentação e comparação com a literatura. Também demonstramos que o extrato gerou alterações na morfologia das células características de apoptose, suprimiu a migração celular em ambas as células, contudo na MDA-MB-231 foi através da regulação negativa de MMP-2. Além disso, o EHFBs desencadeou a parada do ciclo celular nas fases sub-G0/G1, G0-G1, S e G2/M, aumentou o número de células MCF-7 e MDA-MB-231 duplamente marcadas com Anexina-V e PI, característico de morte por apoptose tardia e diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio. Deste modo, observamos que a espécie *Bonnetia stricta* pode ser uma potencial candidata para isolar seus principais compostos químicos possivelmente pelos efeitos promissores in vitro que serão corroborados com as demais análises.

Abstract

Breast cancer is the most diagnosed and most common cancer among women worldwide. This neoplasm has distinct histological and molecular types that, added to individual characteristics, will define the prognosis and the type of treatment used. Chemotherapy drugs, although effective, are not specific for cancer cells and also act on non-tumor cells, which generates side effects in the body. Plants are the natural sources used in traditional medicine capable of producing metabolites with distinct pharmacological properties, including anticancer, and have lower chances of toxicity. *Clusia lanceolata* Cambess (Clusiaceae) and *Bonnetia stricta* (Ness) Ness & Mart (Bonnetiaceae) are endemic plants in Brazil and potential sources of phenolic compounds, xanthenes and anthraquinones. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of hydroalcoholic extract of *Bonnetia stricta* fruits (HEBsF) and *Clusia lanceolata* leaves (HECIL) on MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. Our results demonstrated that the extracts acted cytotoxicly on the most aggressive breast cancer cells, MDA-MB-231, with IC₅₀ of 168.2 and 76.96 µg/mL of HEBsF after 24 and 48 hours of treatment, respectively, and 62.66 µg/mL of HECIL after 48 hours. While in MCF-7 cells, a cytostatic effect was seen with IC₅₀ of 106.9 and 171.4 µg/mL after 24 and 48 hours of treatment with HEBsF, respectively, while HECIL exerted a more significant cytotoxic effect after 48 hours of treatment with IC₅₀ value of 74.72 µg/mL. Through phytochemical analysis by UHPLC-MS/MS, we propose the following annotated substances: quinic acid, orientin, quercetin 3-vicianoside, vitexin-2-O-rhamnoside, isovitexin, homoorientin and oleanolic acid, through the fragmentation profile and comparison with the literature. We also demonstrated that the extract generated changes in cell morphology characteristic of apoptosis, suppressed cell migration in both cells, however in MDA-MB-231 it was through the downregulation of MMP-2. In addition, HEBsF triggered cell cycle arrest in the sub-G₀/G₁, G₀-G₁, S, and G₂/M phases, increased the number of MCF-7 and MDA-MB-231 cells doubly labeled with Annexin-V and PI, characteristic of late apoptosis death, and decreased the production of reactive oxygen species. Thus, we observed that the species *Bonnetia stricta* may be a potential candidate to isolate its main chemical compounds, possibly due to the promising in vitro effects that will be corroborated with the other analyses.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de mama a nível mundial e nacional

O câncer de mama se tornou o tipo de neoplasia mais diagnosticada e a principal causa de mortes por cânceres no mundo. Dados apresentados pelas estatísticas globais apontam que, em 2022, o câncer de mama foi o mais frequente em mulheres tanto em casos (11,6% casos novos) como em número de mortes (6,9%) entre todos os tipos de câncer. Conforme os mapas globais da GLOBOCAN 2022, no público feminino, o câncer de mama e o câncer de colo de útero predominam sobre os demais tipos de cânceres diagnosticados (**Figura 1**) e são as principais causas de morte (**Figura 2**) entre as nações (BRAY et al., 2024).

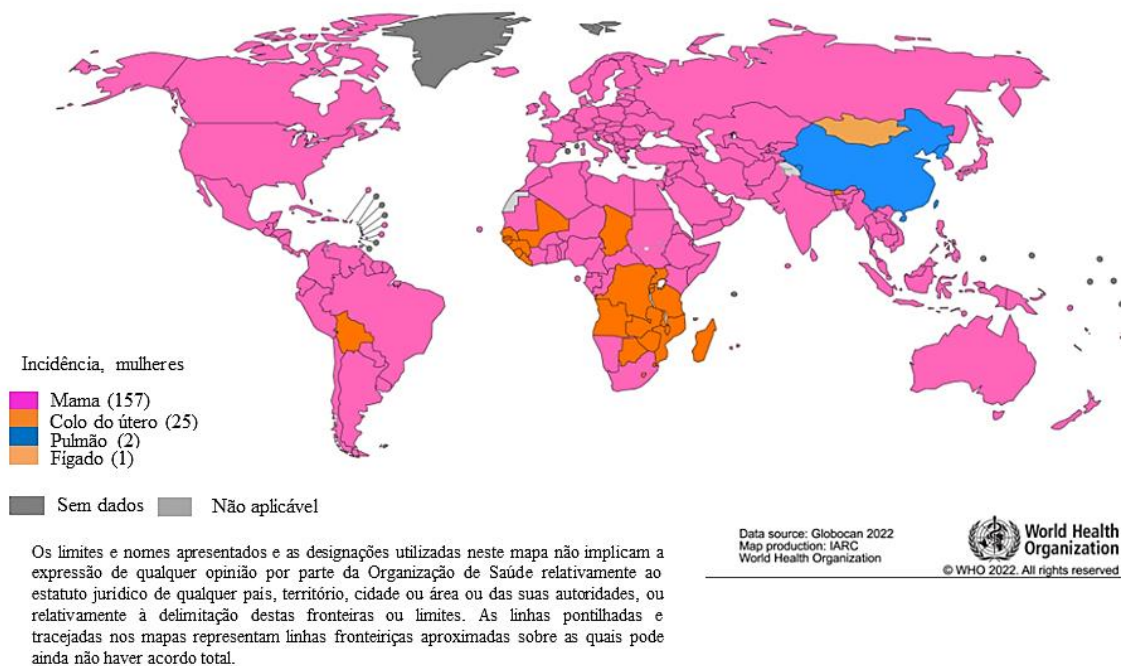


Figura 1. Distribuição global da incidência de câncer mais comum entre as mulheres no ano de 2022. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda. Fonte: adaptado de GLOBOCAN, 2022.

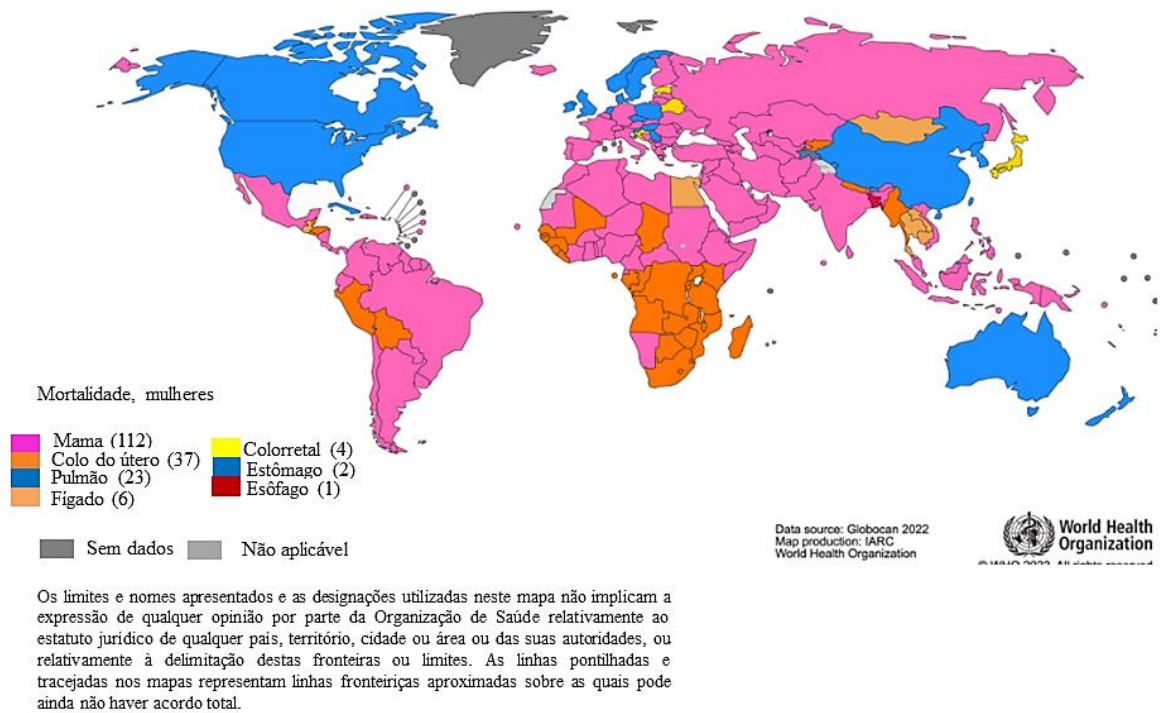


Figura 2. Distribuição global da mortalidade por câncer mais comum entre mulheres no ano de 2022. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda. Fonte: adaptado de GLOBOCAN, 2022.

De acordo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que para cada ano do triênio 2023 a 2025 ocorram 73.610 mil casos novos de câncer de mama, que corresponde a um risco estimado de 66,54 (30,1%) casos a cada 100 mil mulheres (**Figura 3**) (INCA, 2022). Além disso, o INCA estima que os gastos totais com os três tipos de câncer (mama, colorretal e endométrio) serão de R\$ 2,5 bilhões em 2030 e R\$ 3,4 bilhões em 2040. Por isso, é importante refletir e investir em ações de prevenção primária, bem como no diagnóstico e tratamento dessa doença (INCA, 2022). Entre as regiões brasileiras, o maior risco estimado para o câncer de mama, com exceção dos tumores de pele não melanoma, encontra-se na Região Sudeste, de 84,46 casos por 100 mil mulheres e em seguida, as Regiões Sul, Centro-oeste, Nordeste e Norte, com 71,44, 57,28, 52,20, e 24,99 casos por 100 mil mulheres, respectivamente (INCA, 2022).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 3. Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma no Brasil. Fonte: Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil – INCA, 2022.

1.2 Câncer de mama

Por ser uma doença heterogênea, compreender a variedade de tipos histológicos e complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos na iniciação e progressão do tumor de mama torna-se importante para prevenção, prognóstico e tipo de tratamento que será utilizado (KAWIAK, 2022). Conhecer as características moleculares do câncer de mama norteia a classificação desta doença devido à ocorrência em diferentes áreas da mama. Logo, o tipo específico de células envolvidas resulta em subtipos com perfil molecular (**Tabela 1**), morfologia e biomarcadores específicos com comportamentos e respostas ao tratamento próprios (JANUŠKEVIVIČIENĖ & PETRIKAITĖ, 2019; SWAMINATHAN et al., 2023).

A estratificação do câncer de mama é refinada em quatro subtipos principais com natureza clinicamente distinta: luminal A, luminal B, HER2 + (não luminal) e tumores basais (SWAMINATHAN et al., 2023). A estratégia mais comum para estratificar esses subtipos baseia-se em métodos de imuno-histoquímica que distinguem a expressão ou não de receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), receptor de crescimento epidermal humano do tipo 2 (HER2) e níveis da proteína relacionada à proliferação, Ki-67 (**Figura 4**) (WITT & TOLLEFSBOL, 2023; SWAMINATHAN et al., 2023).

Tabela 1. Classificação imunohistoquímica do câncer de mama.

Subtipos moleculares	Biomarcadores	Status de Ki-67	Grau do tumor	Principal(ais) tipo(s) de terapia	Prognóstico	Agressividade
Luminal A	RE (+) RP (+) HER2 (-)	Baixo	I	Terapia endócrina	Bom	Baixa
Luminal B HER2 (-)	RE (+) RP (+) HER2 (-)	Alto	II	Terapia endócrina e quimioterapia	Intermediário	Baixa
Luminal B HER2 (+)	RE (+) RP (+/-) HER2 (+)	Alto/ Baixo	II	Terapia endócrina, quimioterapia e terapia alvo	Intermediário	Baixa
HER2 (+)	RE (-) RP (-) HER2 (+)	Alto	III	Terapia alvo Quimioterapia	Pobre	Alta
Triplo-negativo	RE (-) RP (-) HER2 (-)	Alto	III	Quimioterapia Inibidores PARP	Pobre	Alta

RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor de crescimento epidermal humano do tipo 2. Fonte: adaptado de SARHANGI et al., 2022.

Tumores do subtipo lumial A são positivos para receptores de estrogênio (RE) e/ou receptores de progesterona (RP) e negativos para receptores de crescimento epidermal humano do tipo 2 (HER2) com baixo índice de expressão de Ki-67 (**Figura 4**). São os mais prevalentes (cerca de 40%), com melhor prognóstico e baixa expressão de genes relacionados à proliferação em relação aos demais. Devido a essas características, tumores do subtipo lumial A tendem a ser tratados com terapia endócrina ao invés da quimioterapia convencional (SWAMINATHAN et al., 2023; SARHANGI et al., 2022).

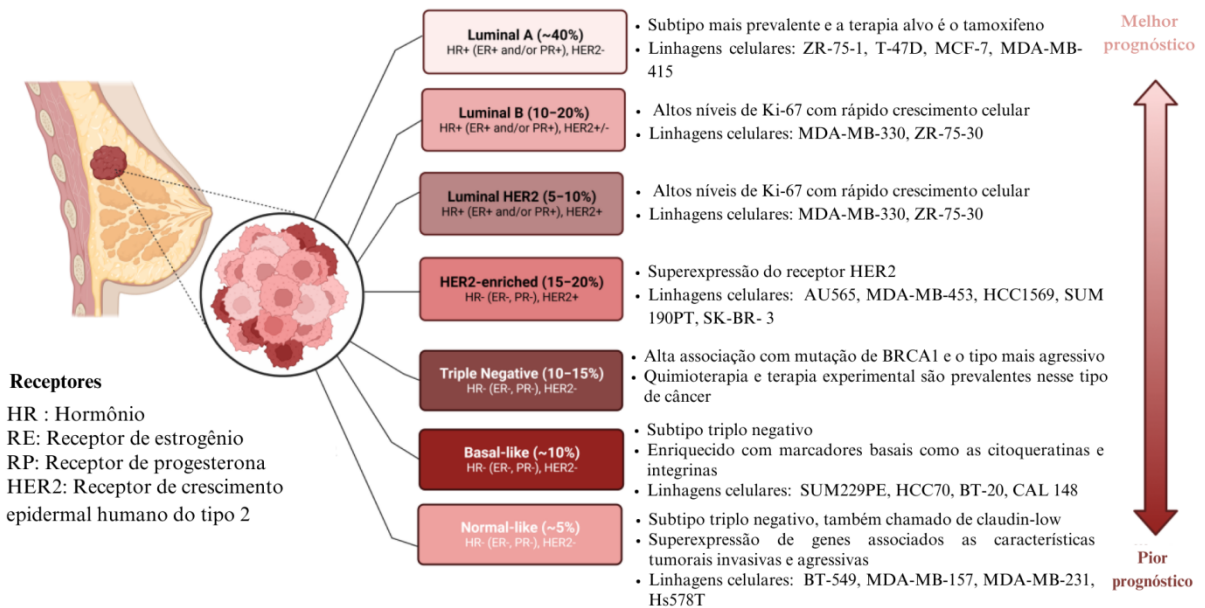


Figura 4. Os tipos de câncer de mama são agrupados por Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo-Negativo. Exemplos de linhagens celulares de câncer de mama, cujas características adicionais são mencionadas. Fonte: Adaptado de WITT & TOLLEFSBOL (2023).

A linhagem celular de câncer de mama MCF-7 (**Figura 5A**) compõe esse subgrupo e foi isolada na década de 1970, de uma paciente com derrame pleural metastático. Essas células têm sido utilizadas ao longo dos anos no modelo in vitro, pois mantiveram características ideais específicas do epitélio mamário, como o mecanismo de ação de estrogênio, na forma de estradiol, através de receptores de estrogênio (RE) no citoplasma celular (WITT & TOLLEFSBOL, 2023; DE LIMA FILHO et al., 2020; CAMARILLO et al., 2014).

O subtipo lumial B é menos prevalente que o lumial A e é caracterizado por um fenótipo agressivo e alto índice proliferativo com prognóstico relativamente pior. Ele é dividido em dois grupos, sendo as principais diferenças entre eles ser positivo ou não para HER2 e a expressão de Ki-67, que por vezes é alta e em outras é baixa (**Figura 4**) (SWAMINATHAN et al., 2023; SARHANGI et al., 2022). Indivíduos acometidos por esse subtipo costumam apresentar o diagnóstico com tumores em estágios mais avançados, com a presença de linfonodos positivos e candidatos à quimioterapia devido à alta expressão de genes relacionados à proliferação da doença (NETO et al., 2014; PROVENZANO et al., 2018).

Embora menos prevalente que os demais subtipos citados anteriormente, o câncer de mama triplo negativo (TNBC, do inglês *Triplo Negative Breast Cancer*) afeta 15 a 20% das mulheres com tumor de mama, porém, é o mais frequente entre os tumores invasivos. O termo TNBC é apenas operacional, pois esse grupo heterogêneo abrange diferentes tumores com diferentes perfis histológicos, genômicos e imunológicos, mas que compartilham a ausência da expressão dos receptores hormonais e HER2 (PERES et al., 2023; DERAKHSHAN & REIS-FILHO, 2022). Pacientes com câncer de mama triplo negativo possuem piores características clínicas como alta invasividade, alto potencial metastático, propensão à recidiva, mau prognóstico e limitação nas opções de abordagens terapêuticas, uma vez que não expressa os receptores hormonais e HER2 (YIN et al., 2020).

A linhagem celular MDA-MB-231 (**Figura 5B**) pertence ao câncer de mama triplo negativo. Logo, possui perfil mais agressivo, menos responsivos à terapia, pior prognóstico e menor taxa de sobrevida. A MDA-MB-231 tem a sua origem em 1973 e foi derivada de uma paciente branca de 51 anos, com adenocarcinoma mamário. Essas células são comumente utilizadas nos modelos experimentais devido suas características moleculares por não expressar receptores hormonais (RE e RP) e HER2 representando um bom modelo de câncer de mama invasivo (WITT & TOLLEFSBOL, 2023; YIN et al., 2020; LYONS, 2019).

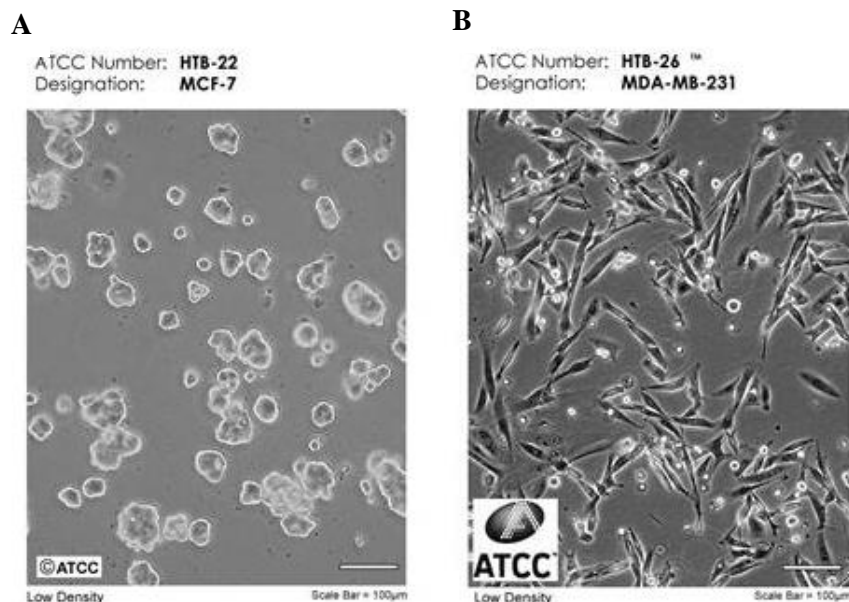


Figura 5. Imagem representativa das células de câncer de mama MCF-7 (A) e MDA-MB-231 (B). Fonte: ATCC, 2023a; ATCC, 2023b.

1.3 Tratamento do câncer de mama

Atualmente, existem inúmeras abordagens terapêuticas para o câncer de mama que contribuem para o aumento da sobrevivência de pacientes por meio dos avanços tecnológicos. As opções escolhidas para o tratamento são geralmente baseadas no estadiamento da doença, características biológicas do tumor e condições da paciente (MAUGHAN et al., 2010), as quais estão à cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica (BENDROR et al., 2022; FISUSI & AKALA, 2019).

A cirurgia faz parte do tratamento local usada historicamente como abordagem inicial para tumores diagnosticados em estágio inicial. Consiste na remoção física do tecido tumoral maligno a fim de proporcionar a cura completa. Todavia, algumas células cancerígenas podem permanecer no local da excisão podendo levar à formação de um novo tumor ou ativar células pré-malignas. A decisão entre uma mastectomia e uma cirurgia conservadora submete-se ao tamanho do tumor, da extensão das alterações radiológicas na mama, dos resultados estéticos esperados e da candidatura da paciente à radioterapia. Caso haja ocorrência de metástase, a localização e remoção dos tumores secundários tornam-se complexas. Nessas condições a cirurgia é frequentemente combinada com radioterapia ou quimioterapia para aumentar as chances de cura (BUYEL, 2018; BURSTEIN et al., 2021; MAUGHAN et al., 2010).

No que tange as terapias sistêmicas, tradicionalmente, a quimioterapia consiste na combinação de agentes quimioterápicos com melhores chances de eficácia do que o uso de um agente único. Embora eficazes, os quimioterápicos não são específicos para as células cancerígenas, atuando também nas células não tumorais e acarretam os efeitos colaterais deste tipo de tratamento, como náuseas, vômitos, alopecia e comprometimento do sistema imune (NAEEM et al., 2022).

Ademais, a resistência à quimioterapia constitui-se um obstáculo que limita o sucesso terapêutico, especialmente no contexto de câncer metastático, responsável por 90% das falhas no tratamento. Uma vez instaurada a resistência adquirida, as células tumorais não apenas alcançam tal tendência às drogas originalmente utilizadas para tratá-las, mas similarmente, podem tornar-se resistentes a outras drogas com distintos mecanismos de ação (LONGLEY & JOHNSTON, 2005). A saber, aumento do efluxo e diminuição do influxo de drogas, inativação, alteração de alvos, processamento de danos induzidos por drogas e evasão

da apoptose. Nesse cenário, os TNBCs têm maiores chances à quimiorresistência (LONGLEY & JOHNSTON, 2005; NEDELJKOVIĆ & DAMJANOVIĆ, 2019; MEHRAJ et al., 2021).

A quimioterapia, até meados dos anos 2000, era a única terapia sistêmica disponível para pacientes com TNBCs (DERAKHSHAN & REIS-FILHO, 2022). Mais recentemente, novos manejos de tratamento têm demonstrado notável interesse, como o uso de imunoterapia, inibidores de PARP (do inglês, *Poly ADP-ribose Polymerase*) e conjugados anticorpo-droga (PAULS et al., 2022). Contudo, a quimioterapia ainda é o principal regime terapêutico adotado para esse subtipo tumoral e inclui o uso combinado de taxanos (inibidores mitóticos) e antraciclina (intercalante de DNA) (KIM et al., 2018).

Liu e colaboradores (2018) em seu estudo com 60 pacientes com câncer de mama triplo negativo recebendo quimioterapia, observaram que as mesmas tiveram comprometimento cognitivo (tempo, lugar, memória, atenção, linguagem) mais grave em relação a pacientes sem esse subtipo tumoral. Enquanto Naito e colaboradores (2020), identificaram um pior grau de náuseas em menos de 24 horas induzido por quimioterapia em mulheres com câncer de mama.

Uma meta-síntese qualitativa que aborda sobre a alopecia induzida por quimioterapia revelou as percepções de imagem corporal por mulheres com essa doença. Os relatos descritos foram: vergonha, perda de confiança, constrangimento e demais sentimentos relacionados à imagem corporal negativa (KOCAN et al., 2023).

Diante do exposto acima, torna-se evidente a necessidade de novas estratégias de tratamento direcionadas ao câncer de mama potencialmente eficazes e com efeitos colaterais reduzidos ou ausentes.

1.4 Produtos naturais e câncer de mama

Sabe-se que as plantas são fontes naturais utilizadas como medicamentos ao longo dos anos devido a sua capacidade em produzir substâncias com propriedades farmacológicas para diversos fins, incluindo ação anticâncer. Historicamente, medicamentos derivados de plantas eram administrados por via oral, pelo consumo direto de tecidos vegetais ou pela preparação de extratos brutos, sendo todos os métodos considerados simples e baratos (BUYEL, 2018).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são considerados pequenas moléculas orgânicas que desempenham papel essencial para a sua proteção contra estresse ao ambiente (SECA & PINTO, 2018). Tais substâncias caracterizam-se por diversas estruturas e

atividades químicas, amplos por mecanismos de ação e baixa ocorrência de efeitos colaterais tóxicos (ZHU et al., 2022). Com isso, os produtos naturais e seus derivados surgem como potenciais agentes para o desenvolvimento de novos medicamentos. Contudo, a aplicação clínica desses produtos no câncer ainda é limitada pela baixa biodisponibilidade e estabilidade (ZHANG et al., 2024).

A **Figura 6** ilustra o tempo de descoberta e a principal fonte em que os produtos naturais foram extraídos (ZHANG et al., 2024). O paclitaxel, identificado em 1967, é um exemplo de medicamento isolado da *Taxus chinensis* utilizado, principalmente, no tratamento dos cânceres de ovário e mama. Tal quimioterápico é capaz de inibir a despolimerização da tubulina, estabilizar os microtúbulos do citoesqueleto e bloquear a mitose de maneira dose dependente (BUYEL, 2018).

A curcumina, um composto polifenólico isolado do rizoma da *Curcuma longa*, em 1815, é utilizada na medicina chinesa para tratar contusões e ferimentos, aftas e dor, além de ser usada também como pigmento natural na indústria alimentícia (ZHU et al., 2022). Seu efeito no câncer é atribuído à capacidade em inibir diferentes vias de sinalização envolvidas na formação e progressão tumoral. Estudos mostram que a curcumina pode atuar na inibição da expressão gênica de metaloproteinases de matriz (MMPs), visto que essas proteínas possuem papel crucial no crescimento e sobrevivência tumoral, angiogênese e metástase (BHATIA et al., 2021). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a curcumina em associação com o quimioterápico melfalano reduziu a viabilidade celular, inibiu a capacidade clonogênica, no ciclo celular reduziu a população de células na fase G0/G1 e induziu apoptose em células de câncer de mama MDA-MB-231 (PASSOS et al., 2023).

Schmidt e colaboradores (2020) trouxeram achados significativos sobre o efeito da curcumina e outros compostos bioativos (resveratrol e piperina) sobre células de câncer de mama MCF-7, dentre eles, a citotoxicidade associada à diminuição da atividade da glicoxalase 1 (GLO1) e do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Enquanto que, Costa e colaboradores (2022) identificaram os efeitos citotóxicos pró-oxidantes do resveratrol, um estilbeno, em células de carcinoma de mama humano (MCF-7). Tal composto inibiu a atividade da caseína quinase 2 (CK2), uma proteína cuja atividade anti-apoptótica impede a ativação de caspases e a ampliação de diferentes vias de sinalização de sobrevivência. Já a piperina possui efeitos no câncer de mama como indução da parada do ciclo celular e apoptose, redução dos fatores de transcrição como o NF- κ B e inibição do crescimento tumoral (QUIJIA & CHORILLI, 2022).

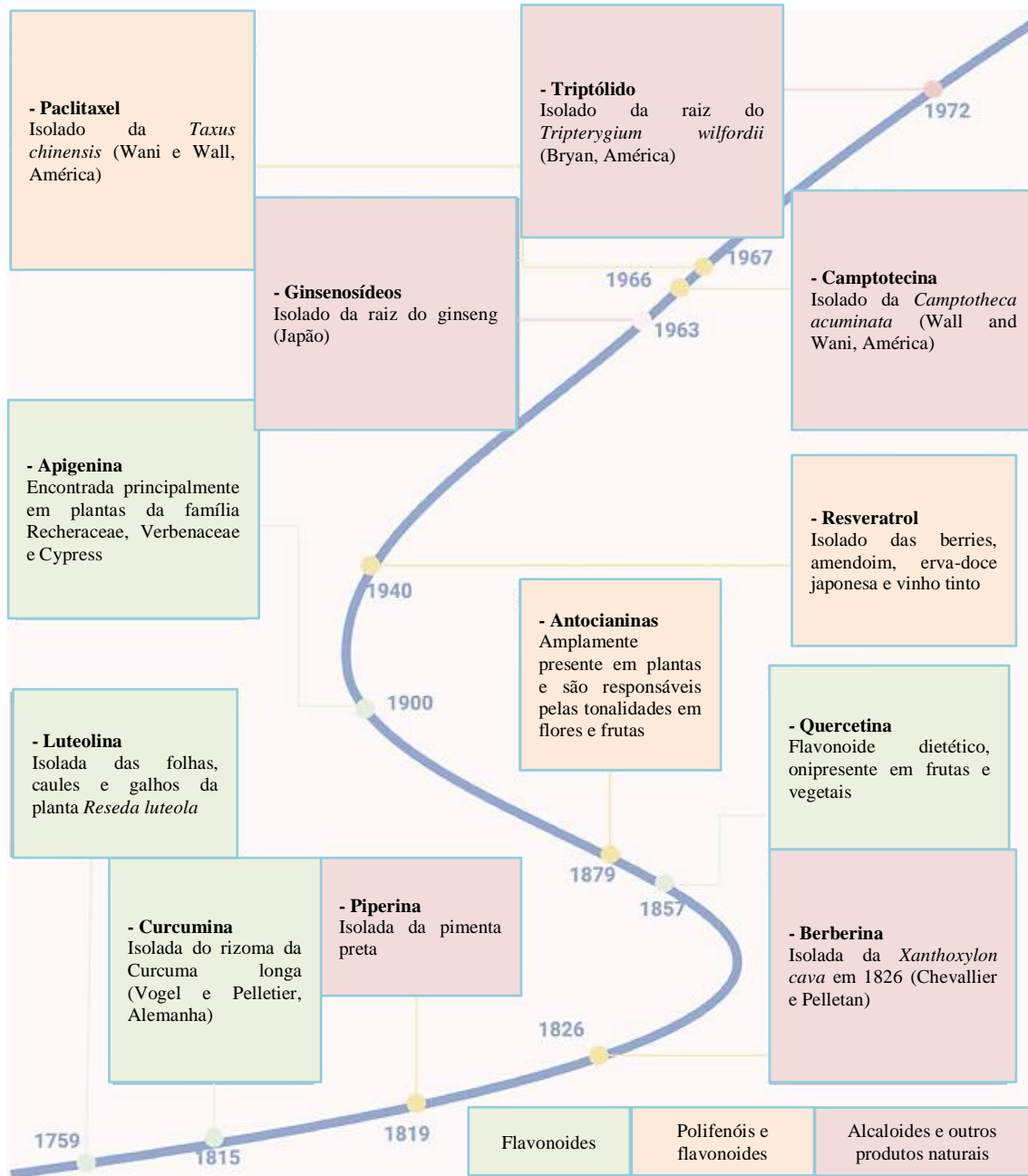


Figura 6. Linha do tempo de descoberta e extração de produtos naturais representativos, como flavonoides, polifenóis e alcaloides. Fonte: Adaptado de ZHANG et al., 2024.

Outros estudos têm demonstrado efeitos promissores de metabólitos secundários isolados de plantas para o tratamento do câncer. Shati e colaboradores (2020) mostraram que quatro extratos de diferentes solventes, como: metanol, hexano, clorofórmio e acetato de etila, das folhas de *Saussurea costus*, exerceram atividade *in vitro* como efeito citotóxico, parada do ciclo celular e morte celular em linhagens celulares de câncer, incluindo a de mama, MCF-7.

A apigenina é um flavonoide encontrado em plantas, como *Camelia sinensis* (chá verde), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Origanum vulgare* (orégano), dentre outras (HOSTETLER et al., 2017). Um estudo demonstrou que esse flavonoide exerceu atividades anticancerígenas em células de câncer de mama ao impedir a progressão do ciclo celular pela redução de ciclinas-chaves e CDK1, dificultando a invasão celular e interrompendo as vias de sinalização da IL-6 nas células MDA-MB-231 (IMRAN et al., 2020). A apigenina também propiciou a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), apoptose e parada na fase G2/M do ciclo celular em células MCF-7 por meio da ativação de p53 e da cascata de caspases (SHENDGE et al., 2021).

Demais trabalhos avaliaram o efeito sinérgico entre substâncias isoladas de plantas e quimioterápicos potencializando a eficácia anticancerígena destes e efeito promissor contra a quimiorresistência em células de tumor mamário, além de proteção contra efeitos adversos induzidos por esses quimioterápicos in vivo (ZHONG et al., 2017; ABDEL-SATTAR et al., 2023, BOGHDADY, 2013, FOTSING et al., 2023).

Portanto, por serem fontes de substâncias com potencial atividade antitumoral, melhores chances de distribuição, metabolismo e excreção e menor toxicidade, os metabólitos isolados de plantas constituem-se novas possibilidades para o desenvolvimento de novas classes terapêuticas (SECA & PINTO, 2018). Ressalta-se que mesmo que extratos brutos ou metabólitos isolados de plantas apresentem potenciais efeitos anticancerígenos, ambos precisam ser testados quanto à segurança e eficácia, pois podem ocorrer efeitos indesejáveis como toxicidade (BUYEL, 2018).

Devido à eficácia de produtos naturais como potenciais agentes anticancerígenos, há um crescente avanço de ensaios clínicos que investigam o uso desses compostos no câncer (DAN et al., 2024). Laidlaw e colaboradores (2010) observaram que uma combinação encapsulada contendo indol-3 carbinol (lignano dietético) e lignana derivada da árvore de abeto norueguês, 7-hidroxiatairesinol (lignana HMR) em mulheres na pré e pós menopausa, aumentou significativamente a hidroxilação C-2 do estrogênio. Isso pode constituir um mecanismo para a redução do risco de câncer de mama, bem como o risco de outros cânceres relacionados ao estrogênio.

Mais recentemente, um estudo revisou de forma sistemática os ensaios clínicos sobre o efeito anticancerígeno de monômeros medicinais isolados de ervas chinesas. Noventa e oito ensaios clínicos antitumorais disponibilizaram seus resultados e, dentre eles, 41 foram relacionados à vimblastina. Essa substância é comumente utilizada no tratamento de tumores, incluindo o de mama e em combinação com outros medicamentos. De 10 ensaios clínicos que

avaliaram a taxa de sobrevivência livre de progressão como resultado primário, 4 não mostraram resultados precisos e dos 6 restante, um mostrou que os pacientes com melanoma metastático que receberam um regime quimioterápico de baixa dosagem que incluía vimblastina tiveram uma sobrevida média livre de progressão de 3 semanas (DAN et al., 2024).

Dessa forma, os produtos naturais ou seus derivados têm seu uso em constante progressão na condução de ensaios clínicos. Essas descobertas oferecem uma compreensão valiosa para determinar o potencial como terapia do câncer para o desenvolvimento de medicamentos a base de produtos naturais (DOMINGO-FERNÁNDEZ et al., 2024).

1.5 Mata Atlântica e Projeto Biota

O Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo e uma rica diversidade vegetal, representando mais de 46 mil espécies. Essa variedade está relacionada à vasta extensão territorial, clima, solo e geomorfologia, acarretando diferentes tipos de biomas, dentre eles, a Mata Atlântica (BRASIL, 2024). Inclusive, este bioma estende-se por todo território brasileiro e ocupa o segundo lugar em número de plantas coletadas e citações em artigos publicados de 2016 a 2020 (**Figura 7**) (BRASIL, 2024, DE QUEIROZ et al., 2023).

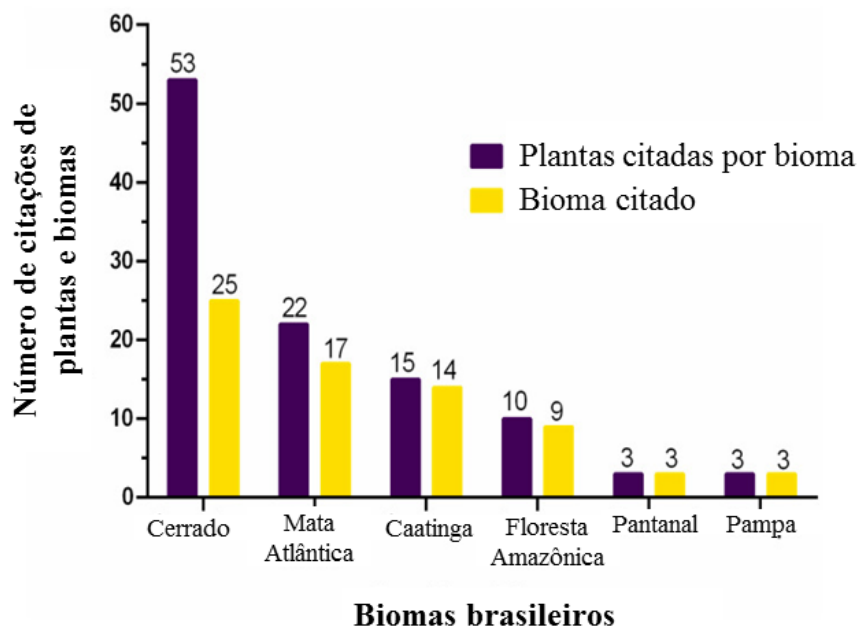


Figura 7. Número de plantas citadas por bioma e artigos que citam cada bioma. Fonte: adaptado de DE QUEIROZ et al., 2023.

No entanto, devido à especulação imobiliária, expansão agropecuária, queimadas, extrativismo e outros, atualmente restam apenas 29% de sua cobertura original, ameaçando as espécies vegetais. O Estado do Rio de Janeiro está integralmente inserido no bioma de Mata Atlântica e é um dos estados brasileiros com maior biodiversidade, sendo necessária a realização de estudos para registrar este bioma (BRASIL, 2024, COELHO et al., 2017)).

Muitas espécies vegetais desapareceram ao longo do tempo sem terem sido registradas. Consequentemente, informações importantes sobre a ecologia e farmacologia botânica, por exemplo, foram perdidas. Logo, são necessárias pesquisas sobre o conhecimento local a fim de fornecer informações sobre a conservação e uso desses recursos naturais (GAZZANEO et al., 2005). A Mata Atlântica encontra-se em situação de perigo e necessita de mais informações sobre as espécies vegetais e muitas possuem uso medicinal pela população local (TRIBESS et al., 2015).

Assim, o projeto I-FLORA (BIOTA-RIO), de natureza interdisciplinar, conta com a participação de docentes da Universidade Federal do Rio de Janeiro e da Universidade Federal Fluminense, além de pesquisadores do Jardim Botânico e Fundação Osvaldo Cruz. Cujo objetivo é inventariar a flora fluminense e agregar valor à sua biodiversidade através de estudos químicos e biológicos. O conhecimento do potencial biológico e da diversidade de espécies que estão presentes na Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, possibilita uma melhor forma de proteger este patrimônio brasileiro (I-FLORA, 2023).

Desse modo, após a coleta de mais de 1000 espécies botânicas do bioma de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, estas deram origem a uma extratoteca com mais de 2000 extratos de plantas. Posteriormente, esses extratos foram enviados para diversos laboratórios, dentre os quais o Laboratório de Alimentos Funcionais/UFRJ, para a realização de experimentos com linhagens celulares de câncer de mama, a fim de investigar o potencial biológico das espécies.

1.6 Ordem Malpighiales

Malpighiales é uma das maiores ordens de plantas com flores, constituídas por aproximadamente 40 famílias com mais de 16.000 espécies, em sua grande maioria tropicais com ampla diversidade morfológica e ecológica (ENDRESS et al., 2013, CAI et al., 2019).

Nessa ordem, cinco famílias (Bonnetiaceae, Calophyllaceae, Clusiaceae, Hypericaceae e Podostemaceae) integram o clado Clusoide com um total de 94 gêneros e aproximadamente 1900 espécies (RUHFEL et al., 2011).

Dessas, muitas são economicamente importantes, como frutas tropicais, incluindo o mangostão (*Garcinia mangostana* L.) e a maçã mammey (*Mammea americana* L.), madeira (*Calophyllum brasiliense* Cambess. *Mesua ferrea* L.) e medicamentos (*Hypericum perforatum* L.) (RUHFEL et al., 2011, JIN et al., 2020).

A espécie *Hypericum perforatum* L. pertencente à família Hypericaceae, é conhecida popularmente como erva-de-são-joão e utilizada em diferentes sistemas de medicina tradicional. Seus principais fitoquímicos, hiperforina e hipericina, exercem diversas atividades biológicas, principalmente como agentes antidepressivos, cicatrizantes e antibacterianos; embora popular, é preciso cautela com a sua administração (NOBAKHT et al., 2022).

Outra espécie que possui propriedades medicinais descritas na literatura científica é a *Garcinia mangostana* L. Esta árvore tropical nativa do Sudeste Asiático é conhecida como mangostão e seus frutos possuem um sabor distinto e agradável que lhe deu o título de “rainha das frutas” (OVALLE-MAGALLANES et al., 2017). Quanto ao uso popular, inicialmente eram feitas infusões das cascas da *G. mangostana* L. para tratar infecções do trato gastrointestinal e urinário, contudo, atualmente os derivados de suas frutas são utilizados especialmente por pessoas com doenças metabólicas e câncer. As xantonas presentes nessa planta pertencem a classe de metabólitos secundários e estão envolvidas com os efeitos biológicos (MASULLO et al., 2022).

DOI e colaboradores (2009) observaram que a panaxantona, isolada do pericarpo do mangostão (*Garcinia mangostana* L.), foi capaz de reduzir o crescimento do tumor de mama primário e metástases em camundongos BALB/c singênicos. Os principais mecanismos envolvidos foram indução de apoptose, inibição da síntese de DNA, parada do ciclo celular e redução da angiogênese. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a panaxantona pode ser útil na quimioprevenção e na terapia adjuvante no câncer de mama.

Muitos membros do clado Clusóide são considerados intimamente relacionados (RUHFEL et al., 2011), como por exemplo, Clusiaceae e Bonnetiaceae, principalmente pela anatomia floral de suas plantas e por terem xantonas como seus constituintes naturais (CARVALHO et al., 2013; MARINHO, 2022; ALAM & KHAN, 2014).

1.7 Família Clusiaceae

As Clusiaceae são caracterizadas por plantas angiosperma com crescimento em forma de árvores ou arbusto predominantes nas áreas de restinga adaptadas para tolerar condições adversas no ambiente (altas temperaturas, ventos constantes, carência de nutrientes, entre outros). A família está inserida no clado Clusoide (Malpighiales) formando um grupo irmão com a Bonnetiaceae (**Figura 8**) (ALENCAR et al., 2023) e existem em torno de 40 gêneros que são utilizadas para diversos fins, dentre eles: ornamentação, produção de lenha e na medicina tradicional (HERBERT & RODRÍGUEZ, 2021).

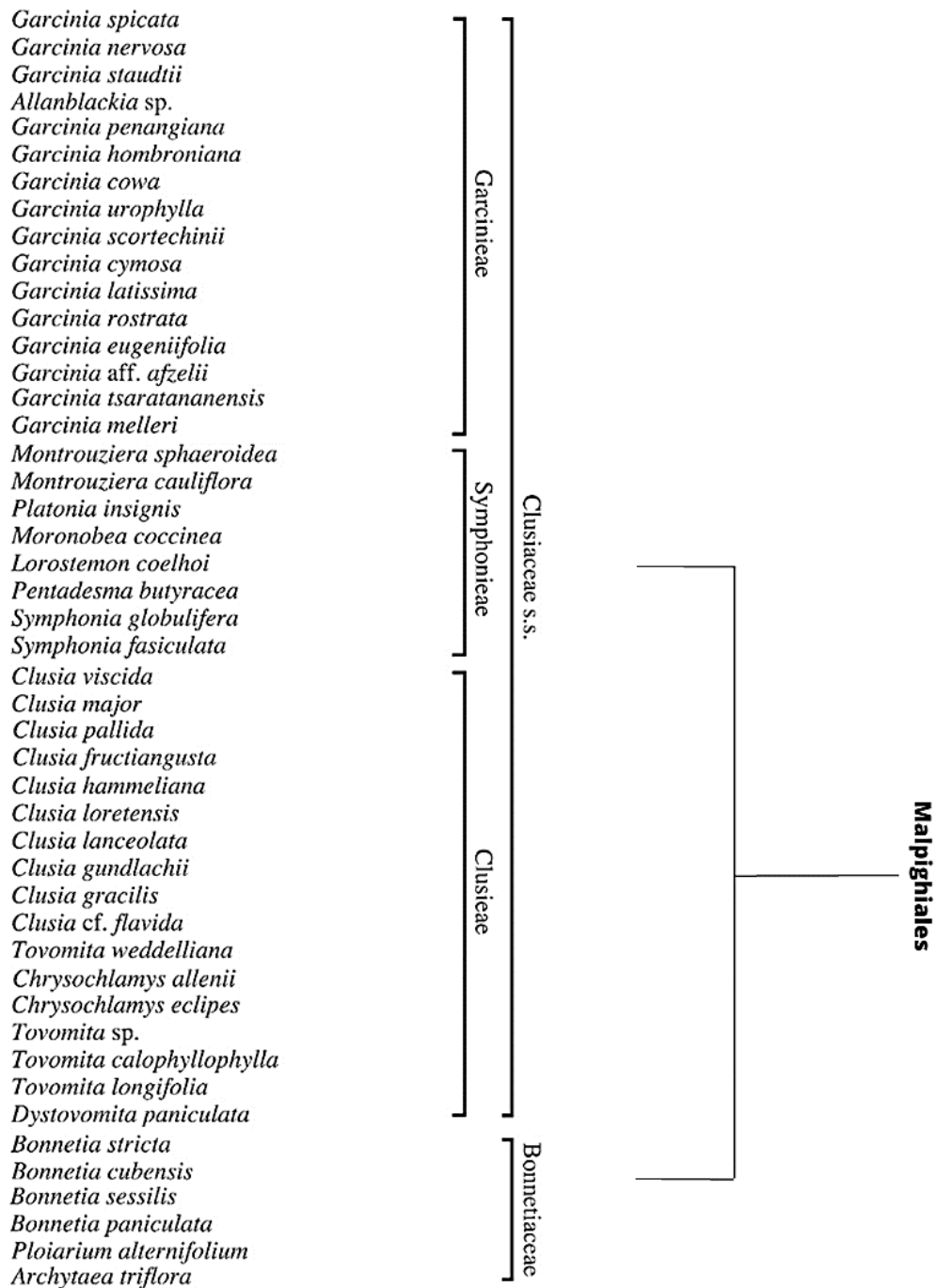


Figura 8. Recorte da árvore filogenética do clado Clusoide (Malpighiales). Fonte: RUHFEL et al., 2011.

A *Platonia insignis* Mart (Clusiaceae) é uma árvore frutífera nativa do Brasil chamada por “bacurizeiro”. A polpa de bacuri vem despertando a atenção dos *chefs* devido ao sabor especial dos seus frutos, por sua composição nutricional rica em lipídios e fibra alimentar total (PARAENSE et al., 2020).

O gênero *Clusia* é um dos maiores das Clusiaceae e pode ser encontrado em regiões tropicais com cerca de 250 a 300 espécies, das quais 67 encontram-se no Brasil (DE ALCANTARA GUIMARÃES et al., 2013). Muitas destas possuem aplicação na medicina tradicional para o tratamento de problemas gastrointestinais e renais, cefaleia e como agentes analgésicos (ANHOLETI et al., 2015).

A *Clusia lanceolata* Cambess (**Figura 9**), conhecida popularmente como “cebola-da-mata” é uma espécie nativa da Mata Atlântica endêmica nas restingas fluminenses e distribuída, principalmente, no Sudeste do Brasil. O látex produzido pode ser utilizado como cicatrizante de feridas e analgésico, no tratamento de doenças da pele e reumatismo, e a resina floral apresenta atividade antimicrobiana (BRASIL, 2023).



Figura 9. Imagens da *Clusia lanceolata* Cambess. Fonte: BRASIL, 2023.

Ferreira e colaboradores (2014) identificaram a presença de flavonas incluindo orientina, isorientina, vitexina-2''-O-ramnosídeo e isovitexina-2''-O-ramnosídeo em folhas de *Clusia lanceolata* por dados de LC-DAD e LC-ESI-MS/MS. Um outro trabalho desse mesmo grupo, observou a presença de 14 compostos da *Clusia lanceolata* incluindo seis flavonas, vitexina, isovitexina, isovitexina-2''-O- α -L-ramnopiranosídeo, vitexina-2''-O- α -L-ramnopiranosídeo, orientina e isorientina, duas feofitinas, dois triterpenos, α - e β -amirina, e

quatro esteróides, β -sitosterol, estigmasterol, sitosterona e estigmasterona (FERREIRA et al., 2016). De Alcantara Guimarães e colaboradores (2013) encontram hidrocarbonetos sesquiterpênicos (90-93%), sendo o β -cariofileno o composto majoritário no óleo essencial obtido das folhas da *C. lanceolata*.

Chowjarean & Sadabpod (2021) demonstraram que a isovitexina possui ação antineoplásica na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 pela redução da proliferação celular e formação de colônias. Além disso, Shailaja e colaboradores (2019) descreveram que a feofitina induz apoptose e reduz o potencial de membrana mitocondrial de células de adenocarcinoma humano A549.

O β -cariofileno exibe propriedades antiproliferativas em células de câncer de mama. Acredita-se que tal efeito seja atribuído a capacidade do β -cariofileno em interferir na assinatura lipídica modulada pela hipóxia, acarretando prejuízos para a biossíntese ou composição da membrana, ambas essenciais para a replicação celular (FROST et al., 2023). Outro estudo demonstrou que a combinação do óxido β -cariofileno atuou de forma sinérgica com a doxorrubicina aumentando o seu efeito antiproliferativo na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 (HANUŠOVÁ et al., 2017). Também foi identificado que β -cariofileno inibiu a proliferação e migração celular e uma redução notável no tamanho do tumor de maneira dose dependente em camundongos xenoinxertados com células de carcinoma colorretal (HCT 116) (DAHAM et al., 2021).

1.8 Família Bonnetiaceae

A família Bonnetiaceae é composta por aproximadamente 33 espécies de árvores e arbustos (em ambientes de restinga) e três gêneros. A *Bonnetia stricta* (Ness) Ness & Mart. (**Figura 10**) chamada popularmente de “falsa camélia” ou “abaneiro roxo” é a única espécie de Bonnetiaceae no leste do Brasil onde ocorre nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Sergipe (CARVALHO et al., 2013, MARINHO, 2022).



Figura 10. Imagens da *Bonnetia stricta* – **a.** ramo com botões florais em vista frontal; **b.** botão floral em vista lateral; **c.** flor na antese; **d.** detalhe dos estames e gineceu. (a. e c. de Geovane Siqueira, de Siqueira 994 ; b. e d. de Lucas C. Marinho, de plantas não comprovadas da Bahia). Fonte: MARINHO, 2022.

Embora até o momento não tenha sido encontrado publicações sobre a atividade biológica da *B. stricta*, Carvalho e colaboradores (2013) relataram pela primeira vez xantonas (C-glicosilxantona mangiferina) e antraquinonas, derivadas de emodina, isoladas das folhas dessa planta que os levou a sugerir essa classe de metabólitos como possíveis novos marcadores quimiotaxonômicos de Bonnetiaceae.

A mangiferina é uma C-glicosilxantona purificada de origem vegetal e apresenta atividade anticâncer. Shi e colaboradores (2016) mostraram que a mangiferina foi capaz de inibir a proliferação celular, induzir apoptose por meio da regulação negativa da atividade do fator nuclear kappa B (NF- κ B) em células de pulmão A549 e diminuir significativamente o volume e peso da massa tumoral em camundongos xenoenxertados.

A emodina é um derivado natural da antraquinona que possui atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas e antitumorais significativas (ZHU et al., 2022). Na literatura científica existem diversas publicações relatando os efeitos dessa substância, como por exemplo, efeitos citotóxicos contra uma variedade de linhagens de células

cancerosas, incluindo de mama (MDA-MB- 231) e considerável atividade antitumoral in vivo em vários modelos animais (SEMWAL et al., 2021).

Liu e colaboradores (2020) demonstraram que a emodina possui potencial de desenvolvimento clínico por interromper a recorrência metastática pós-cirurgia do câncer de mama nos pulmões e inibir o crescimento do tumor de mama em camundongos. Outros efeitos como atenuação da metástase de hepática do câncer de mama por meio da inibição das vias de sinalização AKT e ERK ao interagir com a proteína quinase CK2 alfa (CK2 α) também foram conferidos pela emodina (LI et al., 2023a).

Logo, diversas plantas das famílias da ordem Malpighiales têm mostrado atividades farmacológicas significativas em diferentes doenças, como o câncer. Isso ocorre por meio dos fitoquímicos produzidos por essas plantas, que uma vez isolados, são capazes de atuar em diferentes mecanismos elucidados em ensaios in vitro e in vivo como potenciais alvos terapêuticos.

Com isso, torna-se relevante elucidar os efeitos dos extratos das espécies *Bonnetia stricta* (Bonnetiaceae) e *Clusia lanceolata* (Clusiaceae) sobre células de câncer de mama, contribuindo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, possivelmente mais eficientes e com efeitos colaterais reduzidos ou ausentes.

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo o câncer de mama o mais incidente entre as mulheres. Mesmo com os avanços no tratamento dessa doença, a quimioresistência e os efeitos colaterais são obstáculos para o sucesso da terapia sistêmica. Neste sentido, as plantas possuem fitoquímicos que apresentam propriedades farmacológicas, incluindo a ação anticâncer. O bioma da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro possui uma ampla biodiversidade vegetal no Brasil, sendo uma importante fonte de obtenção de novas substâncias, que podem ser utilizadas no câncer de mama. Deste modo, as espécies *Clusia lanceolata* Cambess e *Bonnetia stricta* (Ness) Ness & Mart pertencentes à ordem Malpighiales e endêmicas na Mata Atlântica, são potenciais fontes de compostos fenólicos, xantonas e antraquinonas, no entanto, até a elaboração desta dissertação, não foram encontrados relatos na literatura sobre a atividade biológica dessas espécies. Sendo assim, investigar os efeitos dos extratos dessas espécies, no modelo in vitro do câncer de mama

humano, poderá contribuir para novas possibilidades de desenvolvimento de drogas e futuros ensaios experimentais e clínicos para esse tipo de câncer, além de agregar valor às espécies pelo conhecimento do potencial biológico adquirido.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

- Investigar o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Clusia lanceolata* (EHFCl) e dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBs) nas linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar da composição química do EHFCl e do EHFBs através da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS).
- Avaliar in vitro os possíveis efeitos citotóxicos do EHFCl e EHFBs nas linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-7;
- Calcular os IC₅₀ dos extratos;
- Investigar as possíveis alterações no ciclo celular;
- Determinar os tipos de morte celular;
- Realizar outras análises biológicas que possam contribuir para elucidar a ação das substâncias testadas como: ensaio de migração celular, análise morfológica e produção de espécies reativas de oxigênio;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O material vegetal foi obtido da extratoteca de plantas coletadas do bioma da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro do projeto I-FLORA (BIOTA-RIO), fornecido pelo

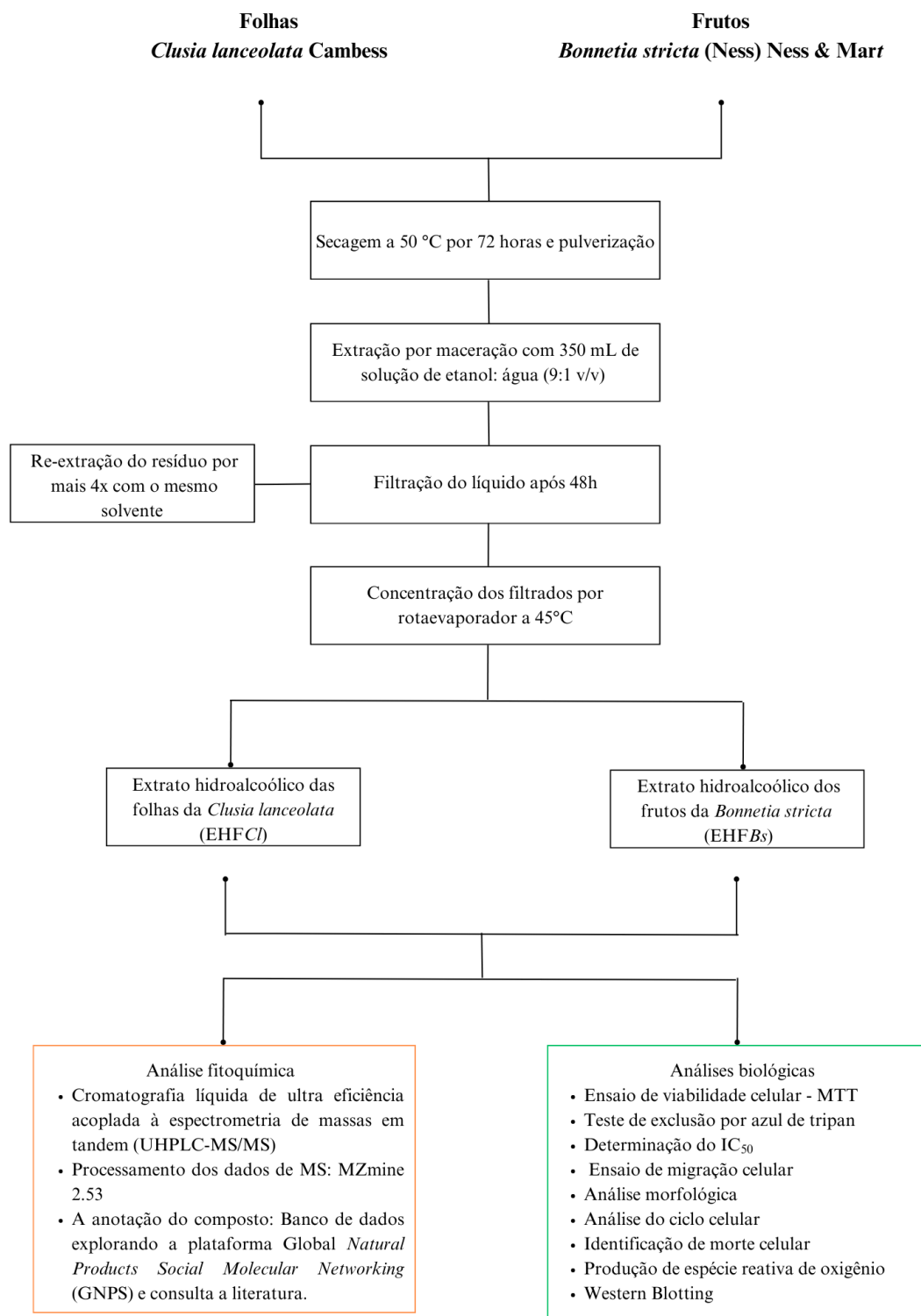
Instituto de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob coordenação da professora Lidilhone Hamerski Carbonezi.

As folhas da *Clusia lanceolata* foram coletadas no Parque Natural Municipal de Montanhas de Teresópolis, Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil, no dia 29 de abril de 2010. O espécime vegetal foi identificado pela Dra. Thaína C. Prado, da Universidade Federal Fluminense e depositado no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob número RB 592230 (**Anexo A**).

Os frutos verdes da *Bonnetia stricta* foram coletados no Parque Nacional de Jurubatiba no município de Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil, no dia 23 de novembro de 2013. O espécime vegetal foi identificado pela Dra. Adriana Lobão, da Universidade Federal Fluminense e depositado no Herbário de Niterói, sob número NIT 10717 (**Anexo B**).

4.2 Obtenção dos extratos

Conforme representado no **Fluxograma 1**, as folhas e os frutos da *Clusia lanceolata* e *Bonnetia stricta*, respectivamente, foram secos a 50 °C por 72 horas e pulverizados em moinho de facas. As extrações ocorreram por maceração com 350 mL de solução de etanol:água na proporção 9:1 (v/v) em temperatura ambiente. Após 48 horas, o líquido foi removido e filtrado. Em seguida, o resíduo foi re-extraído mais quatro vezes, com o mesmo solvente e tempo de maceração de 24 horas. Os filtrados foram então agrupados em rotaevaporador a 45 °C. Posteriormente, foi feita uma diluição do concentrado em DMSO 100% (1 mL para cada 20 mg de material vegetal) e em seguida, os extratos foram sonicados por 15 minutos ou mais para completa homogeneização. Os extratos hidroalcoólicos obtidos foram armazenados a -18 °C até o uso.



Fluxograma 1. Fluxograma de obtenção dos extratos hidroalcoólicos das folhas da *Clusia lanceolata* (EHFCl) e frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBs) e análises fitoquímicas e biológicas.

4.3 Preparo das amostras e análises por LC-MS/MS

Para o preparo das amostras 2 mg de cada extrato foram solubilizados em metanol e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. Após essa etapa o sobrenadante foi pipetado para vial e injetado no cromatógrafo. A análise de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS) foi realizada usando um sistema UHPLC Dionex™ UltiMate™ 3000, acoplado a um LCQ Fleet (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) composto por um forno, um desgaseificador de solvente, uma bomba de ultra-alta pressão, um amostrador automático, um detector de arranjo de diodos (DAD) e um gerenciador de temperatura da coluna. Uma coluna de fase reversa SHIM-PACK HR-ODS 18 (2,1 × 100 mm, 3 μm,) foi usada a uma vazão de 0,45 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e as fases móveis foram 0,1% de ácido fórmico em água para A e acetonitrila para B. O modo de eluição gradiente foi o seguinte: 5% de B em 0–5 min, 5–100% em 5–25 min, 100% em 25–30 min, 100–5% em 30–31 min e 5% B em 31–36 min. O espectrômetro de massas (MS), equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) e um analisador de armadilha de íons (com resolução 1.000), foi operado nos modos de ionização positivo e negativo. Nitrogênio de alta pureza (N₂) foi usado como gás de bainha (20 unidades arbitrárias) e gás auxiliar (10 unidades arbitrárias). Hélio de alta pureza (He) foi usado como gás de colisão. Foram realizadas aquisição de dados de varredura completa (faixa de massa: m/z 100–1000) e aquisição dependente de dados (DDA) (topN = 3). A energia de colisão normalizada da célula de dissociação induzida por colisão (CID) foi fixada em 35 eV (MENDONÇA et al., 2021).

4.4 Parâmetros MZmine 2.53

Os arquivos ThermoScientific.raw foram convertidos para o formato universal.mzML usando MSConvert, parte do pacote ProteoWizard (KESSNER et al., 2008) e processado diretamente no MZmine 2 (versão 2.53) (PLUSKAL et al., 2010; KATAJAMAA et al., 2006). A detecção de massa foi realizada mantendo o nível de ruído em $1.5E^0$. A construção do cromatograma foi alcançada usando intensidade mínima de $1.5E^2$ e tolerância m/z de 0,5 (ou 1000 ppm). O algoritmo de desconvolução *local minimum search* foi utilizado com as seguintes configurações: limiar cromatográfico = 10.0%, intervalo mínimo de tempo de retenção = 1 min, intervalo relativo mínimo altura = 5%, altura absoluta mínima = $1.5E^2$,

proporção mínima de pico superior/borda = 1, intervalo de duração do pico = 0.1–2 min. Os cromatogramas foram deisotopados usando o algoritmo *isotopic peaks grouper* com uma tolerância m/z de 0.5 (ou 1000 ppm) e uma tolerância de tempo de retenção (RT) de 0.5 min. O alinhamento de pico foi realizado usando o método *Join aligner* com tolerância m/z de 0.5 (ou 1000 ppm), peso para $m/z = 3$, tolerância RT = 0,5 min, peso para RT = 1. A lista de picos (*peak list*) foi eventualmente preenchida com o módulo localizador de pico (gap-filled): tolerância de intensidade de 10%, tolerância m/z de 0,5 (ou 1000 ppm) e tolerância absoluta de RT de 0.5 min). A anotação do composto foi feita por comparação com uma pesquisa de banco de dados explorando a plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) e consulta a literatura.

4.5 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico. Dimetilsulfóxido (DMSO), iodeto de propídio (PI), RNase A e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) foram obtidos comercialmente pela empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os antibióticos penicilina/estreptomicina pela empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA); Meio DMEM, DMEM F-12 e soro fetal bovino (SFB) pela empresa Gibco (EUA); Azul de Trypan e corante cristal de violeta pela empresa VETEC (Brasil); Kit de detecção de apoptose da empresa eBioscience. Anticorpos Ciclina A (#4656), Ciclina B1 (#4138), Ciclina E2 (#4132), CDK2 (#2546S), p-CDK2 (#2561S), CDK7 (#2916), CDC25A (#3652), Pró-caspase 3 (sc-56053) e Pró-caspase 9 (sc-56076) pela empresa *Cell Signaling Technology* (CST, EUA) e MMP-2 (sc-13595) pela empresa Santa Cruz (CA, EUA) e o anticorpo secundário HRP pela empresa Thermo Fisher (Waltham, MA, EUA).

4.6 Linhagens celulares

As linhagens de células epiteliais de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*). As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. Todas as linhagens foram mantidas em estufa a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 5 % de CO₂.

4.7 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT adaptado de Mosmann (1983). Inicialmente, as linhagens de células MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 24 poços (5×10^4) e após alcançarem 70-80% de confluência, as células foram tratadas com diferentes concentrações (25, 50, 75, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) do EHFBS, EHFCl ou DMSO a 1% (controle), no período de 24 e 48 horas. Após o tratamento, o meio foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 500 μL de solução MTT (0,5 mg/mL) solubilizada em PBS em cada poço. As placas foram mantidas na estufa a 37 °C por 3 horas. Após o período de incubação, a solução de MTT foi retirada e 500 μL de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazan formados. Posteriormente, a leitura foi realizada em um leitor de microplacas (Loccus LMR-96) em absorbância de 595 nm. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle não tratado (MOSMANN, 1983).

4.8 Determinação do IC₅₀

A determinação do IC₅₀ (concentração do extrato que inibe o crescimento das linhagens celulares em 50%) foi realizada a partir de uma curva de concentração do EHFBS e do EHFCl do experimento de viabilidade celular. Os valores foram calculados utilizando a curva de regressão sigmoidal do *software GraphPad Prism 5.0*.

4.9 Teste de exclusão por Azul de Tripán

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços (5×10^4) e após alcançarem 70-80% de confluência foram incubadas durante 24 e 48 horas com 25, 50, 75, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ do EHFBS. Posteriormente, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS a 37 °C. Após, foi adicionado o corante azul de Tripán nos poços contendo PBS com um tempo de reação de 15 minutos. Depois disto, foi feita a contagem estimada de células viáveis (incolor) e não viáveis (azul) com o auxílio de um microscópio invertido. Foram realizados três experimentos em triplicata e os resultados obtidos expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle não tratado (FERREIRA et al., 2014).

4.10 Ensaio de migração celular

Em placas de 6 poços, as células foram plaqueadas (1×10^6) com um volume final de 2000 μL . Ao atingirem 85-95 % de confluência, com o auxílio de uma ponteira (200 μL) foi feita uma lesão de cima para baixo na monocamada de células formando uma fenda. Os detritos foram removidos e a borda da lesão foi suavizada lavando as células com meio de cultura. Posteriormente, as células foram tratadas com os valores de IC_{50} do EHFBS. Após os tratamentos, a migração celular foi avaliada em diferentes tempos com auxílio de um microscópio óptico invertido Nikon Eclipse TS100 e fotografadas com câmera digital BIO-HDMI MYLABOR. As medidas de migração foram determinadas por análise utilizando o *software Image J* (adaptado de LIANG et al., 2007).

4.11 Análise morfológica

As células foram plaqueadas em placa de 24 poços (10^5) em volume final de 500 μL . Ao atingirem 80% de confluência as células foram tratadas com os IC_{50} do EHFBS por 24 e 48 horas. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol 100 % durante 1 min. Após a fixação, os poços foram corados com corante Giemsa por 10 min, e posteriormente os poços foram lavados com fluxo contínuo de água destilada. A morfologia celular foi avaliada com auxílio de um microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100) e fotografadas com câmera digital BIO-HDMI MYLABOR (adaptado de TOLOSA et al., 2003).

4.12 Análise do ciclo celular

As diferentes linhagens de células de câncer de mama foram incubadas na presença ou ausência do EHFBS com seus respectivos valores de IC_{50} por 24 e 48 horas. Após o período de tratamento, 5×10^5 células foram coletadas, lavadas e fixadas (30 % PBS/70 % metanol) por 1 h a 4°C e incubadas em PBS contendo 0,1 % de Triton X-100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídio e 1 mg/mL de RNase A. Após 30 minutos de incubação a 37°C no escuro, 10.000 eventos foram coletados em FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados com o *software Cellquest*, onde o percentual de células em cada fase do ciclo celular foi quantificado (FERREIRA et al., 2014; POZO-GUISADO et al., 2002).

4.13 Identificação de morte celular

A caracterização de morte celular foi investigada pela marcação com iodeto de propídio (PI) e Anexina-V (adaptado de PASSOS et al., 2015). As células foram plaqueadas em placas de 6 poços e, posteriormente foi realizado o tratamento com os respectivos IC₅₀ do EHFBS durante 24 e 48 horas. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 2.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, e posteriormente foram incubadas com tampão de Anexina-V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,2 mM CaCl₂, pH 7,4). Em seguida, as células foram incubadas com Anexina-V FITC e PI durante 30 minutos na ausência de luz a 20 °C. Os resultados foram obtidos utilizando citômetro FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados utilizando o *software CellQuest*.

4.14 Produção de espécies reativas de oxigênio

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 6 poços em volume final de 2000 µL. Após atingirem 70-80% de confluência, as células foram tratadas com os valores de IC₅₀ de EHFBS por 3 horas. Posteriormente, as células foram coletadas, lavadas com PBS e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, foram ressuspensas em solução de 10 µM da sonda 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) por 30 minutos, no escuro a 37 °C. Os resultados foram obtidos utilizando um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados utilizando o programa *CellQuest* (OMATA et al., 2006).

4.15 Preparo do extrato proteico celular

Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e lisadas com nitrogênio líquido. Antes do descongelamento, o tampão de lise contendo 5 mM de Tris-HCl pH 7,4, 10 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), coquetel de inibidores de proteases (aprotinina A, leupeptina, bestatina, pepstatina A e E-64) em concentração final de 1 mM, 1 mM de PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil), 1 mM de ortovanadato de sódio, 5 mM de fluoreto de sódio, 1 mM de óxido de fenilarsina e 1 mM de ácido ocadáico, foi acrescentado. Após, o extrato obtido foi sonicado por 10 min e centrifugado por 5 min a 10.000 rpm. O sobrenadante obtido da centrifugação foi considerado

como o extrato proteico das células. A dosagem de proteína foi realizada seguindo o protocolo descrito por LOWRY et al. 1951.

4.16 Análise por Western Blotting

Os extratos proteicos foram eletrotransferidos do gel para uma membrana de nitrocelulose conforme descrito por CASANOVA et al., 2012. A eletrotransferência foi realizada em tampão contendo 25 mM de Tris-glicina e 20% de metanol (v/v), pH 8,3 a 210 mA por 90 min a 4 °C utilizando-se o sistema de transferência da Bio-Rad. A eficiência da transferência foi monitorada corando-se a membrana com 0,5% de vermelho de Ponceau (p/v) em 10% de TCA (ácido tricloroacético) (p/v) por 10 min. Posteriormente, a membrana foi descorada por lavagem com 0,01 M de Tris-HCl pH 7,6 contendo 0,15 M de NaCl (TBS). A membrana totalmente descorada do vermelho de Ponceau, foi então bloqueada com 0,01 M de Tris-HCl pH 7,6 contendo 0,15 M de NaCl, 5% de albumina sérica bovina fração V e 0,1% de Tween 20 (TBS-Tween-Albumina) por 18 horas a 4 °C. Após 18 horas, o tampão de bloqueio foi desprezado e a membrana incubada com anticorpo primário, contra proteínas relacionadas ao ciclo celular e apoptose (*Cell Signaling*), em uma diluição de 1:10.000 por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 5x com TBS-Tween e incubada por 1 hora à temperatura ambiente com anti-IgG coelho/camundongo conjugada com peroxidase diluída 1:10.000 na solução de bloqueio. A membrana foi então lavada 5x por 5 min com TBS-Tween e 2x com TBS. Por fim, o complexo antígeno-anticorpo foi revelado por meio do método de intensificação de quimioluminescência pelo Kit ECL no aparelho C-Digit Blot Scanner (Li-cor) e a quantificação das bandas foi determinada por análise densitométrica, utilizando o programa Image J (TOWBIN et al., 1979).

4.17 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste t de Student para comparação de dois grupos ou análise de variância (one-way ANOVA) para mais de dois grupos. As análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 5.0*. O valor de P foi considerado significativo quando menor que 0.05.

5. RESULTADOS

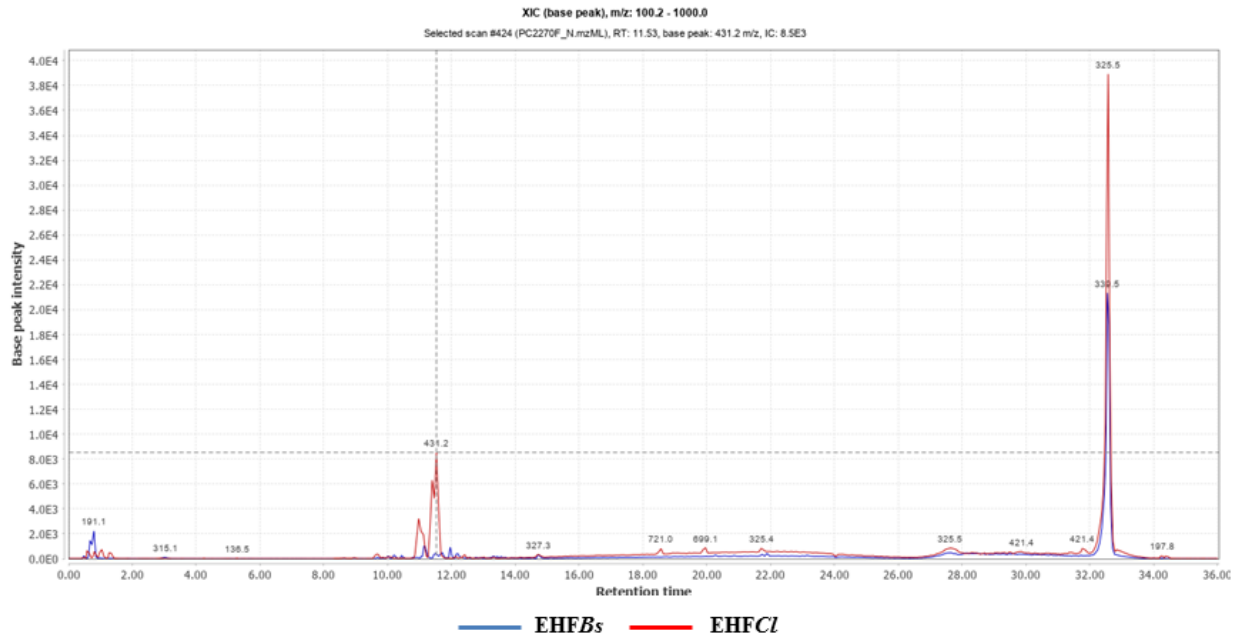
5.1 Perfil químico por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS) e redes moleculares do EHFBS e EHFCL

Os perfis químicos do EHFBS e EHFCL foram obtidos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a MS tandem e o dados processados em *MZmine* nos modos de ionização negativo (**Figuras 11A e B**) e positivo (**Figura 12A**). Nossos resultados mostraram que os compostos tiveram melhor ionização em modo positivo do que no modo negativo, totalizando 13 compostos, 6 no modo negativo $[M-H]^-$ (**Tabela 2**) e 7 no modo positivo $[M+H]^+$ (**Tabela 3**). A tentativa de anotação dos compostos foi realizada com base na comparação do perfil de fragmentação de MS combinados como o banco de dados do programa GNPS (*Global Natural Products Social*) e literatura.

O composto **1** (**Tabela 2**), presente no EHFBS, apresentou um pico de íon em $[M-H]^-$ m/z 191.1 assim como os íons fragmentados em m/z 173, 127, 111 e 85. Por esse padrão de fragmentação, o composto foi anotado como ácido quínico, um ácido fenólico (Biblioteca GNPS, PERON et al., 2019, JOO et al., 2020). A classe química de flavonoides foi proposta como a mais abundante representada pelas flavonas Orientina (**Tabela 2**) em $[M-H]^-$ m/z 447.2 no EHFCL; Quercetina 3-vicianosídeo (**Tabela 2**) de $[M-H]^-$ m/z 595.3 no EHFBS, Vitexina-2"-O-ramnosídeo de $[M-H]^-$ m/z 577.3 e de $[M+H]^+$ m/z 579.1 (**Tabela 3**) no EHFCL; Isovitexina de $[M-H]^-$ m/z 431.3 (**Tabela 2**) e de $[M+H]^+$ m/z 433.2 (**Tabela 3**) no EHFBS e EHFCL; Homoorietina de $[M+H]^+$ m/z 449.4 em ambos extratos (**Tabela 3**). O composto **5** (**Tabela 3**) foi anotado como o triterpenoide ácido oleanólico $[M-H]^+$ m/z 439.3 também presente nas duas amostras EHFCL e EHFBS, nos tempos de retenção de 23,76 e 24,05, respectivamente, com padrão de fragmentação semelhante de m/z 421, 393, 329, 203, 191, 193, 189, 179, 149 (Biblioteca GNPS, DA SILVEIRA et al., 2010, BERENQUER-RIVAS, 2021, FERREIRA et al., 2014, LI et al., 2021b, ZHANG et al., 2010, SHAH et al., 2022, REN et al., 2020, ZHANG et al., 2018, LIANZA et al., 2022, YING et al., 2007, ABDEL et al., 2023, MOHAMMED et al., 2023).

Embora os íons m/z 325 e 339, observados na **Figura 11A**, tenham gerado os maiores picos de intensidade de ionização, não foram considerados em nossas análises por serem considerados possíveis contaminantes inerentes do equipamento.

A



B

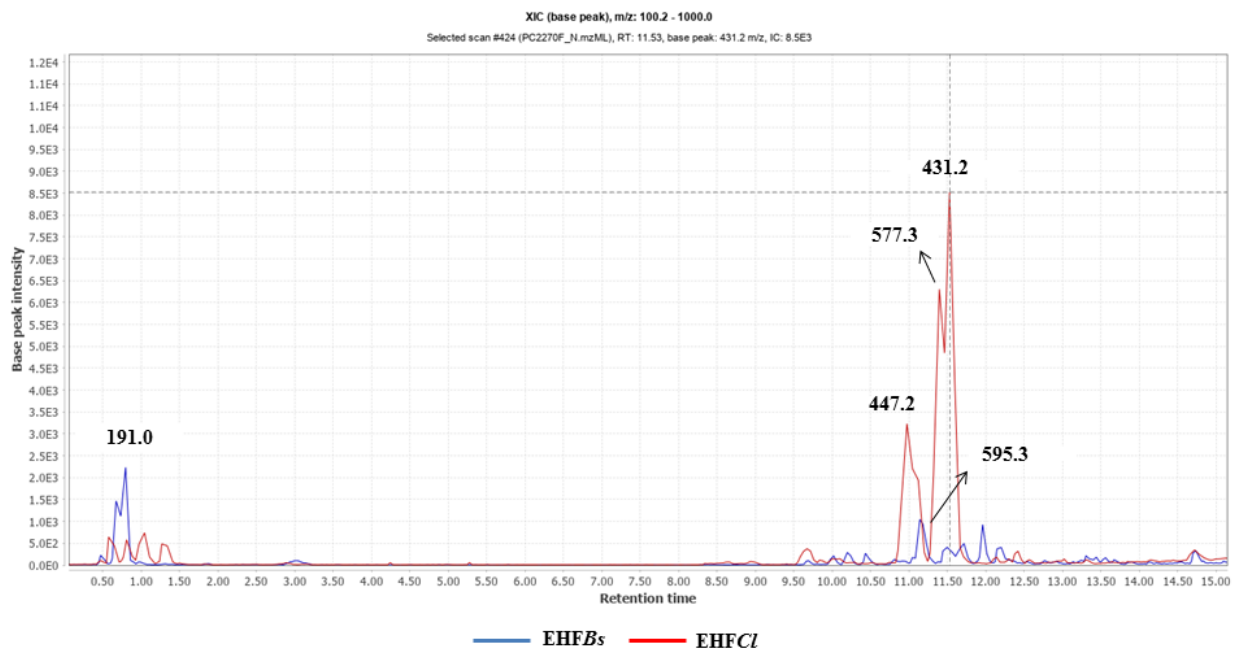


Figura 11. Cromatogramas dos perfis químicos do EHFBS e EHFCl por UHPLC-ESI(-) MS/MS com os íons majoritários destacados. (A) Cromatograma efetivo da corrida de 36 minutos e (B) Zoom do cromatograma no tempo de 0 a 15 minutos com íons em destaque.

A

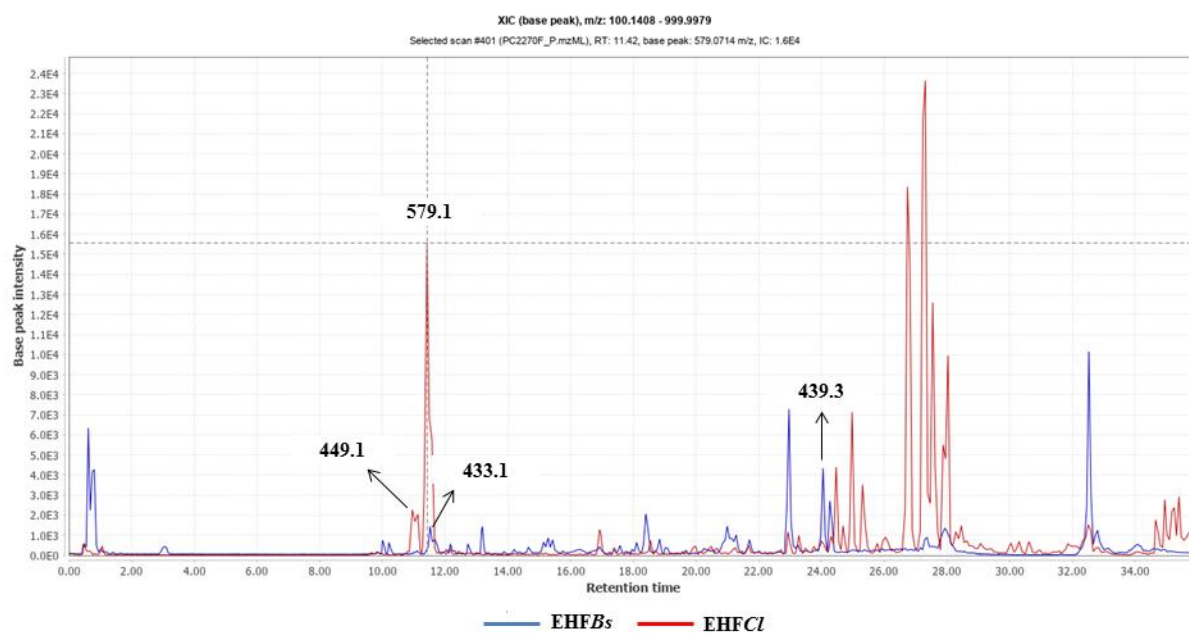


Figura 12. Cromatogramas dos perfis químicos do EHFBS e EHFCl por UHPLC-ESI(+) MS/MS com os íons majoritários destacados. (A) Cromatograma efetivo da corrida de 36 minutos.

Tabela 2. Caracterização fitoquímica do EHFBS e EHFCl por UHPLC-ESI(-) MS/MS.

ID	T.R. (min)	[M-H] ⁻ <i>m/z</i>	MS ²	Composto	Amostra	Ref.
1	0.80	191.1	173, 127, 111, 85	Ácido quínico	EHFBS	Biblioteca GNPS, Peron et al., 2019, Joo et al., 2020
2	10.97	447.2	429, 357, 327, 285	Orientina	EHFCl	Biblioteca GNPS, Da Silveira et al., 2010, Berenguer- Rivas, 2021, Ferreira et al., 2014
3	11.14	595.3	300, 301, 271, 255	Quercetina 3- vicianosídeo	EHFBS	Biblioteca GNPS, Li et al., 2021b
4	11.39	577.3	457, 431, 413, 341, 293	Vitexina-2-O- ramnosídeo	EHFCl	Biblioteca GNPS, Zhang et al., 2010, Ferreira et al., 2014, Shah et al., 2022
5	11.50	431.3	341, 312, 311, 283	Isovitexina	EHFBS	Biblioteca GNPS, Berenguer-Rivas, 2021, Da Silveira et al., 2010, Shah et al., 2022
6	11.53	431.2	413 341 323 311 269	Isovitexina	EHFCl	Biblioteca GNPS, Berenguer-Rivas, 2021, Da Silveira et al., 2010, Shah et al., 2022

ID: Identificação, T.R: Tempo de retenção, *m/z*: massa/carga, MS²: íons fragmentados e Ref.: referências

Tabela 3. Caracterização fitoquímica do EHFBS e EHFCl por UHPLC-ESI(+) MS/MS.

ID	T.R. (min)	[M+H] ⁺ m/z	MS ²	Composto	Amostra	Ref.
1	10.95	449.1	431, 413, 395, 383, 353, 329, 299	Homoorientina	EHFCl	Biblioteca GNPS, Ren et al., 2020, Zhang et al., 2018, Lianza et al., 2022
2	11.42	579.1	433, 415, 367, 313	Vitexina-2-O-ramnosídeo	EHFCl	Biblioteca GNPS, Ying et al., 2007
3	11.49	433.1	415, 397, 367, 337, 313	Isovitexina	EHFCl	Biblioteca GNPS, Zhang et al., 2018, Lianza et al., 2022
4	11.52	433.1	415, 397, 367, 337, 313	Isovitexina	EHFBS	Biblioteca GNPS, Zhang et al., 2018
5	21.00	449.4	431, 329, 299	Homoorientina	EHFBS	Biblioteca GNPS, Ren et al., 2020
6	23.76	439.3	421, 393, 329, 248, 203, 191, 193, 189, 179, 149	Ácido oleanólico	EHFCl	Biblioteca GNPS, Abdel et al., 2023, Mohammed et al., 2023
7	24.05	439.3	421, 393, 329, 248, 193, 191, 189, 179, 149	Ácido oleanólico	EHFBS	Biblioteca GNPS, Abdel et al., 2023, Mohammed et al., 2023

ID: Identificação, T.R: Tempo de retenção, m/z : massa/carga, MS²: íons fragmentados e Ref.: referências

Posteriormente, os dados de LC-MS/MS processados no MZmine foram inseridos no GNPS para criação das redes moleculares que foram visualizadas utilizando o *software Cytoscape v3.10*. A rede molecular consiste no agrupamento de substâncias com similaridade do perfil de fragmentação, logo, assume-se que essas substâncias sejam pertencentes à mesma classe química. Após esse processamento, observaram-se clusters (“família moleculares”) através do compartilhamento de características químicas essenciais para que ocorra a ligação do nó (WANG et al., 2016, ARON et al., 2020).

A rede molecular dos constituintes químicos do EHFBS e EHFCl no modo de ionização negativo (**Figura 13**) exibem os nós dos íons previstos com m/z [191.099]⁻, m/z [431.218]⁻, m/z [447.166]⁻ e m/z [577.236]⁻. O nó m/z [191.099]⁻ corresponde ao ácido quínico observado apenas no EHFBS (**Figura 13B**). Destaca-se que ambos os extratos EHFBS e EHFCl possuem o íon m/z [431.218]⁻ anotado como isovitexina, sendo que a maior ionização

ocorreu no EHFCl. Em adição, é possível observar também uma rede formada pelas flavonas orientina, isovitexina e vitexina-2-O-ramnosídeo por meio dos íons previstos (**Figura 13C**).

A **Figura 14** mostra a rede molecular com base na ionização no modo positivo dos dois extratos. A primeira rede desta figura é formada pelos íons m/z [449.145]⁺ e m/z [433.165]⁺ compartilhados tanto pelo EHFBS quanto pelo EHFCl previstos como homorientina e isovitexina (**Figura 14B**), respectivamente. Outra rede de flavonoides, desta vez presente apenas no EHFCl, foi detectada em nossas análises, com destaque para o m/z [579.091]⁺ o qual corresponde com a vitexina-2-O-ramnosídeo (**Figura 14C**), conforme sugerido nas análises anteriores. Por fim, encontramos uma rede de triterpenos possivelmente presente no EHFBS, sendo o ácido oleanólico m/z [439.274]⁺ visto nos dois extratos, porém com maior ionização no EHFBS (**Figura 14D**). A fragmentação proposta e estruturas do ácido oleanólico e dos flavonoides isovitexina, homorientina e vitexina-2-O-ramnosídeo encontram-se na **Figura 15**. Conforme observado, flavonas isovitexina e orientina, apresentou perdas características de flavonas C-glicosiladas, enquanto que a vitexina-2-O-ramnosídeo apresentou perfil de fragmentação C e O-glicosídica. O ácido oleanólico sofre uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder, conhecida como uma reação de ciclo adição entre um dieno conjugado com quatro elétrons e um segundo componente alceno com dois elétrons, chamado de dienófilo, representados pelos fragmentos m/z 248 e m/z 203, respectivamente.

As informações descritas acima, como os fragmentos MS², em conjunto com a pesquisa na literatura sugerem fortemente que são os compostos descritos e que eles estão presentes nos extratos das plantas utilizados neste trabalho.

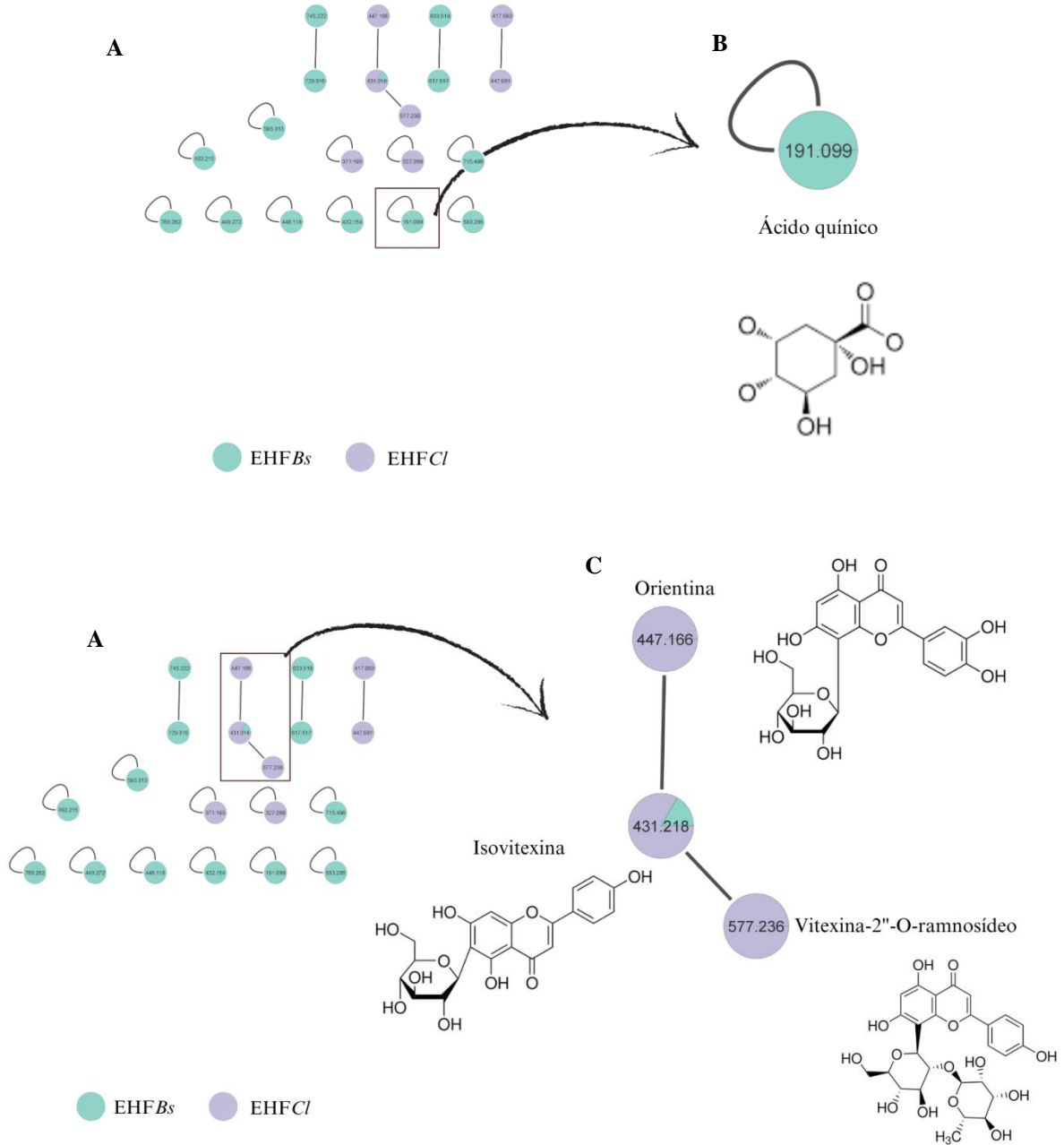
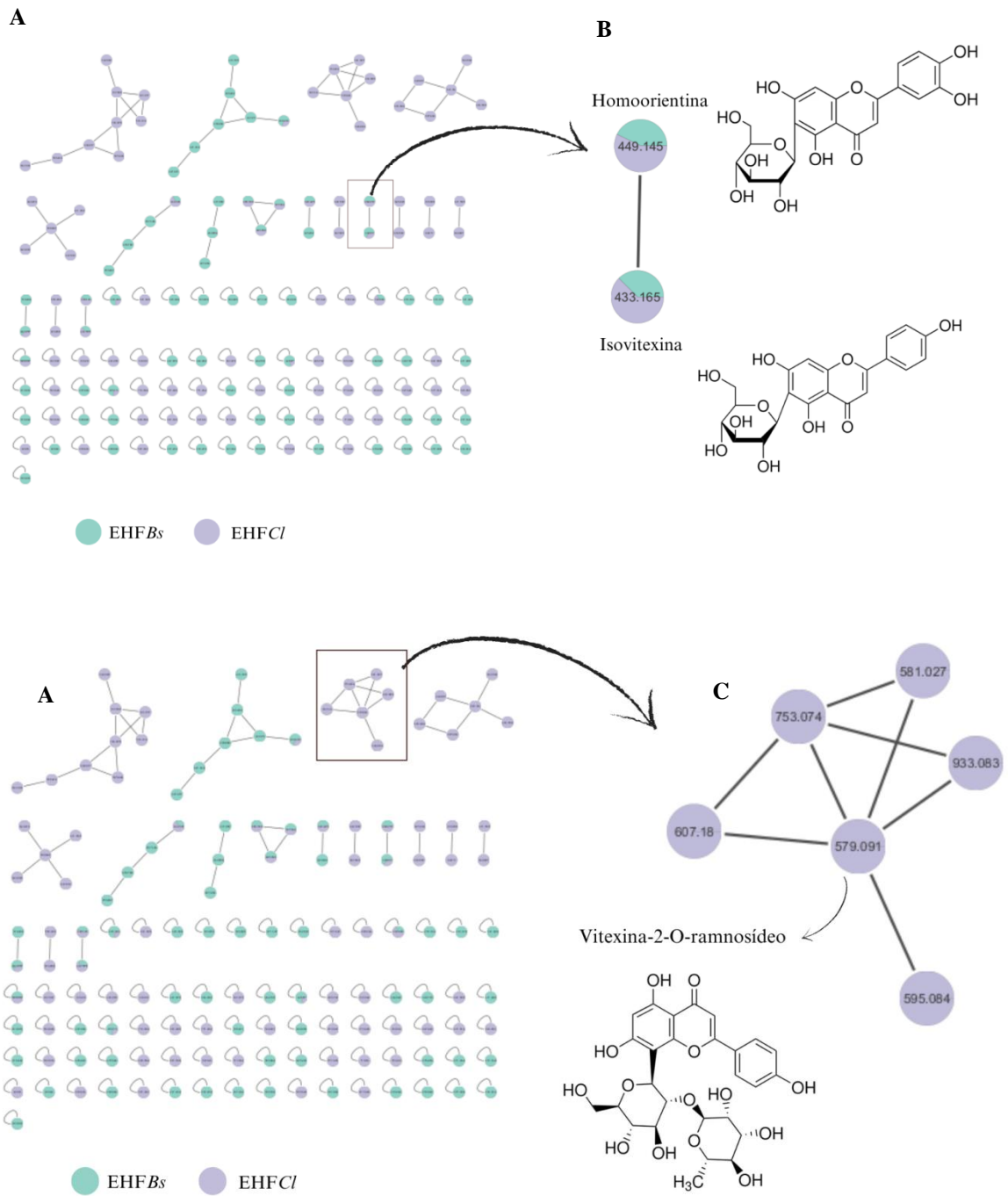


Figura 13. Rede molecular dos constituintes químicos do EHFBS e EHFCl através dos dados de LC-MS/MS no modo de ionização negativo pelo software Cytoscape versão 3.10. (A) Rede molecular. (B) Zoom com foco do nó do composto anotado. (C) Zoom com foco na rede de compostos anotados.



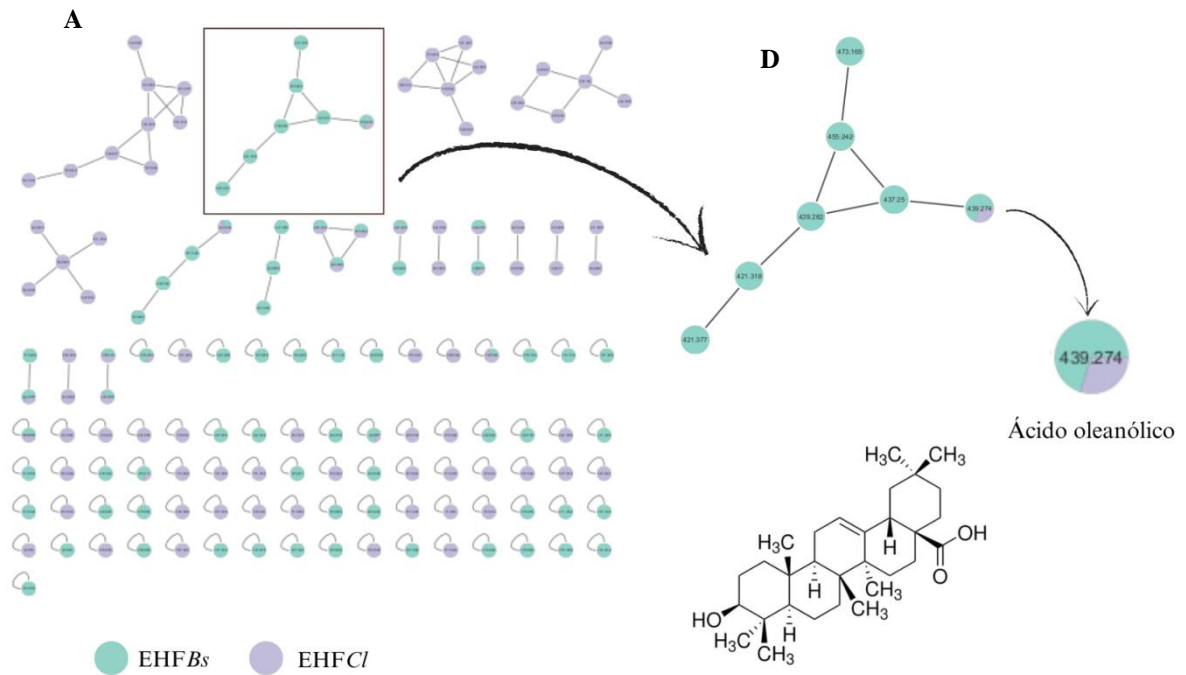


Figura 14. Rede molecular dos constituintes químicos do EHFBS e EHFCl através dos dados de LC-MS/MS no modo de ionização positivo pelo software Cytoscape versão 3.10. (A) Rede molecular. (B-D) Zoom com foco nas redes de compostos anotados.

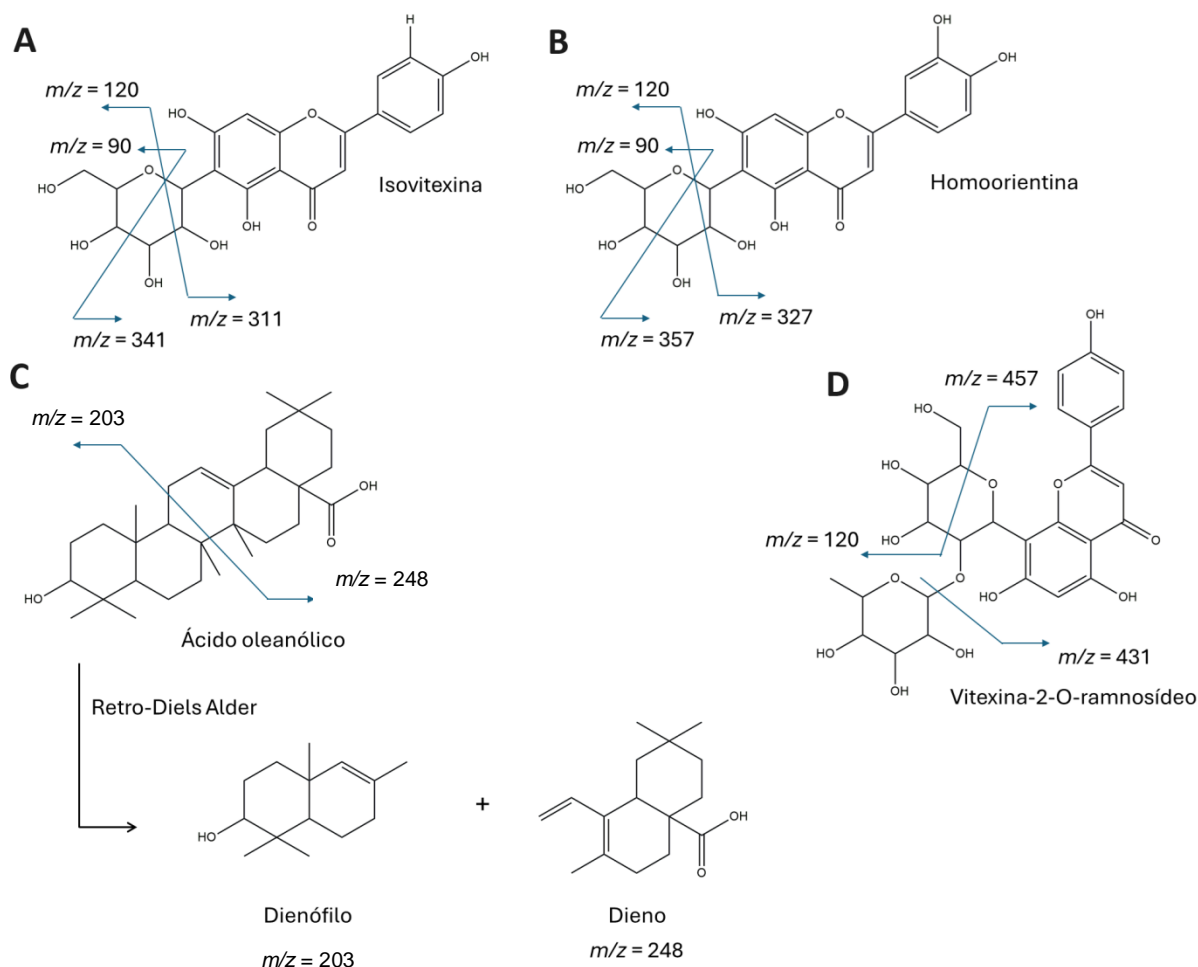


Figura 15. Estruturas químicas e fragmentação proposta da isovitexina (A), homoorientina (B), ácido oleanólico (C) e vitexina-2-O-ramnosídeo (D).

5.2 Os EHFBS e EHFCL reduzem a viabilidade das linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

Inicialmente, determinou-se a viabilidade celular pelo ensaio de MTT para investigar o efeito dos extratos na atividade metabólica das células como um indicador de viabilidade e proliferação celular, além de citotoxicidade. Para isso, foram utilizadas as concentrações de 25, 50, 75, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ do extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBs) e das folhas da *Clusia lanceolata* (EHFCL), por 24 e 48 horas, nas linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

De acordo com os resultados obtidos, o EHFBS e EHFCL demonstram efeito citotóxico de maneira dose e tempo dependentes nas células MDA-MB-231, após 24 e 48 horas de tratamento. Nota-se que a partir da concentração de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ do EHFBS, a

viabilidade celular foi reduzida em 37 e 61% (**Figura 16A**), respectivamente, enquanto na maior concentração (200 $\mu\text{g/mL}$) com o EHFCl, essa redução foi de apenas 29% em relação ao controle (**Figura 16C**) após 24 horas. Entretanto, após 48 horas de incubação com os extratos, a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ reduziu em 91 e 89% a viabilidade das células MDA-MB-231, respectivamente, em relação ao controle. Os valores de IC_{50} de ambos os extratos e em ambos os tempos de tratamento encontram-se na **Tabela 4**.

Na linhagem celular MCF-7, observa-se que o EHFBS apresentou ação citostática ao invés de citotóxica, devido ao número de células viáveis ter sido menor em 24 do que em 48 horas de tratamento (**Figura 16B**) com os valores calculados de IC_{50} 106,9 e 171,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Tabela 4**). Já o EHFCl (**Figura 16D**) não foi capaz de reduzir em mais de 50% o número de células vivas, até a maior concentração utilizada em 24 horas, porém, após 48 horas de tratamento, o efeito foi mais significativo sendo possível chegar ao IC_{50} de 74,72 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 5**).

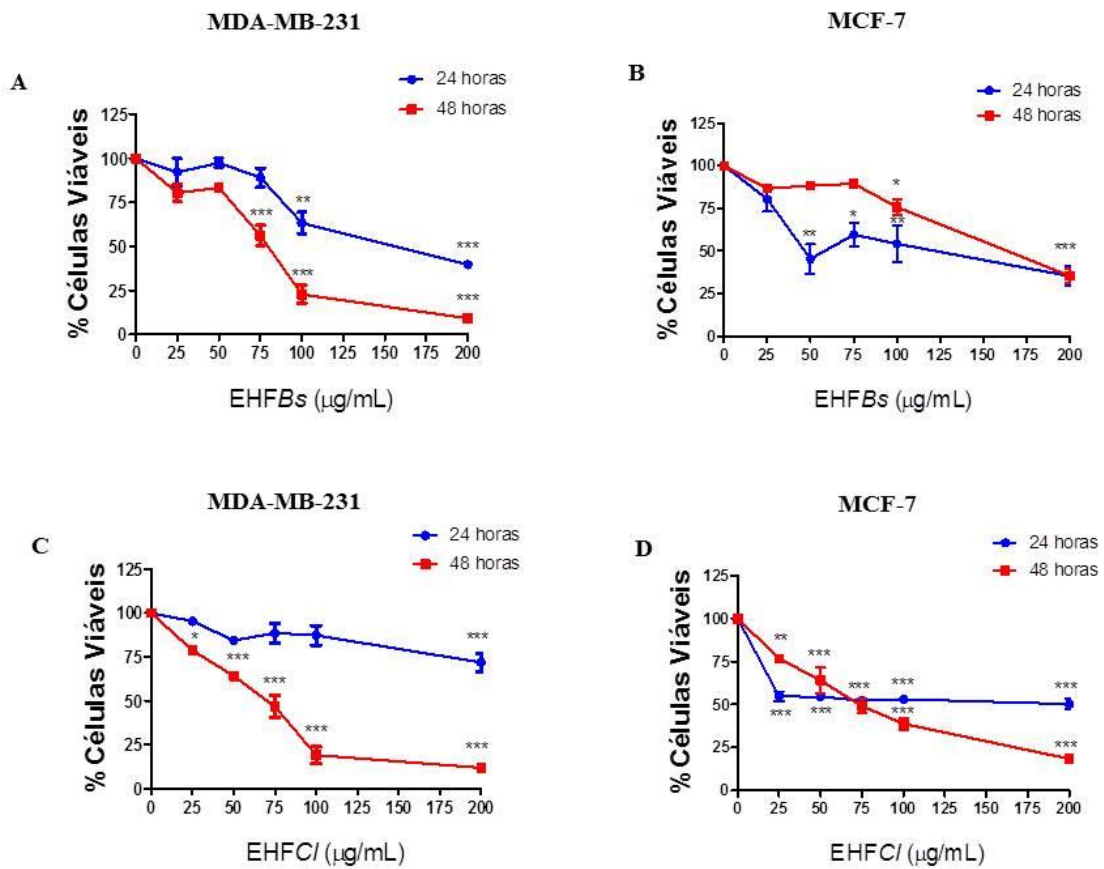


Figura 16. Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBs) e das folhas da *Clusia lanceolata* (EHFCI) na viabilidade das células de câncer de mama pelo método de MTT. As células MDA-MB-231 (A e C) e MCF-7 (B e D) foram tratadas com 25, 50, 75, 100 e 200 µg/mL do EHFBs e EHFCI nos períodos de 24 (●) e 48 (■) horas, respectivamente. Após o tratamento, a viabilidade das células foi avaliada pelo método de MTT. Os resultados representam a média ± SEM de três experimentos independentes. *p < 0,005, **p < 0,001, ***p < 0,0001, em relação ao controle.

Tabela 4. Valores de IC₅₀ para as células MDA-MB-231, MCF-7, após 24 e 48 horas de tratamento, com EHFBs e EHFCI pelo método de MTT.

Amostra	MDA-MB-231 (µg/mL)		MCF-7 (µg/mL)	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
EHFBs	168,2 ± 6,98	76,96 ± 2,49	106,9 ± 29,78	171,4 ± 7,80
EHFCI	> 200	62,66 ± 9,55	> 200	74,72 ± 6,59

Em adição, a fim de avaliar o efeito do EHFBS sobre a viabilidade celular, em nível de integridade de membrana das células, foi utilizado o ensaio de citotoxicidade por exclusão de azul de Tripán em ambas as linhagens tumorais de mama. Foram utilizadas as mesmas concentrações (25, 50, 75, 100 e 200 µg/mL) de EHFBS e mesmo período de tratamento. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao controle não tratado.

As **Figuras 17A e 17B** ilustram o efeito do EHFBS na linhagem celular MDA-MB-231 após 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente. O percentual de células vivas foi reduzido à medida que se aumentou tanto a concentração quanto o tempo de incubação com o extrato, sendo o efeito mais pronunciado nas concentrações de 75, 100 e 200 µg/mL do EHFBS com percentuais de redução de 41, 60, 92% em 24 horas e 63, 78 e 100% em 48 horas, respectivamente.

Curiosamente, o EHFBS apresentou perfil similar sobre a viabilidade celular nos dois ensaios utilizados (MTT e Azul de tripan) na linhagem celular MCF-7. Em 24 horas (**Figura 17C**), o EHFBS exerceu efeito mais pronunciado na redução do número de células viáveis do que em 48 horas (**Figura 17D**), pois em 24 horas de incubação a concentração de 75 µg/mL já havia diminuído em mais de 50% a viabilidade celular, enquanto em 48 horas esse efeito foi observado em torno de 200 µg/mL do EHFBS.

Com base nesses resultados, sugere-se que o EHFBS possivelmente possui um perfil mais seletivo para citotoxicidade na linhagem celular mais agressiva MDA-MB-231 quando comparada a menos agressiva MCF-7. Para realização dos demais ensaios, foram utilizadas as concentrações de IC₅₀ obtidas nas duas linhagens tumorais pelo ensaio de MTT devido a maior precisão e alta reprodutibilidade desse método. Seguimos apenas com EHFBS pelo potencial mais notável sobre a viabilidade das células em relação ao EHFCL.

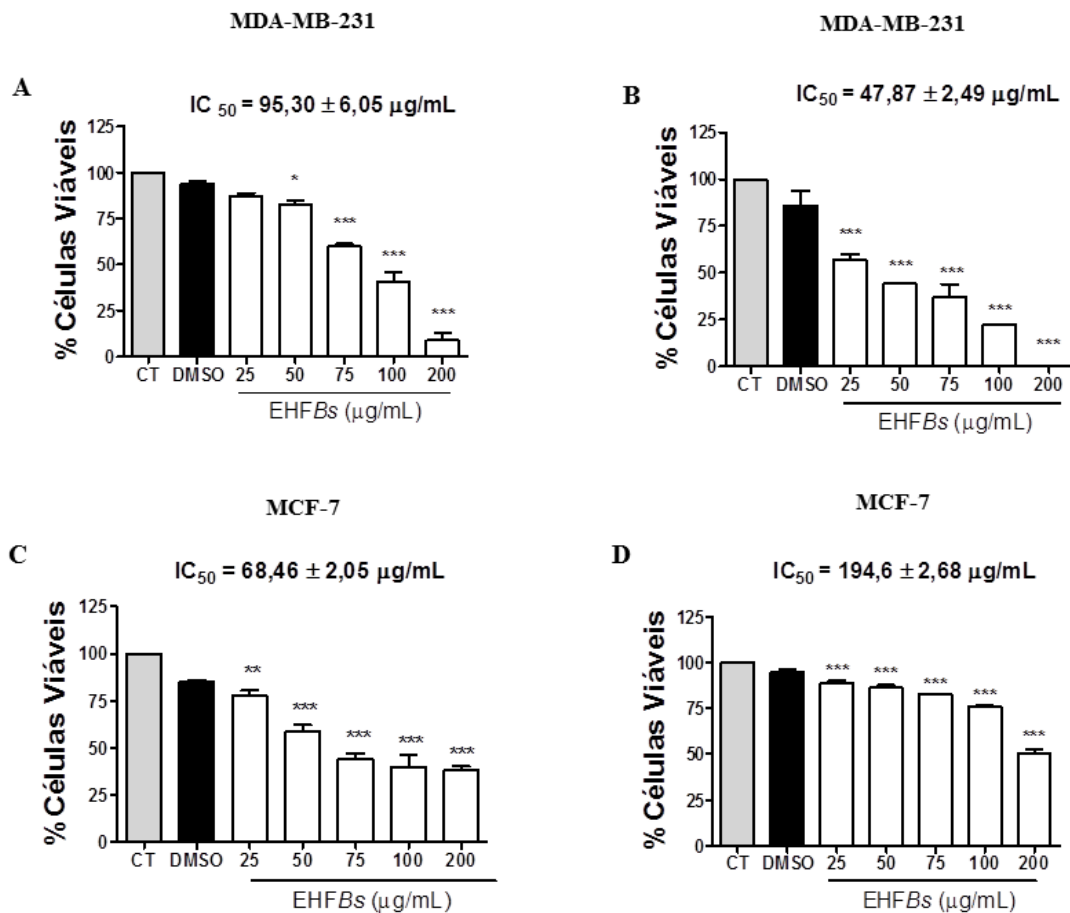


Figura 17. Efeito in vitro do extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBs) na viabilidade das células de câncer de mama pelo método Azul de Tripán. As células MDA-MB-231 (A e B) e MCF-7 (C e D) foram tratadas com 25, 50, 75, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ do extrato EHFBs e 1% de DMSO nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente. Após o tratamento, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS a 37°C. Em seguida, o azul de Tripán foi adicionado a cada poço contendo PBS e deixado reagir por alguns minutos. Depois disto, a contagem de células viáveis (incolor) e não viáveis (azul) foi feita com o auxílio de um microscópio óptico invertido. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, em relação ao controle.

5.3 O EHFBs altera a morfologia de células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

Após avaliar o efeito do extrato na viabilidade celular e determinar seus respectivos valores de IC_{50} , foi investigado se o EHFBs poderia induzir modificações na morfologia das células tumorais de mama. Dessa forma, após os respectivos tratamentos, as células foram

fixadas e coradas com Giemsa e a morfologia celular foi avaliada com auxílio de um microscópio.

Na célula MDA-MB-231 tratada com 168,2 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS, por 24 horas (**Figura 18C e F**), nota-se o aparecimento de corpos apoptóticos (**Figura 18F**, seta verde), alterações citoplasmáticas com formação de vacúolos (**Figura 18F**, seta vermelha), redução da população celular e condensação da cromatina (**Figura 18F**, seta laranja) em comparação com o controle. Enquanto, no tratamento com 76,96 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS, por 48 horas (**Figura 18I e L**), além da condensação da cromatina (**Figura 18L**, seta laranja) observa-se a ocorrência de ruptura celular (**Figura 18L**, seta azul).

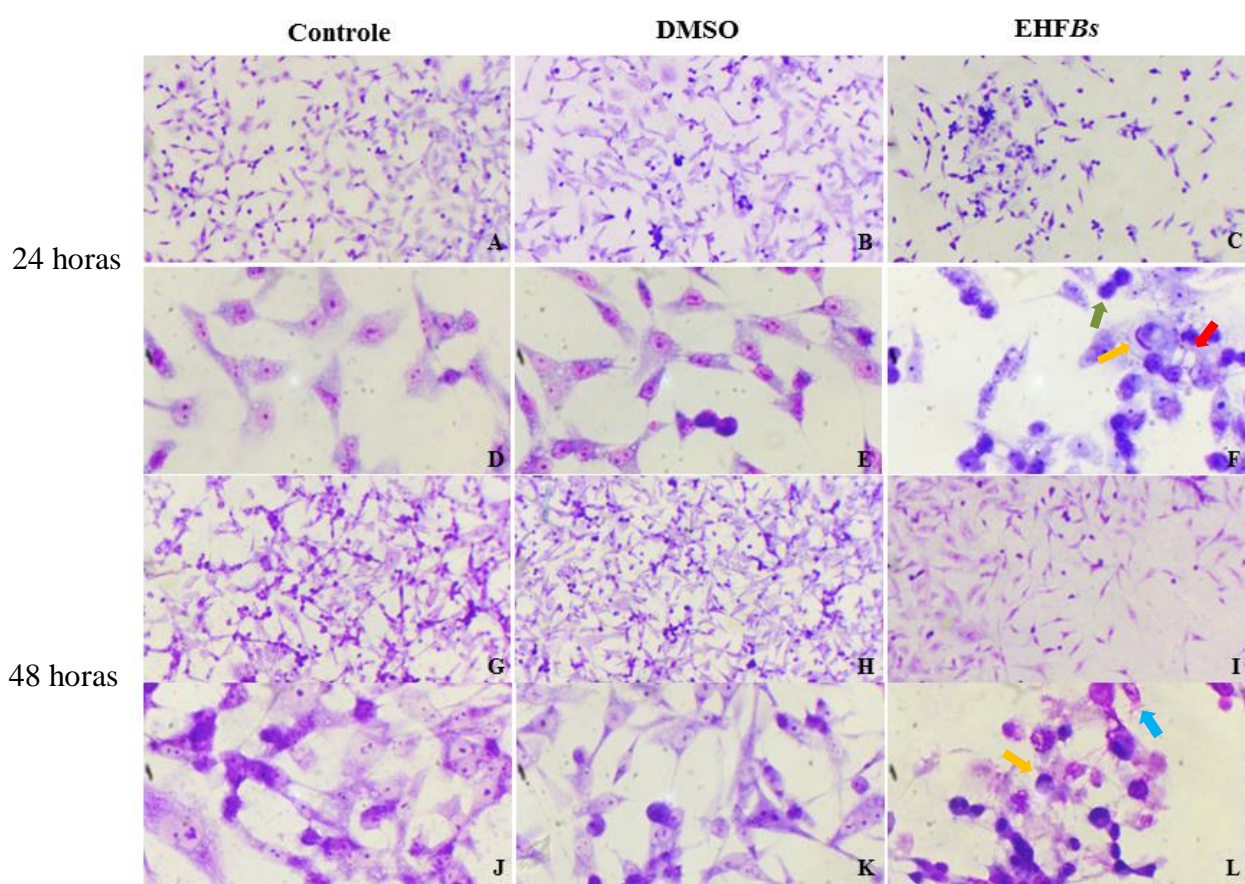


Figura 18. O EHFBS induz alterações morfológicas nas células tumorais de mama MDA-MB-231. As células foram tratadas ou não com EHFBS por 24 e 48h. Controle em 24h (**A e D**) e 48h (**G e J**), DMSO em 24h (**B e E**) e 48h (**H e K**), células tratadas com 168,2 $\mu\text{g/mL}$ (**C e F**) e 76,96 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS (**I e L**) por 24 e 48 horas, respectivamente. Após o tempo de tratamento, as células foram coradas com GIEMSA. A morfologia celular foi avaliada com auxílio de microscópio óptico invertido. As imagens estão com aumentos de 10x e 40x, respectivamente. Seta vermelha – Formação de vacúolos no citoplasma; Seta verde – Corpos apoptóticos; Seta azul – Ruptura da célula; Setas amarelas – Condensação da cromatina.

Na linhagem tumoral MCF-7 foram observadas alterações na morfologia com arredondamento celular (**Figura 19C e F**, setas marrons), formação de bolhas na membrana (**Figura 19F**, seta cinza) decorrente do tratamento com 106,9 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS, por 24 horas. Já no tratamento com 171,4 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS, por 48 horas (**Figura 19I e L**) ocorreu condensação da cromatina (**Figura 19L**, seta amarela) em comparação com as células não tratadas.

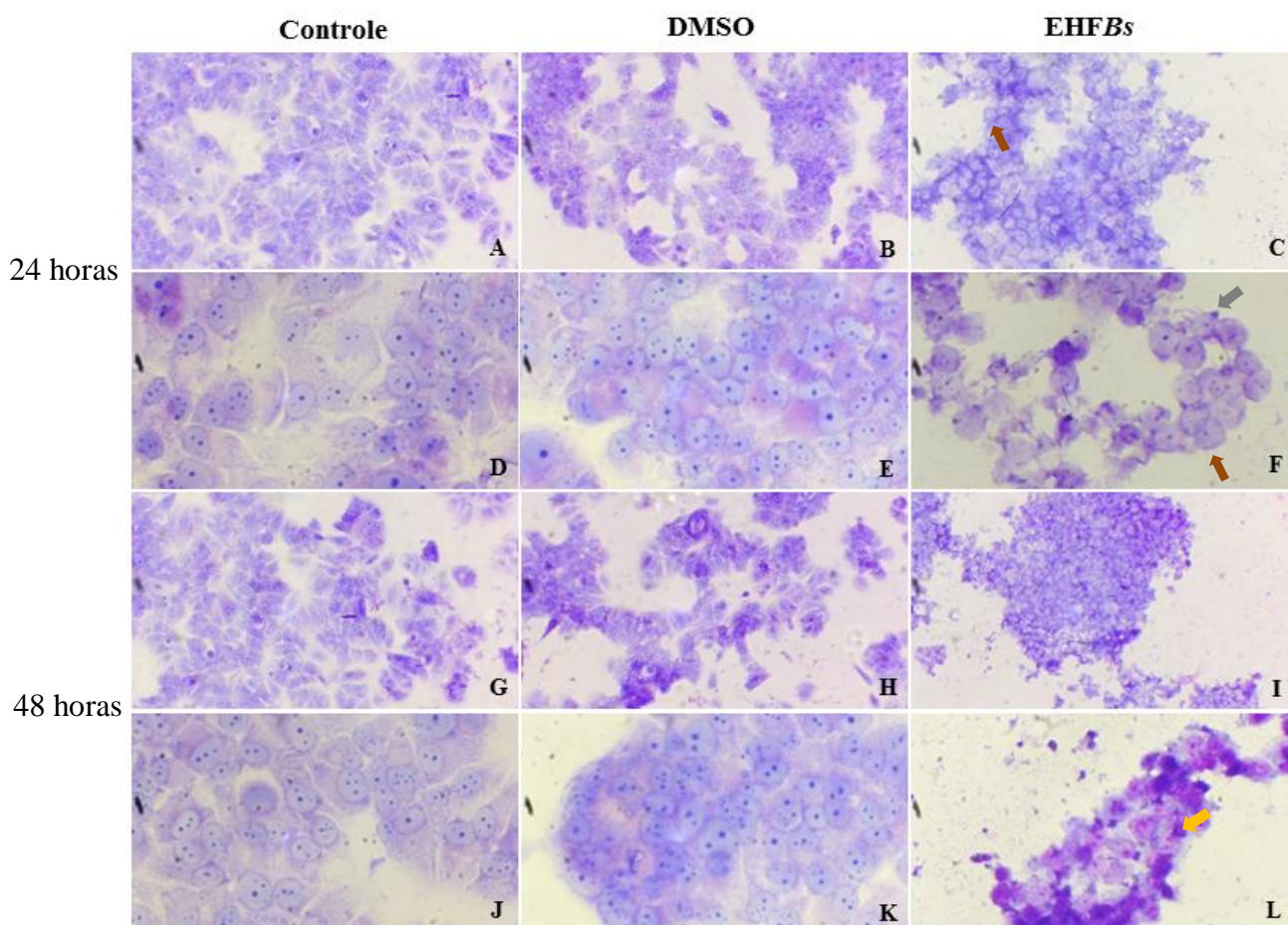


Figura 19. O EHFBS induz alterações morfológicas nas células tumorais de mama MCF-7. As células foram tratadas ou não com EHFBS por 24 e 48h. Controle em 24h (**A e D**) e 48h (**G e J**), 1% de DMSO em 24h (**B e E**) e 48h (**H e K**), células tratadas com 106,9 $\mu\text{g/mL}$ (**C e F**) e 171,4 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS (**I e L**) por 24 e 48 horas, respectivamente. Após o tempo de tratamento, as células foram coradas com GIEMSA. A morfologia celular foi avaliada com auxílio de microscópio óptico invertido. As imagens estão com aumentos de 10x e 40x, respectivamente. Seta marrom – células arredondadas; Seta cinza – formação de bolhas na membrana; Seta amarela – condensação da cromatina.

5.4 EHFBS promove parada do ciclo celular em linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

A partir da observação da citotoxicidade do EHFBS e seu efeito sobre a morfologia das células de câncer de mama, utilizamos as suas concentrações inibitórias (IC_{50}), em 24 e 48 horas de tratamento, a fim de analisar o efeito destas sobre a distribuição do ciclo celular e se diferentes tempos de tratamento poderiam atuar de forma distinta nesse ciclo. O efeito do EHFBS sobre o ciclo celular foi avaliado após a marcação com PI e analisado por citometria de fluxo (**Figura 20 A-H** e **Figura 21 A-H**).

O tratamento com 168,2 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS após 24 horas nas células MDA-MB-231 foi capaz de aumentar em 2,8 vezes o número de células na fase sub-G0/G1 em relação ao controle (**Figura 20G**). Enquanto que em 48 horas de incubação com 76,96 $\mu\text{g/mL}$ do mesmo extrato, ocorreu aumento significativo nas fases G0/G1 e hiperploide em 1,03 e 1,14 vezes e diminuição em 1,6 e 1,30 vezes as fases S e G2/M, respectivamente, em relação ao controle (**Figura 20H**).

Foram investigados também os níveis de expressão de algumas proteínas específicas do ciclo celular que poderiam estar relacionadas aos resultados observados anteriormente. Para isso, células MDA-MB-231 foram tratadas com 76,96 $\mu\text{g/mL}$ do EHFBS por 48 horas, pois essa condição proporcionou mais significância em alterar mais fases do ciclo celular em relação ao tratamento de 24 horas. A ciclina A e CDK2 (**Figura 20I** e **L**) tiveram a expressão proteica aumentada em 1,28 e 1,38 vezes, respectivamente, decorrente do tratamento com o extrato em relação ao controle, conforme a análise feita por Western blotting.

Na linhagem MCF-7, incubada por 24 horas com 106,9 $\mu\text{g/mL}$ do EHFBS identificamos aumento de 6,57 vezes no número de células nas fases sub-G0/G1 e diminuição de 1,40, 2,75 e 1,91 vezes nas fases G0/G1, G2/M e Hiperploides, respectivamente, em relação ao controle (**Figura 21G**). Enquanto que no tratamento com 106,9 $\mu\text{g/mL}$ do EHFBS por 48 horas a fase G0/G1 aumentou em 1,76 vezes e as fases G2/M e Hiperploides diminuíram em 1,36 e 1,50 vezes, respectivamente (**Figura 21H**).

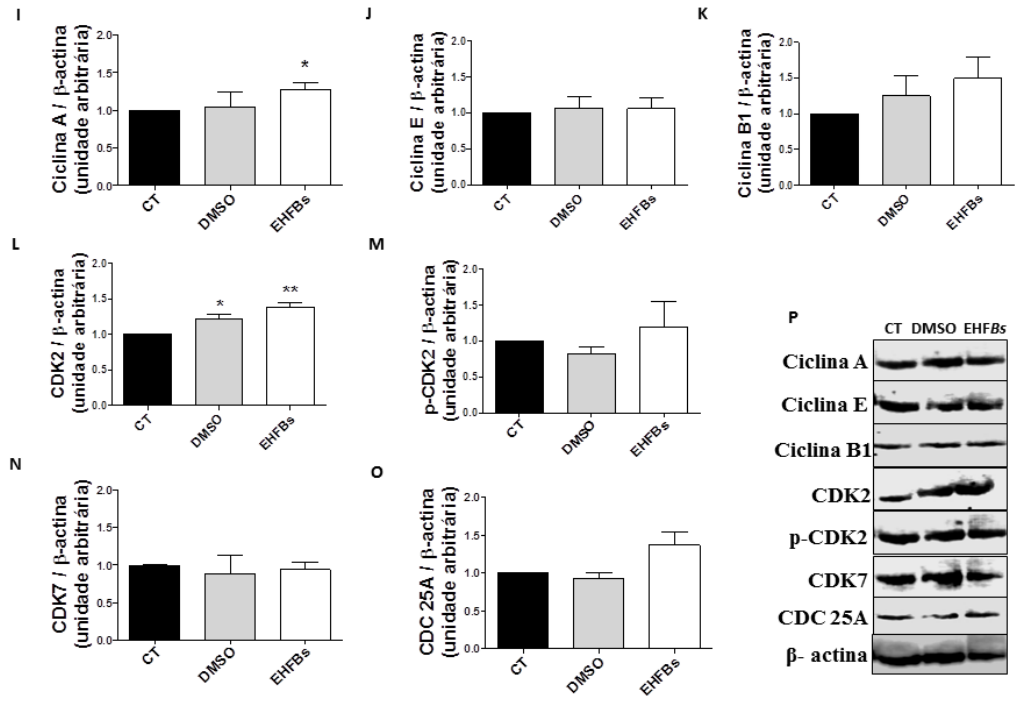
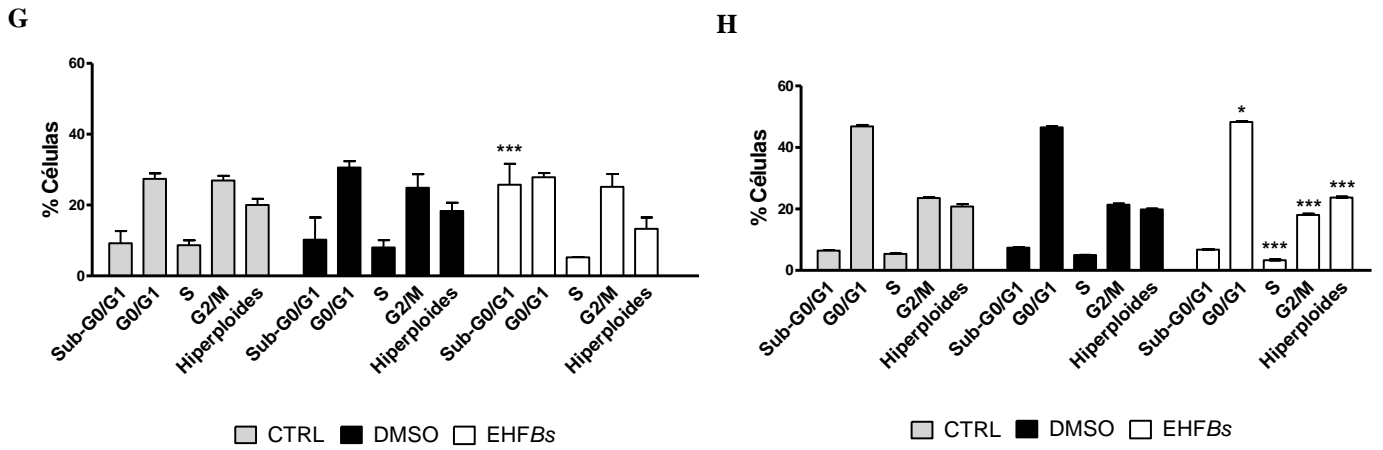
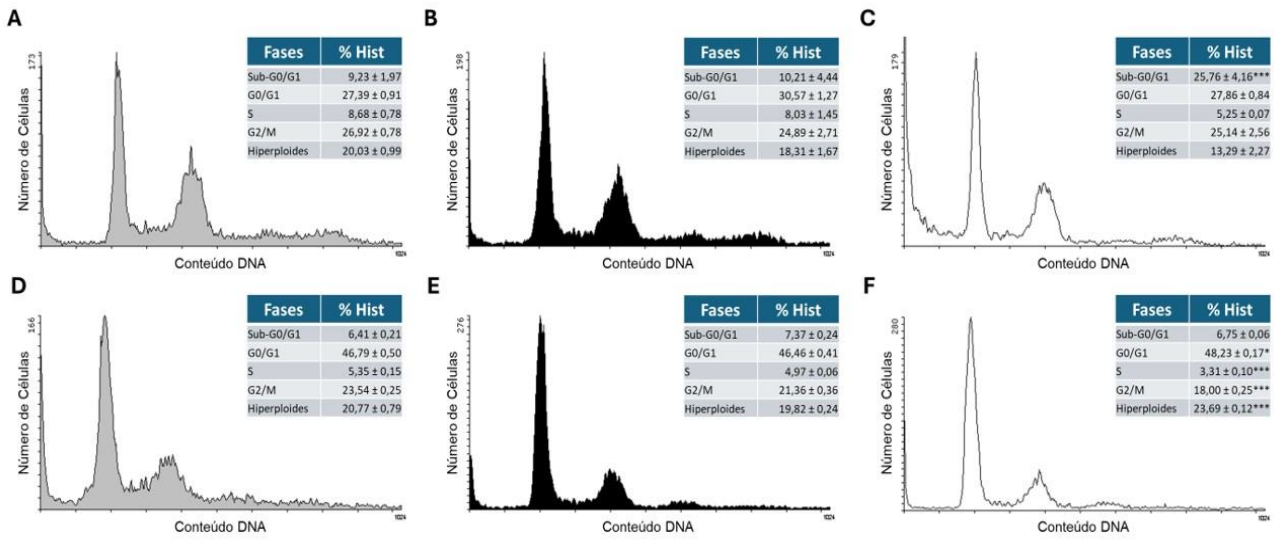


Figura 20. O EHFBS altera as fases do ciclo celular e os níveis de expressão de Ciclina A e CDK-2 em células tumorais de mama MDA-MB-231. As células MDA-MB-231 foram tratadas ou não com 1% DMSO, 168,2 µg/mL e 76,96 µg/mL de EHFBS por 24 (**A-C** e **G**) e 48 horas (**D-F** e **H**), respectivamente. (**A** e **D**) Controle, (**B** e **E**) DMSO e (**C** e **F**) EHFBS. Em seguida, o ciclo celular foi avaliado pela coloração com PI e analisado por citometria de fluxo. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes e mostram o conteúdo de DNA (eixo X) versus Número de células (eixo Y). Para o ensaio de Western Blotting as células MDA-MB-231 foram tratadas com 76,96 µg/mL de EHFBS por 48 horas a fim de detectar o nível de expressão de Ciclina A (**I**), Ciclina E (**J**), Ciclina B1 (**K**), CDK2 (**L**), p-CDK2 (**M**), CDK7 (**N**) e CDC 25A (**O**) nas células. A análise densitométrica de cada banda foi realizada utilizando o software Image J e os resultados expressos como unidade arbitrária normalizadas pela β -actina. Os imunoblottings (**P**) são representativos de 3 experimentos. * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, em relação ao controle.

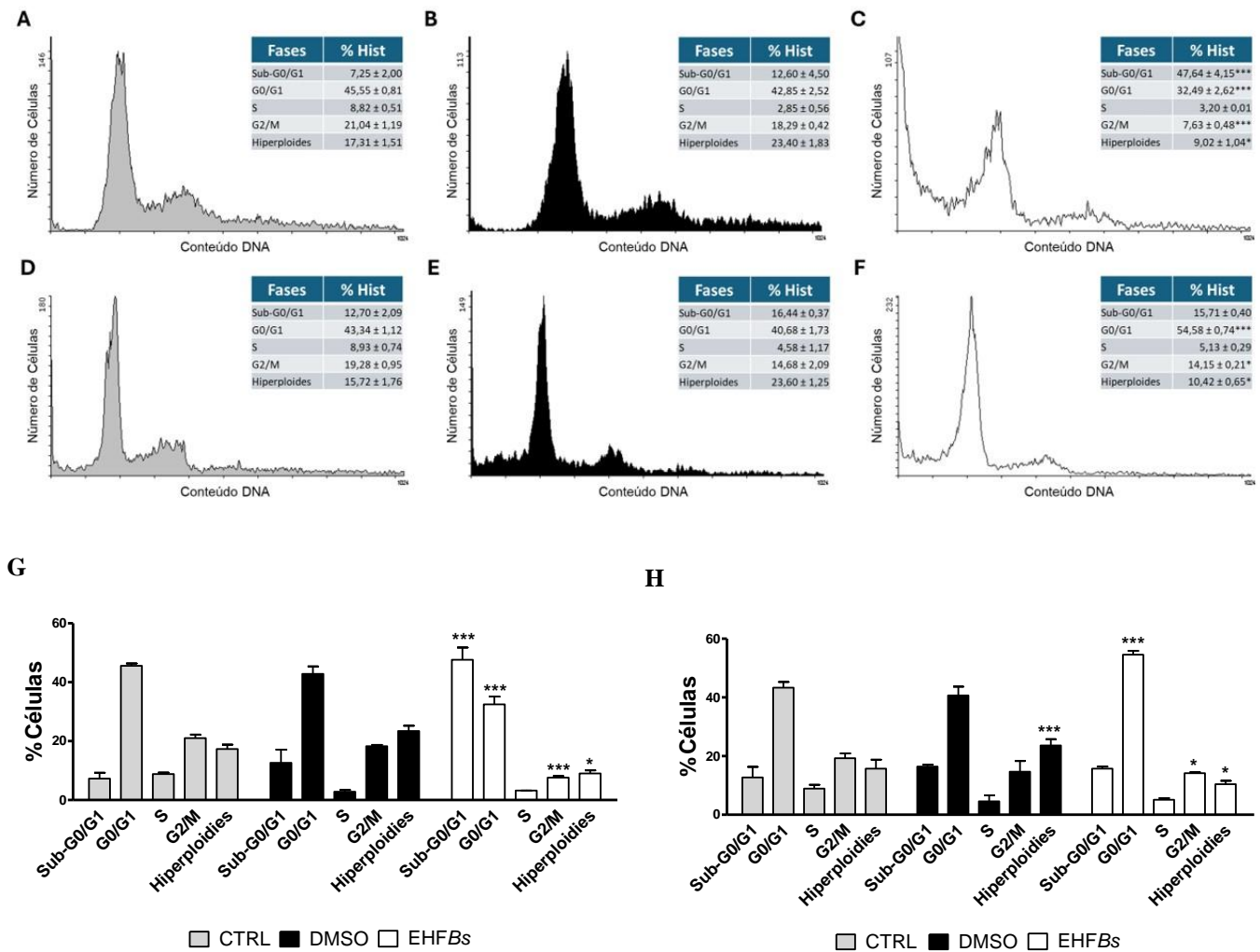


Figura 21. O EHFBS altera as fases do ciclo celular em células tumorais de mama MCF-7. As células MCF-7 foram tratadas ou não com 1% DMSO, 106,9 µg/mL e 171,4 µg/mL de EHFBS por 24 (A-C) e 48 horas (D-F), respectivamente. (A e D) Controle, (B e E) DMSO e (C e F) EHFBS. Em seguida, o ciclo celular foi avaliado pela coloração com PI e analisado por citometria de fluxo. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes e mostram o conteúdo de DNA (eixo X) versus Número de células (eixo Y). Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes. *p < 0,005, **p < 0,001, ***p < 0,0001, em relação ao controle.

5.5 EHFBS reduz a migração celular em células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

O ensaio de *wound healing* foi utilizado com o objetivo de identificar se o EHFBS poderia exercer efeito no potencial migratório das linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-

7. Para isto, as células foram tratadas com seus respectivos valores de IC_{50} por 24 e 48 horas e após esses períodos, com o auxílio de uma ponteira (200 μ L), foi feita uma lesão de cima para baixo na monocamada de células formando uma fenda. A migração celular foi avaliada nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

Os tratamentos com 168,2 e 76,96 μ g/mL de EHFBS nas células MDA-MB-231 (**Figura 22A e B**) e 106,9 e 171,4 μ g/mL de EHFBS nas células MCF-7 (**Figura 23A e B**), reduziram de forma significativa a migração de ambas as células em comparação com as células não tratadas. Nas células MDA-MB-231, esse resultado foi corroborado pela análise de Western Blotting, onde ocorreu a diminuição significativa da expressão de MMP-2 (**Figura 22C e D**) em 2,94 vezes após o tratamento com 76,96 μ g/mL de EHFBS, por 48 horas, em relação ao controle.

De acordo com esses resultados, o EHFBS exerceu efeito significativo na capacidade migratória das duas linhagens celulares de câncer de mama. Observou-se ainda, que na linhagem celular tumoral de mama MDA-MB-231 ocorreu regulação negativa da expressão de MMP-2.

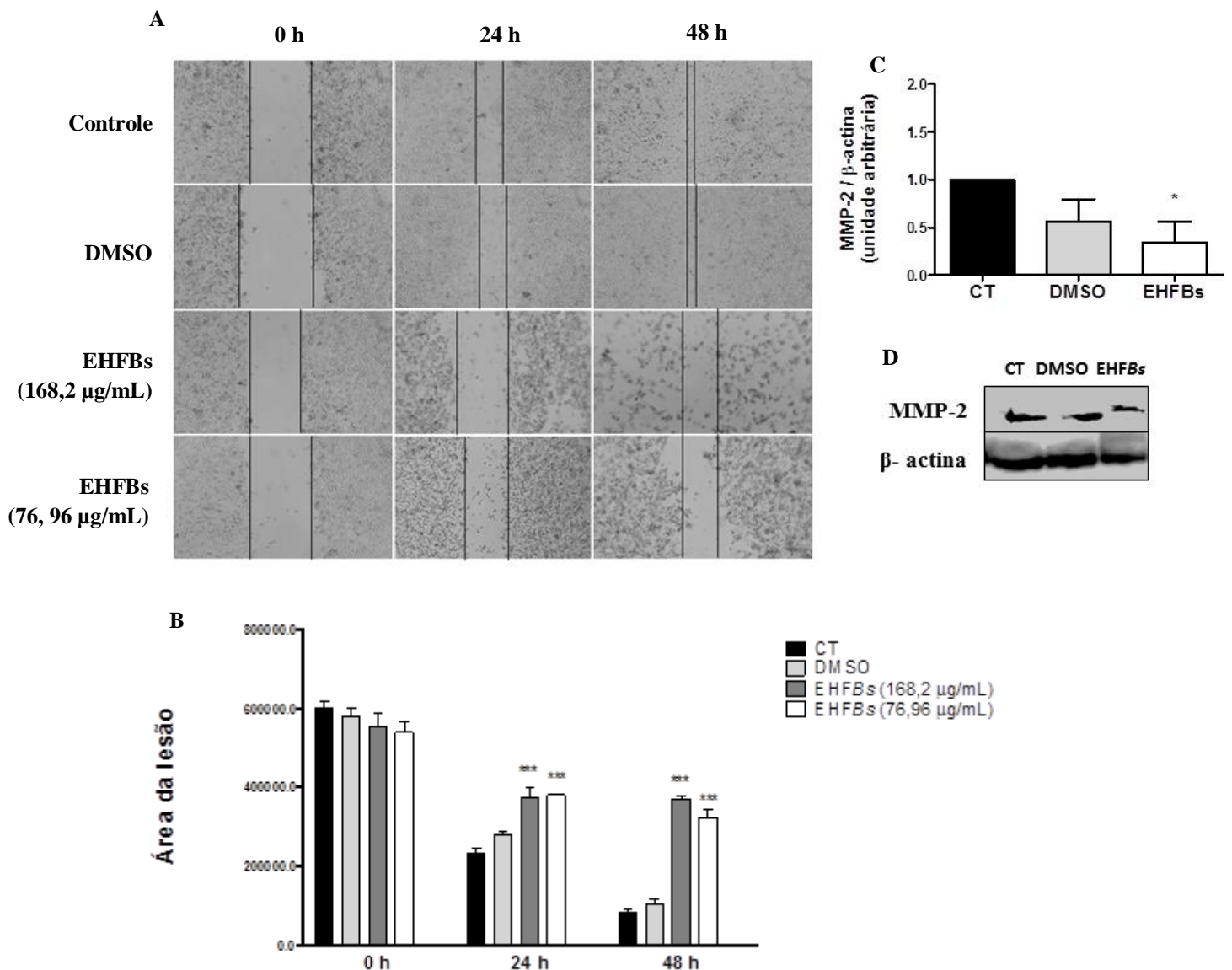


Figura 22. O EHFBS reduz a migração celular e níveis de expressão de MMP-2 em células tumorais de mama MDA-MB-231. As células foram tratadas com 168,2 $\mu\text{g/mL}$ e 76,96 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS por 24 e 48 horas, respectivamente. O progresso da migração celular foi observado nos tempos de 0, 24 e 48 horas após o tratamento. (A) Imagens representativas da migração das células utilizando microscópio óptico invertido e (B) representação gráfica do fechamento da lesão expresso como a área da lesão utilizando o software Image J. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. Para o ensaio de Western Blotting, as células MDA-MB-231 foram tratadas com 76,96 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS por 48 horas a fim de detectar o nível de expressão de MMP-2. (C) A análise densitométrica de cada banda foi realizada utilizando o software Image J e os resultados expressos como unidade arbitrária normalizadas pela β -actina. Os imunoblottings (D) são representativos de 3 experimentos. * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, em relação ao controle.

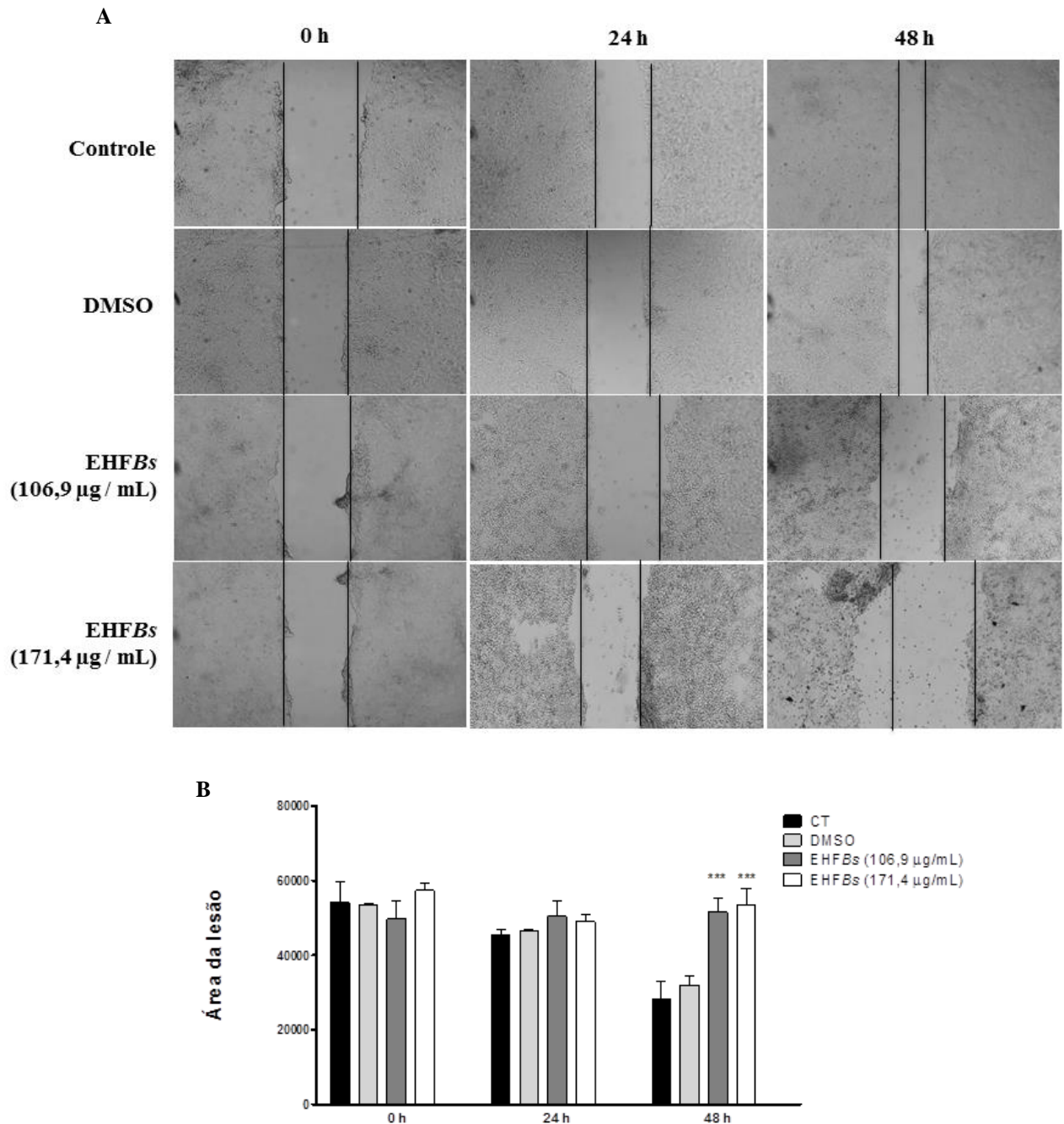


Figura 23. O EHFBs reduz a migração em células tumorais de mama MCF-7. As células foram tratadas com 106,9 µg/mL e 171,4 µg/mL de EHFBs por 24 e 48 horas, respectivamente. O progresso da migração celular foi observado nos tempos de 0, 24 e 48 horas após o tratamento. (A) Imagens representativas da migração das células utilizando microscópio óptico invertido e (B) representação gráfica do fechamento da lesão expresso como a área da lesão utilizando o software Image J. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. *** $p < 0,0001$, em relação ao controle.

5.6 Efeito do EHFBS nos diferentes tipos de morte celular das linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

Investigamos o tipo de morte celular induzido pelo EHFBS nas linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 (**Figura 24 A-F**) e MCF-7 (**Figura 25 A-F**). Foram realizados ensaios com os marcadores fluorescentes Anexina-V FITC (isotiocianato de fluoresceína) e iodeto de propídeo (PI). Sabe-se que a Anexina-V é capaz de ligar-se à fosfatidilserina, que é translocada para superfície externa da membrana plasmática em situações de apoptose inicial. Ao passo que o PI é uma substância capaz de se ligar ao DNA em função da perda da integridade da membrana plasmática celular, característica em situações de necrose.

Conforme observado na **Figura 24D**, nas células MDA-MB-231, o tratamento com 168,2 $\mu\text{g/mL}$ do EHFBS, por 24 horas, ocasionou uma redução de 2,4 vezes no número de células positivas para PI quando comparadas com as células não tratadas. Ainda, de forma mais notável, ocorreu o aumento em aproximadamente 28 vezes a dupla marcação com Anexina-V⁺/PI⁺ em relação ao controle (**Figura 24E**), o que nos leva a sugerir que o EHFBS desencadeou morte celular nessas células por apoptose tardia. Curiosamente, nas células MDA-MB-231, os resultados por Western Blotting mostraram que em comparação com o controle a expressão de pró-caspases 3 e pró-caspase 9 diminuíram 1,25 e 2,5 vezes, respectivamente (**Figura 24G e H**).

Nas células MCF-7 tratadas com 106,9 $\mu\text{g/mL}$ do EHFBS resultou no aumento considerável de 46 vezes no número de células marcadas para Anexina-V⁺/PI⁺, o que nos leva a sugerir uma possível morte celular por apoptose tardia (**Figura 25E**), além de aumentar em 3,3 vezes a marcação de células positivas para Anexina-V, característica de morte por apoptose (**Figura 25F**).

Os resultados encontrados em ambas as linhagens celulares mostram morte celular por apoptose tardia/necrose causada pelo EHFBS considerando que ocorreu, de forma mais expressiva, o aumento de células com dupla marcação para Anexina-V⁺/PI⁺.

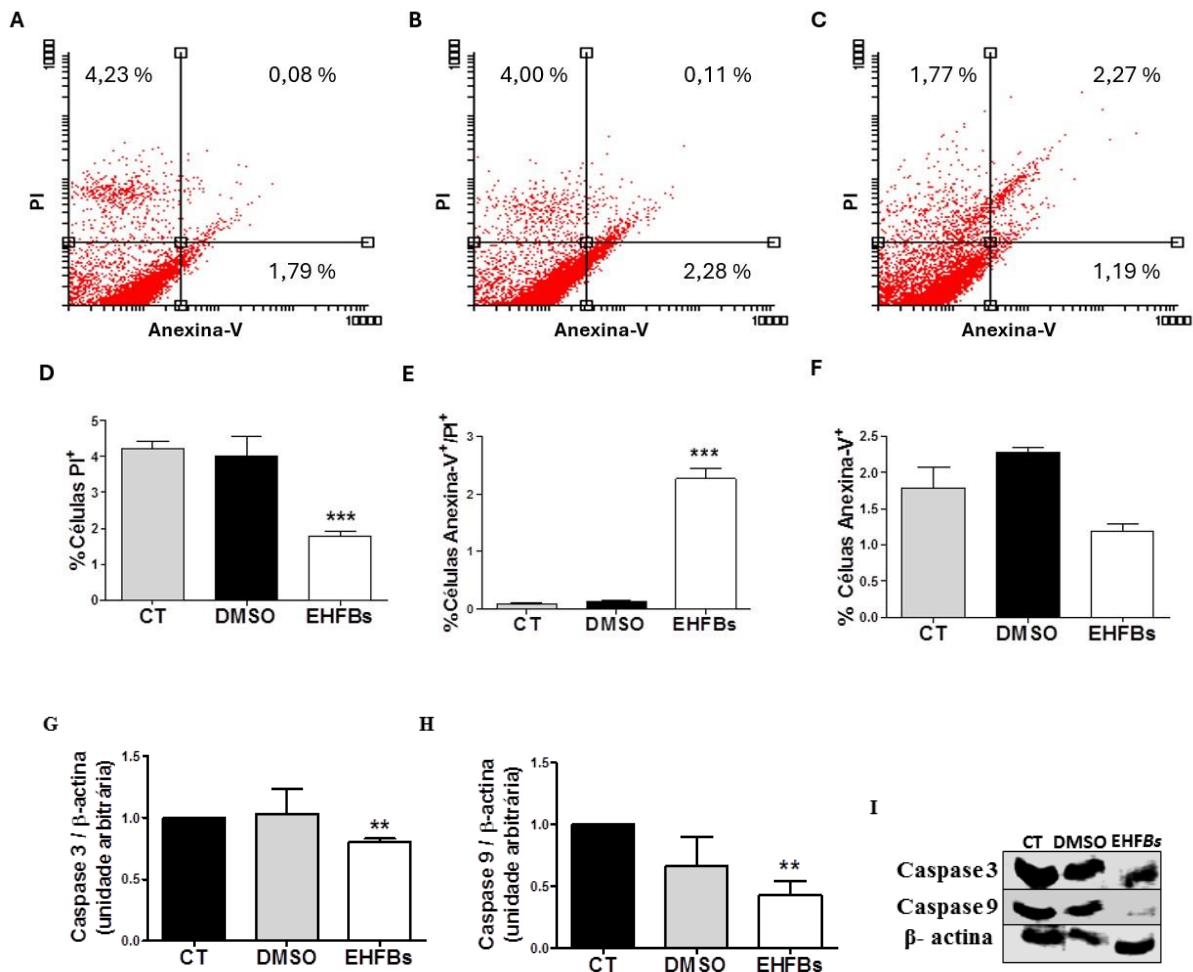


Figura 24. O EHFBS induz apoptose e altera os níveis de expressão de Caspase 3 e 9 em células de câncer de mama MDA-MB-231. As células foram tratadas ou não com 168,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do EHFBS por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI) e o resultado foi analisado em citômetro de fluxo BD FACScalibur (Becton and Dickson) e analisado usando o *software CellQuest*. (A-C) Dot plots são representativos de três experimentos independentes. Células PI⁺ (D), células Anexina-V⁺/PI⁺ (E) e células Anexina-V⁺ (F). Para o ensaio de Western Blotting as células MDA-MB-231 foram tratadas com 168,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EHFBS por 24 horas a fim de detectar o nível de expressão de Caspase 3 (G) e Caspase 9 (H) nas células. A análise densitométrica de cada banda foi realizada utilizando o software Image J e os resultados expressos como unidade arbitrária normalizadas pela β -actina. Os imunoblottings (I) são representativos de 3 experimentos. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, em relação ao controle.

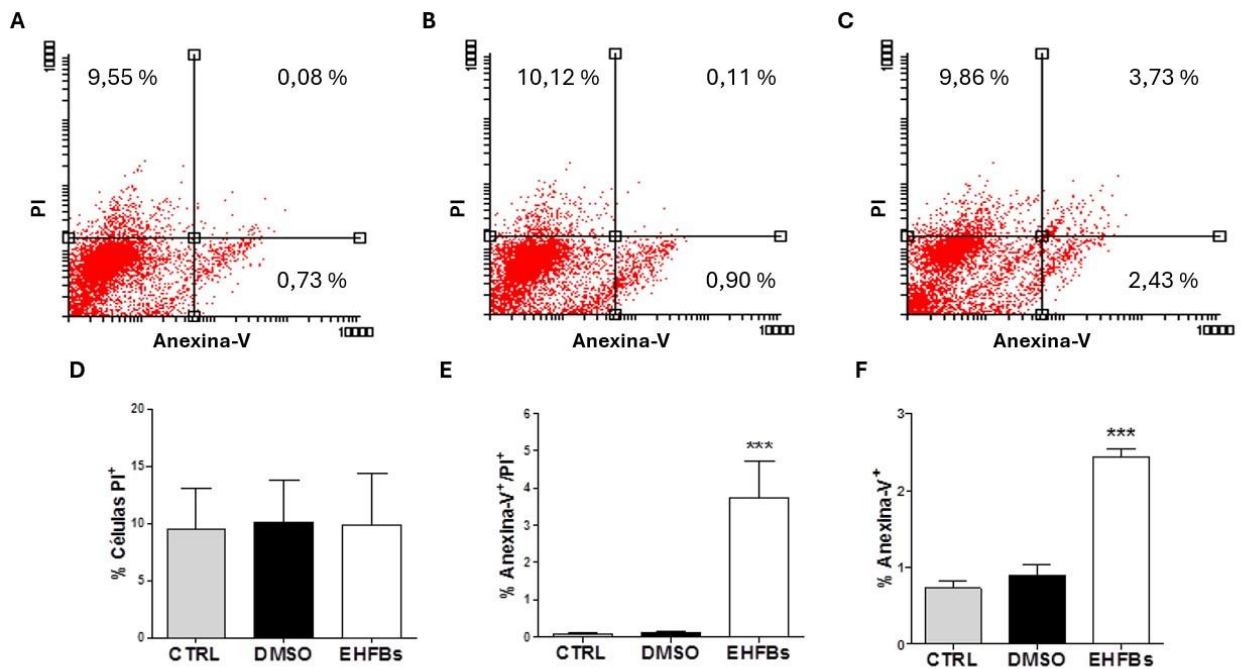


Figura 25. O EHFBS induz apoptose em células de câncer de mama MCF-7. As células foram tratadas ou não com 106,9 $\mu\text{g/mL}$ do EHFBS por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI) e o resultado foi avaliado em citômetro de fluxo BD FACScalibur (Becton and Dickson) e analisado usando o *software CellQuest*. (A-C) Dot plots são representativos de três experimentos independentes. Células PI⁺ (D), células Anexina-V⁺/PI⁺ (E) e células Anexina-V⁺ (F). Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. *** $p < 0,0001$, em relação ao controle.

5.7 Efeito do extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBS) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7

Para avaliar o efeito do EHFBS sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), as células foram tratadas com seus respectivos IC₅₀ durante 3 horas e em seguida marcadas com a sonda DCFDA e analisadas em citômetro de fluxo.

Dessa forma, as células MDA-MB-231 foram tratadas com 168,2 e 76,96 $\mu\text{g/mL}$ de EHFBS, por 3 horas. Após os tratamentos, o EHFBS reduziu em 1,36 vezes e aumentou em 1,09 vezes a produção de EROS, respectivamente, em relação ao controle (**Figura 26A**). Enquanto que o tratamento com 171,4 $\mu\text{g/mL}$ do EHFBS diminuiu em 3,86 vezes a produção de EROS, de forma significativa, após 3 horas de tratamento na linhagem celular MCF-7

(Figura 26B). Esses achados indicam que possivelmente, na linhagem celular MCF-7, o tratamento com EHFBS exerceu um padrão dependente da dose e do tempo sobre a produção de EROS.

Logo, em ambas as linhagens celulares do presente estudo, o EHFBS exerceu atividade antioxidante devido à redução de EROS. Contudo, na linhagem celular MDA-MB-231 observou-se que a dose menor do extrato pode favorecer o aumento na produção de EROS, enquanto que ocorreu o inverso nas células MCF-7.

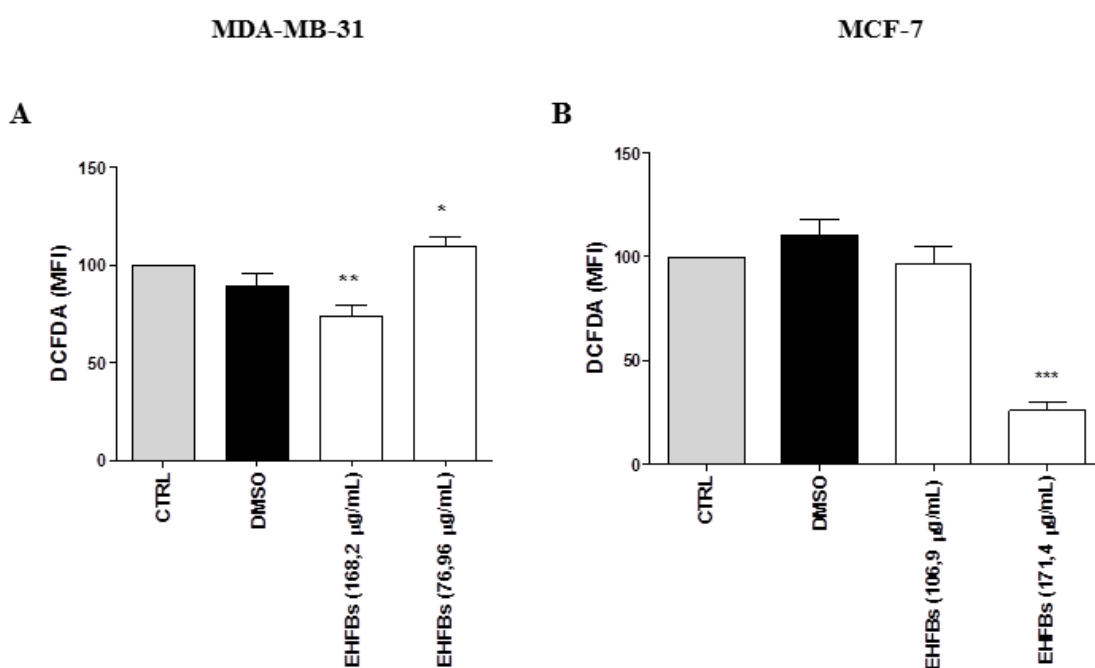


Figura 26. Efeito do extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBS) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de câncer de mama MDA-MB-231 (A) e MCF-7 (B). As células foram tratadas com 1% de DMSO, ou EHFBS com suas respectivas concentrações de IC₅₀ por 3 horas. Após, as células foram marcadas com 50 µM da sonda 2',7'-diacetato de diclorofluorescina (DCFDA) e a produção de EROS foi imediatamente avaliada em citômetro de fluxo BD FACScalibur (Becton and Dickson) e analisado usando o *software CellQuest*. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes. ***p < 0,0001, em relação ao controle.

6. DISCUSSÃO

A espectrometria de massas é considerada uma ferramenta essencial para identificar possíveis estruturas químicas de substâncias presentes em produtos naturais. Por meio desta técnica é possível comparar espécie de plantas de um mesmo gênero ou família através de seus constituintes químicos (MENDONÇA et al., 2021). Neste trabalho, utilizamos extratos brutos hidroalcoólicos de diferentes espécies endêmicas na Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, pertencentes à mesma ordem filogenética. Em nosso estudo, a técnica LC-MS/MS foi empregada para nos nortear nas tentativas de identificação de compostos presentes nos extratos hidroalcoólicos de frutos verdes da *Bonnetia stricta* e folhas da *Clusia lanceolata*. Observamos a presença de duas classes químicas principais, flavonoides e triterpenos nos modos de ionização negativo e positivo.

Após o processamento e alinhamento das nossas amostras e comparação com a literatura, propomos a anotação das flavonas isovitexina e orientina, observadas em ambos os extratos, através do seu perfil de fragmentação que mostrou perdas características de flavonas C-glicosiladas, em que se observa a perda principalmente de fragmentos em porções de açúcares (90 Da) e (120 Da). Enquanto que na vitexina-2-O-ramnosídeo ocorreu à perda de 120 Da, ramnose (146 Da) e hexose (162 Da), característico de fragmentação C e O-glicosídica. Esses resultados são corroborados com os dados publicados na literatura, inclusive na espécie *Clusia lanceolata* e sugerem fortemente que essas substâncias podem estar presentes nos extratos analisados nesta dissertação (BERENQUER-RIVAS et al., 2021; FERREIRA et al., 2014; YING et al, 2007, SHA et al., 2022, DA SILVEIRA et al., 2010). Os espectros MS dos compostos propostos encontram-se no material suplementar.

Propomos também o triterpenoide, ácido oleanólico, como um dos constituintes químicos em ambos os extratos, devido às perdas observadas semelhante às vistas por Abdel e colaboradores (2023), no qual mostraram um fragmento em m/z 457 $[M+H]^+$ que devido à perda de H_2O gera o fragmento m/z 439. Também foram observados fragmentos iônicos a m/z 248 resultantes da clivagem através da reação retro-Diels-Alder seguido pelo fragmento m/z 203 devido à perda do grupo carboxílico $[248-COOH]$ ao passo que a perda de água do outro fragmento da reação retro-Diels-Alder produziu o pico em m/z 189 (THANAKIJCHAROENPATH & THEANPHONG, 2007, SILVA et al., 2010). Os espectros MS dos compostos propostos encontram-se no material suplementar.

Produtos naturais, incluindo fitoquímicos como flavonoides e terpenos, são amplamente estudados como possíveis agentes anticancerígenos eficazes, e constituem-se potenciais fontes

para o tratamento do câncer devido às maiores chances de eficácia, baixo custo e efeitos colaterais mínimos. Já foi descrito que flavonoides, como a vitexina e isovitexina, são componentes ativos em medicamentos chineses tradicionais e encontradas em diversas plantas (HE et al., 2016).

Os efeitos contra o câncer foram relatados em modelos *in vitro* e *in vivo* por meio de múltiplos mecanismos, como a promoção da apoptose e autofagia, parada do ciclo celular, inibição da proliferação e migração celular e modulação de vias de sinalização (HE et al., 2016, GHANBARI-MOVAHED et al., 2023). No câncer de mama, a isovitexina proporcionou efeito antiproliferativo em cultura de células de câncer de mama MCF-7, por meio da redução negativa de proteínas envolvidas na via de sobrevivência celular Akt/ β – catenina (CHOWJAREAN & SABABPOD, 2021).

O ácido oleanólico é um triterpenoide pentacíclico com efeitos na saúde humana, incluindo anticâncer, proteção hepática, anti-inflamatório, antioxidante, melhora do desempenho cardíaco, antiviral, antidiabetes e antibacteriano (TANG et al., 2022). Alguns desses estudos evidenciaram o efeito anticâncer do ácido oleanólico em linhagens celulares de câncer de mama humano MCF-7 e resistente à adriamicina (ADR) MCF-7/ADR, linhagem celular de astrocitoma 1321N1, carcinoma hepatocelular, células de câncer colorretal HCT-116, entre outras (TANG et al., 2022). No câncer de mama, o ácido oleanólico apresentou efeitos citotóxicos contra células Hs578T e MDA-MB-231, inibiu a sobrevivência e proliferação de células MCF-7 e MDA-MB-231 pela parada do ciclo celular, aumentou a apoptose, reduziu a produção de EROS e o dano oxidativo ao DNA (PARIKH et al., 2014).

Através das nossas anotações e das atividades relatadas anteriormente pela isovitexina, vitexina e ácido oleanólico, podemos sugerir que os efeitos induzidos pelo EHFBS, discutidos abaixo, podem, possivelmente, serem atribuídos a esses fitoquímicos.

Quanto às atividades biológicas, primeiramente buscamos investigar se os extratos EHFBS e EHFCl teriam efeito sobre a viabilidade nas duas linhagens celulares de câncer de mama utilizadas neste estudo, uma agressiva e metastática (MDA-MB-231) e outra menos agressiva e mais responsiva a tratamentos (MCF-7). Nossos resultados demonstraram que ambos os extratos foram capazes de reduzir o número de células tumorais nas condições utilizadas, e curiosamente exerceram efeito citotóxico mais notável nas células MDA-MB-231, tendo o EHFBS efeito mais promissor. Assim, sugerimos um efeito seletivo para as células agressivas MDA-MB-231.

Diferentes extratos obtidos de plantas exibiram atividade citotóxica contra diversas linhagens celulares de câncer, incluindo o de mama. Por exemplo, o extrato etanólico da

Hypericum sampsonii (Hypericaceae) conferiu citotoxicidade contra 5 linhagens tumorais incluindo melanoma (A375), câncer de mama (MDA-MB-231) e cervical (SiHa) com IC₅₀ de 52,35, 59,33 e 30,24 µg/mL, respectivamente (CHEN et al., 2020). Balhamar e colaboradores (2019) observaram que o uso da fração de diclorometano das folhas de *Acridocarpus orientalis* atuou de forma citotóxica nas células MCF-7 e MDA-MB-231, sendo o valor de IC₅₀ nesta última linhagem celular de 201,5 µg/mL em 24 horas, concentração essa 1,2 vezes maior que a observada em nossos dados. Ainda, essa mesma fração também exerceu efeito citotóxico para linhagem não tumoral (MCF-10A).

Embora não tenhamos encontrado, até o momento da elaboração dessa dissertação, dados na literatura científica sobre atividade biológica da espécie *Bonnetia stricta*, plantas de outras famílias, que pertencem ao mesmo clado da Bonnetiaceae (RUHFEL et al., 2011), já possuem atividades descritas contra linhagens celulares de câncer. Darwati e colaboradores (2022) demonstraram que um composto isolado da casca e caule da *Garcinia porrecta* (Clusiaceae) apresentou atividade citotóxica contra a linhagem celular MCF-7, com um valor de IC₅₀ de 119,3 µg/mL após 24 horas de tratamento, concentração similar à encontrada neste estudo. Outro estudo relatou atividade antiproliferativa significativa de três xantonas (α -mangostina, β -mangostina, mangaxantona B) e uma benzofenona (mangafenona), isoladas das cascas do caule de espécies de *Garcinia*, por meio do ensaio de MTT em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, com valores de IC₅₀ variando de 4,4 a 12,0 µM (SEE et al., 2021).

Curiosamente, em nosso estudo notamos que o EHFBS possivelmente exibe ação citostática nas células MCF-7. Mabasa e colaboradores (2021) observaram que após o tratamento com a fração n-butanol de *R. communis*, as células BUD-8 (fibroblastos humanos), demonstraram recuperar sua capacidade proliferativa em tempo de incubação prolongado (48 horas), isto pode sugerir que essas células podem ter desenvolvido a capacidade de resistir ao efeito inibidor do extrato.

Após ter sido demonstrado que o EHFBS diminui a viabilidade de células de câncer de mama, investigamos se esse extrato poderia suprimir a capacidade de migração das células MDA-MB-231 e MCF-7. Sabe-se que a migração celular é um dos primeiros passos na metástase do câncer e que esta é favorecida pelo aumento da expressão de enzimas que degradam a matriz celular, como as metaloproteinases (MAJUMDER et al., 2019). Com isso, metaloproteinases de matriz, principalmente MMP2 e MMP9, receberam grande interesse no seu envolvimento em relação a invasividade e metástase (MABASA et al., 2021).

Conforme observado em nossos resultados, o EHFBS demonstrou ser eficaz em inibir a atividade migratória nas duas linhagens de células tumorais. Em adição, reduziu a expressão

da metaloproteinase MMP2 na linhagem celular triplo negativo e metastática. Isso nos leva a sugerir sua provável aplicação no manejo de células cancerígenas altamente agressivas. Resultados correlatos foram vistos na literatura com extratos vegetais e compostos bioativos em que a migração de células de câncer de mama foi inibida de forma significativa dependente da dose por meio da regulação negativa de MMP2 e MMP9 (MAJUMDER et al., 2019, MABASA et al., 2021, GULL et al., 2024).

O ciclo celular é um processo fisiológico crucial que controla a proliferação, o crescimento e a sobrevivência das células (ZHENG et al., 2020). Portanto, a utilização de potenciais candidatos terapêuticos que possam intervir nesse mecanismo torna-se necessário. Notamos que nas duas linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7, o EHFBS conferiu efeito semelhante na distribuição do ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M, no mesmo tempo de tratamento. Com isso, sugerimos que o extrato inibiu a capacidade de proliferação dessas células e inibição da mitose dependente do tempo e que um bloqueio orquestrado em G1 pode resultar em morte celular. Outros estudos demonstraram resultados consistentes com nossas descobertas em linhagens celulares de câncer, incluindo de mama (ZHENG et al., 2020, ESPINOSA-PAREDES et al., 2021).

Sabe-se que a progressão do ciclo celular é controlada por muitas ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (DING et al., 2020). Na linhagem celular MDA-MB-231, o aumento da porcentagem de células na fase sub-G0/G1, G0/G1 e redução na fase S e G2/M também foram observados nos resultados publicados pelo grupo de Li e colaboradores (2022) com células de câncer colo do útero, após o tratamento com o alcaloide isoliensinina. Entretanto, em nossos resultados, a regulação de ciclinas e CDKs ocorreu de forma inversa à identificada por Li e colaboradores (2022). Contudo, outro estudo demonstrou que a doxorubicina foi capaz de induzir morte celular de dois modos distintos em células de hepatoma em função da dose utilizada. Um desses modos foi através de catástrofe mitótica pela regulação positiva de Cdc2 e Cdk2 em paralelo à expressão de ciclina A, no qual estimulou as células a tentarem entrar prematuramente na mitose levando à divisão nuclear aberrante, falha na citocinese e morte celular não apoptótica, corroborando com os resultados observados em nosso trabalho (PARK & EOM & CHOI, 2005).

Em relação à morte celular, a apoptose exhibe características morfológicas distintas, como condensação de cromossomos, núcleo fragmentado, formação de bolhas na membrana plasmática, encolhimento celular e formação de corpos apoptóticos. Enquanto que, no processo de necrose ocorre formação visível de vacúolos, inchaço das organelas e perda da integridade da membrana plasmática (BHOSALE et al., 2022). Nossas descobertas revelaram

que o EHFBS induziu alterações morfológicas nas linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7 incluindo aparecimento de corpos apoptóticos, encolhimento celular, alterações citoplasmáticas com formação de vacúolos, redução da população celular e condensação da cromatina quando comparadas as células não tratadas. Foi possível observar também, com o aumento do tempo de tratamento, alterações mais marcantes, incluindo ruptura celular. Alterações similares, como encolhimento celular e condensação da cromatina, foram observadas em células HCT116 (carcinoma de cólon) após o tratamento com óleos essenciais obtidos da casca e folhas de *Virola surinamensis* após 24 e 48 horas de tratamento (ANUNCIACÃO et al., 2020).

Também foram vistas mudanças semelhantes aos nossos resultados nas características morfológicas como encolhimento celular, formação de bolhas na membrana, formação de corpos apoptóticos e lise celular em células tumorais de mama MCF-7, após o tratamento com extrato de semente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e fração n-butanol de *Ricinus communis* (SILVA et al., 2021, MABASA et al., 2021). As alterações na morfologia das células observadas podem indicar o processo de morte desencadeado após o tratamento com EHFBS, contudo o tipo de morte celular foi analisado por citometria de fluxo utilizando Anexina V/PI.

Os ensaios de viabilidade celular, análise morfológica e alterações no ciclo celular revelaram morte celular consistentes com os resultados de dupla marcação com Anexina-V/PI. Verificou-se que o tratamento com EHFBS pode aumentar a população de células cancerígenas em apoptose tardia ou necrose dependente da dose e tempo nas duas linhagens celulares usadas no presente trabalho. Kushwaha e colaboradores (2020) reportou que linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7 apresentaram o número de células aumentado tanto na fase apoptótica inicial quanto tardia, juntamente com um aumento no número de células necróticas, envolvendo a regulação negativa de pró-caspase-3 desencadeada por alcaloides derivados de plantas.

Outros autores também relataram indução de apoptose tardia em células tumorais, incluindo de mama, após o uso de substâncias derivadas de material vegetal (BRONOWICKA-ADAMSKA et al., 2020; GUEFACK et al., 2024). Como utilizamos nesta dissertação, anticorpos contra pró-caspases 3 e 9, supomos que o EHFBS poderia modular a expressão dessas enzimas na forma clivada, contribuindo assim com os efeitos obtidos na via de morte celular (KUSHWAHA et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

Sabe-se que a produção equilibrada de EROS é essencial na regulação dos processos celulares normais, incluindo a progressão do ciclo celular e a resposta imune. No entanto, a desregulação deste processo leva ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas não

transmissíveis, incluindo o câncer. Dentre as ações biológicas descritas para esses compostos encontra-se a remoção de EROS (XI et al., 2022). Algumas dessas classes de fitoquímicos, como os flavonoides, podem conferir efeito antioxidante atuando na redução de EROS em células tumorais de mama. Pressupõe-se que esses efeitos resultam pela desativação da via do NF- κ B culminando na diminuição da expressão dos genes antiapoptóticos (XIAP e Bcl-2) e no acúmulo de Bax, ou a diminuição das EROS também pode causar disfunção mitocondrial e levar a apoptose pela ativação da caspase-3 (CHO et al., 2014, QIU et al., 2019).

Em relação ao objetivo geral desta dissertação, verificou-se que o EHFBS possui efeito *in vitro* contra as linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7, possivelmente por sua composição fitoquímica prevista, sendo ela majoritariamente composta por flavonoides. Sugerimos que este estudo possa contribuir para novos ensaios que explorem a utilização da espécie *Bonnetia stricta* como possível fonte de constituintes químicos que sejam seguros e eficazes para ensaios *in vivo* e futuros ensaios clínicos com fins terapêuticos contra o câncer de mama.

7. CONCLUSÃO

A análise fitoquímica nos leva a sugerir que os extratos possuem semelhanças em seus constituintes químicos, principalmente flavonoides e que possivelmente eles são os responsáveis pelas atividades observadas. Nossos resultados revelaram que o extrato hidroalcoólico dos frutos da *Bonnetia stricta* (EHFBS) foi capaz de reduzir a viabilidade de células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7, tendo efeito mais promissor nas células mais agressivas. Em suma, o presente trabalho demonstrou que o EHFBS levou a alterações na morfologia das células com características de morte celular, reduziu a migração celular, sendo que na MDA-MB-231 foi através da regulação negativa da proteína MMP-2 que favorece a invasão e metástase, promoveu parada do ciclo celular e morte celular indicativa de apoptose tardia ou necrose. Com o nosso trabalho queremos ressaltar que plantas presentes no bioma da Mata Atlântica do Rio de Janeiro, como a *Bonnetia stricta*, possam ser candidatas para o isolamento dos seus principais compostos com potencial atividade contra linhagens celulares de câncer de mama.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A fim de submissão do artigo que envolva os resultados com o EHF_Bs, pretendemos:

- Realizar o ensaio de viabilidade celular na linhagem celular não tumoral MCF-10A;
- Repetir os resultados de Western Blotting na linhagem celular MDA MB-231 e analisar mais proteínas, como MMP-9, P53, PI3K, AKT, mTOR e P53, que corroborem com os resultados de proliferação e migração celular, alteração no ciclo celular e morte celular;
- Fazer a análise de Western Blotting das mesmas proteínas utilizadas na linhagem celular MDA MB-231, com a linhagem celular MCF-7;
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial, relacionar com o resultado de produção de EROS e morte celular;
- Identificar o tipo de morte celular (PI/Anexina V) com o IC₅₀ de 48h, em ambas as linhagens celulares;
- Confirmar a presença das substâncias anotadas por LC-MS/MS utilizando os padrões comerciais já encomendados na Sigma Aldrich;

Com o EHF_{Cl}, mais experimentos devem ser realizados a fim de obtermos um conjunto de resultados passível de publicação. Possivelmente, esses experimentos serão realizados por outro aluno no laboratório.

- Realizar o ensaio de viabilidade celular na linhagem celular não tumoral MCF-10A;
- Realizar o ensaio de Azul de tripan nas células MDA-MB-231 e MCF-7;
- Avaliar a migração celular nas células MDA-MB-231;
- Analisar o ciclo celular nas células MCF-7;
- Identificar o tipo de morte celular (PI/Anexina V);
- Fazer Western Blotting de metaloproteínas, ciclinas, CDKs e caspases, as mesmas utilizadas neste trabalho com o EHF_Bs;
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial;
- Realizar o ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio;
- Confirmar a presença das substâncias anotadas por LC-MS/MS utilizando os padrões;

REFERÊNCIAS

ABDEL GHANI, Afaf E. et al. UPLC-ESI-MS/MS profiling and cytotoxic, antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, and antiobesity activities of the non-polar fractions of *Salvia hispanica* L. aerial parts. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1062, 2023.

ABDEL-SATTAR, Ola E. et al. Cytotoxic and chemomodulatory effects of *Phyllanthus niruri* in MCF-7 and MCF-7^{ADR} breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 2683, 2023.

ALAM, Sarfaraz; KHAN, Feroz. QSAR and docking studies on xanthone derivatives for anticancer activity targeting DNA topoisomerase II α . **Drug Design, Development and Therapy**, p. 183-195, 2014.

ALENCAR, Ana Cláudia; NASCI MENTO-JÚNIOR, José Elvino do; MARINHO, Lucas Cardoso. Flora of Espírito Santo: Clusiaceae. **Rodriguésia**, v. 74, p. e00552022, 2023.

ANHOLETI, Maria Carolina et al. Chemosystematic aspects of polyisoprenylated benzophenones from the genus *Clusia*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 289-301, 2015.

ANUNCIACÃO, Talita A. et al. In vitro and in vivo inhibition of HCT116 cells by essential oils from bark and leaves of *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 262, p. 113166, 2020.

ARON, Allegra T. et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954-1991, 2020.

ATCC - American Type Culture Collection, 2024a. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/htb-22>>. Acessado em 24 jun. 2024.

ATCC - American Type Culture Collection, 2024b. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/htb-26>>. Acessado em 24 jun. 2024.

BALHAMAR, Sameera Omar Mohammed Saeed et al. Differential cytotoxic potential of *Acridocarpus orientalis* leaf and stem extracts with the ability to induce multiple cell death pathways. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3976, 2019.

BEN-DROR, Judith; SHALAMOV, Michal; SONNENBLICK, Amir. The history of early breast cancer treatment. **Genes**, v. 13, n. 6, p. 960, 2022.

BERENGUER-RIVAS, Clara Azalea et al. Anti-inflammatory effect of *Adelia ricinella* L. aerial parts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, n. 4, p. 553-559, 2021.

BHATIA, Muskan et al. Curcumin and cancer biology: Focusing regulatory effects in different signalling pathways. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 4913-4929, 2021.

BHOSALE, Pritam Bhagwan et al. Apigenin promotes TNF α -induced apoptosis, necroptosis, G2/M phase cell cycle arrest, and ROS generation through inhibition of NF- κ B pathway in Hep3B liver cancer cells. **Cells**, v. 11, n. 17, p. 2734, 2022.

BOGHDADY, Noha Ahmed El. Antioxidant and antiapoptotic effects of proanthocyanidin and ginkgo biloba extract against doxorubicin-induced cardiac injury in rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 4, p. 344-351, 2013.

BRASIL. **Horto Botânico do Museu Nacional/UFRJ**. *Clusia lanceolata*. Disponível em: <<https://museunacional.ufrj.br/hortobotanico/restinga/clusialanceolata.html>>. Acessado em: 24 jun. 2024.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.

BRONOWICKA-ADAMSKA, Patrycja et al. Effect of S-allyl-L-cysteine on MCF-7 cell line 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase/sulfane sulfur system, viability and apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1090, 2020.

BURSTEIN, H. J. et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. **Annals of Oncology**, v. 32, n. 10, p. 1216-1235, 2021.

BUYEL, J. F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 506-520, 2018.

CAI, Liming et al. Widespread ancient whole-genome duplications in Malpighiales coincide with Eocene global climatic upheaval. **New Phytologist**, v. 221, n. 1, p. 565-576, 2019.

CAMARILLO, Ignacio G. et al. Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: An in vitro model study. **Electroporation-Based Therapies for Cancer**, p. 55-102, 2014.

CARVALHO, Meriane P. et al. Anthraquinones and xanthone from *Bonnetia stricta* and their chemosystematic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 73-75, 2013.

CASANOVA, Fabiana et al. Resveratrol chemosensitizes breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 8, p. 2586-2596, 2012.

CHEN, Qian et al. Chemical constituents with cytotoxic and anti-inflammatory activity in *Hypericum sampsonii* and the antitumor potential under the view of cancer-related inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, p. 112948, 2020.

CHO, Sung-Gook; WOO, Sang-Mi; KO, Seong-Gyu. Butein suppresses breast cancer growth by reducing a production of intracellular reactive oxygen species. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, p. 1-11, 2014.

CHOWJAREAN, Verisa; SADABPOD, Kamala. Antiproliferative effect of *Grammatophyllum speciosum* ethanolic extract and its bioactive compound on human breast cancer cells. **The Scientific World Journal**, v. 2021, n. 1, p. 3752169, 2021.

COELHO, Marcus A. Nadruz et al. Flora do estado do Rio de Janeiro: avanços no conhecimento da diversidade. **Rodriguésia**, v. 68, p. 1-11, 2017.

COSTA, Paula Seixas da et al. Pro-oxidant effect of resveratrol on human breast cancer MCF-7 cells is associated with CK2 inhibition. **Nutrition and Cancer**, v. 74, n. 6, p. 2142-2151, 2022.

DA COSTA, Grênivel Mota et al. Flora da Bahia: Bonnetiaceae. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 77-79, 2010.

DA SILVEIRA, C. V. et al. Secondary plant substances in various extracts of the leaves, fruits, stem and bark of *Caraipa densifolia* Mart. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1597-1606, 2010.

DAHAM, Saad S. et al. β -Caryophyllene induces apoptosis and inhibits angiogenesis in colorectal cancer models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10550, 2021.

DARWATI, Darwati et al. Effectiveness and anticancer activity of a novel phenolic compound from *Garcinia porrecta* against the MCF-7 breast cancer cell line in vitro and in silico. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 3523-3533, 2021.

DE ALCANTARA GUIMARÃES, André Luis et al. Characterisation of the effects of leaf galls of *Clusiamyia nitida* (Cecidomyiidae) on *Clusia lanceolata* Cambess. (Clusiaceae): Anatomical aspects and chemical analysis of essential oil. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 208, n. 3, p. 165-173, 2013.

DE LIMA FILHO, Orlando Carvalho et al. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* sobre células de câncer mamário MCF-7. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 4699-4727, 2020.

DE QUEIROZ, José Carlos Eloi; LEITE, José Roberto SA; VASCONCELOS, Andreeane Gomes. Prospecting plant extracts and bioactive molecules with antimicrobial activity in brazilian biomes: a review. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 427, 2023.

DERAKHSHAN, Fatemeh; REIS-FILHO, Jorge S. Pathogenesis of triple-negative breast cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 17, p. 181-204, 2022.

DING, Lei et al. The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 6, p. 1960, 2020.

DOI, Hitoshi et al. Panaxanthone isolated from pericarp of *Garcinia mangostana* L. suppresses tumor growth and metastasis of a mouse model of mammary cancer. **Anticancer Research**, v. 29, n. 7, p. 2485-2495, 2009.

DOMINGO-FERNÁNDEZ, Daniel et al. Natural Products Have Increased Rates of Clinical Trial Success throughout the Drug Development Process. **Journal of Natural Products**, 2024.

ENDRESS, Peter K.; DAVIS, Charles C.; MATTHEWS, Merran L. Advances in the floral structural characterization of the major subclades of Malpighiales, one of the largest orders of flowering plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 969-985, 2013.

ESPINOSA-PAREDES, Daniel Abraham et al. *Echinacea angustifolia* DC extract induces apoptosis and cell cycle arrest and synergizes with paclitaxel in the MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. **Nutrition and Cancer**, v. 73, n. 11-12, p. 2287-2305, 2021.

FERREIRA, Christian et al. Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: in vitro effect of its association with amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6197-6208, 2014.

FERREIRA, Rafaela O. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante in vivo de flavonoides isolados de *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 39, p. 1093-1097, 2016.

FERREIRA, Rafaela O. et al. Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 617-625, 2014.

FISUSI, Funmilola A.; AKALA, Emmanuel O. Drug combinations in breast cancer therapy. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 3-23, 2019.

FOTSING, Sorelle Ines et al. Breast cancer cell growth arrest and chemopreventive effects of *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae) ethanolic leaves extract on a rat model of mammary carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 311, p. 116408, 2023.

FROST, Christopher J. et al. Effects of β -caryophyllene and oxygen availability on cholesterol and fatty acids in breast cancer cells. **Plos One**, v. 18, n. 3, p. e0281396, 2023.

GAZZANEO, Luiz Rodrigo Saldanha; DE LUCENA, Reinaldo Farias Paiva; DE ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, p. 1-8, 2005.

GHANBARI-MOVAHED, Maryam et al. Anticancer potential of apigenin and isovitexin with focus on oncogenic metabolism in cancer stem cells. **Metabolites**, v. 13, n. 3, p. 404, 2023.

GUEFACK, Michel-Gael F. et al. *Hypericum roeperianum* bark extract suppresses breast cancer proliferation via induction of apoptosis, downregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling cascade and reversal of EMT. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 319, p. 117093, 2024.

GULL, Sheereen et al. Ethanolic extract of *Euphorbia royleana* Boiss. reduces metastasis of breast cancer cells and inhibits tumor progression in vivo. **Medical Oncology**, v. 41, n. 6, p. 152, 2024.

HANUŠOVÁ, Veronika et al. The effects of β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 828-836, 2017.

HE, Miao et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74-85, 2016.

HERBERT, LUIS ALFREDO; RODRÍGUEZ, Luis Manuel Peña. **Metabolitos bioactivos de Clusia spp.** 2021. Tese de Doutorado. CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN.

HOSTETLER, Gregory L.; RALSTON, Robin A.; SCHWARTZ, Steven J. Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 423-435, 2017.

I-FLORA (IQ-UFRJ). O Projeto. Disponível em: <<https://i-flora.iq.ufrj.br/oprojeto.html>> Acessado em: 24 de jun. 2024.

IMRAN, Muhammad et al. Apigenin as an anticancer agent. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 8, p. 1812-1828, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (2022). Gastos do SUS com cânceres que poderiam ser prevenidos com atividade física chegarão a R\$ 2,5 bilhões em 2030. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/gastos-do-sus-com-canceres-que-poderiam-ser-prevenidos-com-atividade-fisica-chegarao-a-r-2-5-bilhoes-em-2030>> Acessado em: 24 de jun. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>> Acessado em: 24 de jun. 2024.

JANUŠKEVIČIENĖ, Indrė; PETRIKAITĖ, Vilma. Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. **Life Sciences**, v. 239, p. 117009, 2019.

JIN, Dong-Min; JIN, Jian-Jun; YI, Ting-Shuang. Plastome structural conservation and evolution in the clusioid clade of Malpighiales. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2020.

JOO, Yong Hoon et al. UPLC-QTOF-MS/MS screening and identification of bioactive compounds in fresh, aged, and browned *Magnolia denudata* flower extracts. **Food Research International**, v. 133, p. 109192, 2020.

KATAJAMAA, Mikko; MIETTINEN, Jarkko; OREŠIČ, Matej. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. **Bioinformatics**, v. 22, n. 5, p. 634-636, 2006.

KAWIAK, Anna. Molecular research and treatment of breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9617, 2022.

KESSNER, Darren et al. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. **Bioinformatics**, v. 24, n. 21, p. 2534-2536, 2008.

KIM, Charissa et al. Chemoresistance evolution in triple-negative breast cancer delineated by single-cell sequencing. **Cell**, v. 173, n. 4, p. 879-893. e13, 2018.

KOCAN, Sema; AKTUG, Cemile; GURSOY, Ayla. “Who am I?” A qualitative meta-synthesis of Chemotherapy-induced alopecia and body image perception in breast cancer patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 31, n. 4, p. 237, 2023.

KUSHWAHA, Prem Prakash et al. Induction of apoptosis in breast cancer cells by naphthylisoquinoline alkaloids. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 409, p. 115297, 2020.

LIDLAW, Maggie; COCKERLINE, Carla A.; SEPKOVIC, Daniel W. Effects of a breast-health herbal formula supplement on estrogen metabolism in pre-and post-menopausal women not taking hormonal contraceptives or supplements: a randomized controlled trial. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 4, p. BCBCR. S6505, 2010.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

- LI, Feng et al. Emodin attenuates high lipid-induced liver metastasis through the AKT and ERK pathways in vitro in breast cancer cells and in a mouse xenograft model. **Heliyon**, v. 9, n. 6, 2023a.
- LI, Haoxiang et al. Rapid screening alpha-glucosidase inhibitors from *Polygoni vivipari* rhizoma by multi-step matrix solid-phase dispersion, ultrafiltration and HPLC. **Molecules**, v. 26, n. 20, p. 6111, 2021b.
- LI, Hong-Li et al. Isoliensinine induces cervical cancer cell cycle arrest and apoptosis by inhibiting the AKT/GSK3 α pathway. **Oncology Letters**, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2022.
- LIANZA, Mariacaterina et al. In vitro α -glucosidase inhibition by Brazilian medicinal plant extracts characterised by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 554-562, 2022.
- LIU, Qing et al. Emodin reduces breast cancer lung metastasis by suppressing macrophage-induced breast cancer cell epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell formation. **Theranostics**, v. 10, n. 18, p. 8365, 2020.
- LIU, Zeyu et al. A study on the relationship between chemotherapy-induced cognitive impairment and age in patients with breast cancer. **J. BUON**, v. 23, p. 1601-1605, 2018.
- LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 205, n. 2, p. 275-292, 2005.
- LOWRY, Oliver H.; ROSEBROUGH, Nira J. Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LV, Dan et al. Analysis of Clinical Trials Using Anti-Tumor Traditional Chinese Medicine Monomers. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 1997-2020, 2024.
- LYONS, Tomas G. Targeted therapies for triple-negative breast cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 20, n. 11, p. 1-13, 2019.
- MABASA, Rixile et al. *Ricinus communis* butanol fraction inhibits MCF-7 breast cancer cell migration, adhesion, and invasiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v. 20, p. 1534735420977684, 2021.
- MAJUMDER, Munmi et al. *Ricinus communis* L. fruit extract inhibits migration/invasion, induces apoptosis in breast cancer cells and arrests tumor progression in vivo. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 14493, 2019.
- MARINHO, Lucas Cardoso. Flora of Espírito Santo: Bonnetiaceae. **Rodriguésia**, v. 73, 2022.
- MASULLO, Milena et al. *Garcinia mangostana* L. fruits and derived food supplements: Identification and quantitative determination of bioactive xanthenes by NMR analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 218, p. 114835, 2022.
- MAUGHAN, Karen L.; LUTTERBIE, Mark A.; HAM, Peter S. Treatment of breast cancer. **American Family Physician**, v. 81, n. 11, p. 1339-1346, 2010.

MEHRAJ, Umar et al. Tumor microenvironment promotes breast cancer chemoresistance. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 87, p. 147-158, 2021.

MENDONÇA, Simony C. et al. Mass spectrometry as a tool for the dereplication of saponins from *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke bark and wood. **Phytochemical Analysis**, v. 32, n. 3, p. 262-282, 2021.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (BRASIL). Mata Atlântica. Brasil. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-ebiomias/ecossistemas/biomias/mata-atlantica>>Acessado em: 24 de jun. 2024.

MOHAMMED, Magdy MD et al. Comprehensive chemical profiling of *Bassia indica* Wight. aerial parts extract using UPLC-ESI-MS/MS, and its antiparasitic activity in *Trichinella spiralis* infected mice: in silico supported in vivo study. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, p. 161, 2023.

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

NAEEM, Abid et al. Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8367, 2022.

NAITO, Yoichi et al. Chemotherapy-induced nausea and vomiting in patients with breast cancer: a prospective cohort study. **Breast Cancer**, p. 1-7, 2020.

NEDELJKOVIĆ, Milica; DAMJANOVIĆ, Ana. Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer—how we can rise to the challenge. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 957, 2019.

NETO, Nestor José de Souza Barreto et al. Perfil epidemiológico dos subtipos moleculares de carcinoma ductal da mama em população de pacientes em Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 24, n. 4, p. 98-102, 2014.

NOBAKHT, Seyedeh Zahra et al. *Hypericum perforatum*: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 25, n. 9, p. 1045, 2022.

OMATA, Y. et al. Intra-and extracellular reactive oxygen species generated by blue light. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 77, n. 3, p. 470-477, 2006.

OVALLE-MAGALLANES, Berenice; EUGENIO-PÉREZ, Dianelena; PEDRAZA-CHAVERRI, José. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.): A comprehensive update. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 102-122, 2017.

PARAENSE, Luany Caroline Ribeiro et al. First genomic microsatellite markers developed for *Platonia insignis* (Clusiaceae), a Brazilian fruit tree. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 4, p. 2985-2989, 2020.

PARK, Seok Soon; EOM, Young-Woo; CHOI, Kyeong Sook. Cdc2 and Cdk2 play critical roles in low dose doxorubicin-induced cell death through mitotic catastrophe but not in high dose doxorubicin-induced apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 334, n. 4, p. 1014-1021, 2005.

PARIKH, Nisha R. et al. Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. **Phytochemistry reviews**, v. 13, p. 793-810, 2014.

PASSOS, Carlos Luan A. et al. Curcumin and melphalan cotreatment induces cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13446, 2023.

PASSOS, Carlos Luan Alves et al. Leishmanicidal effect of synthetic trans-resveratrol analogs. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0141778, 2015.

PAULS, Mehrnoosh; CHIA, Stephen; LEVASSEUR, Nathalie. Current and new novel combination treatments for metastatic triple-negative breast cancer. **Current Oncology**, v. 29, n. 7, p. 4748-4767, 2022.

PERES, Stela Verzinhasse et al. Molecular subtypes as a prognostic breast cancer factor in women users of the São Paulo public health system, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 26, p. e230028, 2023.

PERON, Gregorio et al. LC-MSn and HR-MS characterization of secondary metabolites from *Hypericum japonicum* Thunb. ex Murray from Nepalese Himalayan region and assessment of cytotoxic effect and inhibition of NF- κ B and AP-1 transcription factors in vitro. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 663-673, 2019.

PLUSKAL, Tomáš et al. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 1-11, 2010.

POZO-GUISADO, Eulalia et al. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 9, p. 1375-1386, 2002.

PROVENZANO, Elena; ULANER, Gary A.; CHIN, Suet-Feung. Molecular classification of breast cancer. **PET Clinics**, v. 13, n. 3, p. 325-338, 2018.

QIU, Jinxia et al. Hyperoside induces breast cancer cells apoptosis via ROS-mediated NF- κ B signaling pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 131, 2019.

QUIJIA, Christian Rafael; CHORILLI, Marlus. Piperine for treating breast cancer: A review of molecular mechanisms, combination with anticancer drugs, and nanosystems. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 147-163, 2022.

REN, Mingcheng et al. Qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds by UPLC-MS/MS and biological activities of *Pholidota chinensis* Lindl. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 187, p. 113350, 2020.

RUHFEL, Brad R. et al. Phylogeny of the clusioid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 2, p. 306-325, 2011.

SARHANGI, Negar et al. Breast cancer in the era of precision medicine. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 10, p. 10023-10037, 2022.

SCHMIDT, Betina et al. Resveratrol, curcumin and piperine alter human glyoxalase 1 in MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5244, 2020.

SECA, Ana M.L.; PINTO, Diana C.G.A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. **International Journal of Molecular Sciences**, 19(1):263, 2018.

SEE, Irene et al. Cytotoxic activity of phytochemicals from *Garcinia mangostana* L. and *G. benthamiana* (Planch. & Triana) Pipoly against breast cancer cells. **Natural Product Research**, v. 35, n. 24, p. 6184-6189, 2021.

SEM WAL, Ruchi Badoni et al. Emodin-A natural anthraquinone derivative with diverse pharmacological activities. **Phytochemistry**, v. 190, p. 112854, 2021.

SILVA, Daniel de Melo. Perfil metabolômico e farmacológico da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae). 2010. 133 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

SHAH, Syed Luqman et al. LC-MS/MS-based metabolomic profiling of constituents from *Glochidion velutinum* and its activity against cancer cell lines. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 9012, 2022.

SHAILAJA, V. L. et al. A natural anticancer pigment, pheophytin a, from a seagrass acts as a high affinity human mitochondrial translocator protein (TSPO) ligand, in silico, to reduce mitochondrial membrane Potential ($\Delta \psi_{mit}$) in adenocarcinomic A549 cells. **Phytomedicine**, v. 61, p. 152858, 2019.

SHATI, Ali A. et al. Secondary metabolites of *Saussurea costus* leaf extract induce apoptosis in breast, liver, and colon cancer cells by caspase-3-dependent intrinsic pathway. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

SHENDGE, A. K. et al. A natural flavonoid, apigenin isolated from *Clerodendrum viscosum* leaves, induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 cells through the regulation of p53 and caspase-cascade pathway. **Clinical and Translational Oncology**, v. 23, p. 718-730, 2021.

SHI, Wei et al. Molecular mechanisms underlying mangiferin-induced apoptosis and cell cycle arrest in A549 human lung carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 4, p. 3423-3432, 2016.

SILVA, Marcos Antonio Custódio Neto da et al. Açaí (*Euterpe oleracea* mart.) seed extract induces ROS production and cell death in MCF-7 breast cancer cell line. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3546, 2021.

SWAMINATHAN, Harshini; SARAVANAMURALI, K.; Yadav, Sangilimuthu Alagar. Extensive review on breast cancer its etiology, progression, prognostic markers, and treatment. **Medical Oncology**, v. 40, n. 8, p. 238, 2023.

TANG, Zhong-Yuan et al. Anticancer activity of oleanolic acid and its derivatives: Recent advances in evidence, target profiling and mechanisms of action. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 145, p. 112397, 2022.

THANAKIJCHAROENPATH, Witchuda; THEANPHONG, Orawan. Triterpenoids from the stem of *Diospyros glandulosa*. **The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2007.

TOLOSA, Erasmo Magalhães Castro de et al. **Manual de técnicas para histologia: normal e patológica**. São Paulo: Manole. . Acesso em: 10 jul. 2024. , 2003.

TOWBIN H, STAEHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRIBESS, Bianca et al. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 136-146, 2015.

WANG, Mingxun et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WITT, Brittany L.; TOLLEFSBOL, Trygve O. Molecular, cellular, and technical aspects of breast cancer cell lines as a foundational tool in cancer research. **Life**, v. 13, n. 12, p. 2311, 2023.

XI, Xiaomin et al. The biphasic effect of flavonoids on oxidative stress and cell proliferation in breast cancer cells. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 622, 2022.

YIN, Li et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2020.

YING, Xixiang et al. Determination of vitexin-2''-O-rhamnoside in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. **Talanta**, v. 72, n. 4, p. 1500-1506, 2007.

ZHANG, Jing et al. Natural products and derivatives for breast cancer treatment: From drug discovery to molecular mechanism. **Phytomedicine**, p. 155600, 2024.

ZHANG, Jingnan et al. Toosendanin and isotoosendanin suppress triple-negative breast cancer growth via inducing necrosis, apoptosis and autophagy. **Chemico-Biological Interactions**, v. 351, p. 109739, 2022.

ZHANG, Wenjun et al. Simultaneous determination of vitexin-4''-O-glucoside, vitexin-2''-O-rhamnoside, rutin and vitexin from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by UPLC–ESI-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 21, p. 1837-1844, 2010.

ZHANG, Xia et al. Simultaneous qualitative and quantitative study of main compounds in *Commelina communis* Linn. by UHPLC–Q-TOF-MS-MS and HPLC–ESI-MS-MS. **Journal of chromatographic science**, v. 56, n. 7, p. 582-594, 2018.

ZHENG, Yuanyuan et al. Garcinol acts as an antineoplastic agent in human gastric cancer by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 20, n. 1, p. 667-676, 2020.

ZHONG, Zhang-Feng et al. Combined effects of furanodiene and doxorubicin on the migration and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. **Oncology Reports**, v. 37, n. 4, p. 2016-2024, 2017.

ZHU, Yuyu et al. New opportunities and challenges of natural products research: When target identification meets single-cell multiomics. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2022.

ANEXO A
Ficha catalográfica *Clusia lanceolata* Cambess

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO

RB 592230



00832430



Coleção Botânica

Exsicata

Táxon

CLUSIACEAE *Clusia lanceolata* Cambess.

Sufixo

Tombado

Tombado

Tipo Espécie

Determinado por

Herbário

Data determinação

Natureza Typus

Notas sobre a determinação

Nomes Vulgares

Coletor principal

Número da coleta

C. Prado

2270

Outros coletores

Projeto/Expedição

Núm. coleta proj./exped.

Data Coleta

Local da coleta

29-IV-2010

Brasil, Rio de Janeiro, Teresópolis

Nomes vulgares

Latitude mínima

Longitude mínima

Latitude máxima

Longitude máxima

Descrição detalhada da localidade

BR-116, km 93.

Unidade de conservação

Unidade de conservação (Lista)

Elev./Prof.

Elev./Prof. Máxima

Unid. medida

765msm

Ecossistema/Tipo vegetação

ANEXO B**Ficha catalográfica *Bonnetia stricta* (Ness) Ness & Mart.**

**Coleção Botânica**

Herbário de Niterói

Táxon

BONNETIACEAE Bonnetia

Sufixo**Tombado**

Tombado

Tipo Espécie**Determinado por**

Herbário

Data determinação**Natureza Typus****Notas sobre a determinação****Nomes Vulgares****Coletor principal****Numero da coleta**

A. Lobão

2017

Outros coletores

M. Torvó, M. Saavedra, H.M.V. Freitas & L.E.F. Silva

Projeto/Expedição**Núm. coleta proj./exped.****Data Coleta****Local da coleta**

23-II-2013

Brasil, Rio de Janeiro, Quissamã

Nomes vulgares**Latitude minima****Longitude minima**

S

W

Latitude maxima**Longitude maxima**

S

W

Descrição detalhada da localidade

Área de moita.

Unidade de conservação

Parque nacional de Jurubatiba

Unidade de conservação (Lista)**Elev./Prof.****Elev./Prof. Máxima****Unid. medida****Ecosistema/Tipo vegetação****Descrição do ambiente**

ANEXO C
Artigo publicado



OPEN **Curcumin and melphalan cotreatment induces cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells**

Carlos Luan A. Passos^{1,4}, Renata Madureira Polinati^{1,4}, Christian Ferreira^{1,4}, Nathalia Alexia Nascimento dos Santos¹, Daniel Galinis V. Lima¹, Jerson Lima da Silva² & Eliane Fialho^{1,3}✉

Breast cancer is the second most common type of cancer worldwide and the leading cause of cancer death in women. Dietary bioactive compounds may act at different stages of carcinogenesis, including tumor initiation, promotion, and progression. Spices have been used for thousands of years and have many bioactive compounds with chemopreventive and chemotherapeutic properties. Curcumin has a multitude of beneficial biological properties, including anti-inflammatory and anticancer effects. This study investigated the effects of cotreatment with curcumin and the chemotherapeutic drug melphalan in cultured MDA-MB-231 breast cancer cells. When used alone, both curcumin and melphalan had a cytotoxic effect on breast cancer cells. Combined treatment with 11.65 μM of curcumin and 93.95 μM of melphalan (CURC/MEL) reduced cell viability by 28.64% and 72.43% after 24 h and 48 h, respectively. CURC/MEL reduced the number of colony-forming units and increased ROS levels by 1.36-fold. CURC/MEL alter cell cycle progression, induce apoptosis, and upregulate caspases-3, -7, and -9, in MDA-MB-231 cells. Cotreatment with curcumin and melphalan have anti-breast cancer cells effects and represent a promising candidate for clinical testing.

ANEXO D
Artigo submetido

Journal of Agricultural and Food Chemistry - Manuscript ID jf-2024-04931c



Externa Caixa de entrada x

Journal of Agricultural and Food Chemistry

ter., 4 de jun., 17:20

para mim, jafc

04-Jun-2024

RE: Manuscript Submission Successfully Submitted

Journal: Journal of Agricultural and Food Chemistry

Manuscript ID: jf-2024-04931c

Title: "Hibiscus sabdariffa L.: binomial time and temperature followed by bioactivity on breast cancer cells via PI3K/Akt/mTOR"

Authors: Passos, Carlos; dos Santos, Nathalia ; Ferreira, Christian; Costa, Ana Clara; Bricio, Yuri; Harada, Yasmin; Martins, Ana Beatriz; Monteiro, Mariana ; Fialho, E.

Food and Beverage Chemistry/Biochemistry

Manuscript Status: Submitted

Dear Dr. Fialho:

Your manuscript has been successfully submitted to Journal of Agricultural and Food Chemistry.

You will be receiving an email shortly informing you of the Assigned Editor for this manuscript, along with contact information for that editor.

Please reference the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your contact information, please log in to ACS Paragon Plus with your ACS ID at <http://acsparagonplus.acs.org/> and select "Edit Your Profile" to update that information.

You can view the status of your manuscript by checking your "Authoring Activity" tab on ACS Paragon Plus after logging in to <http://acsparagonplus.acs.org/>.

1 ***Hibiscus sabdariffa* L.: binomial time and temperature followed by bioactivity**
2 **on breast cancer cells via PI3K/Akt/mTOR**

3 Carlos Luan Alves Passos^{3#}, Nathalia Alexia Nascimento^{3#}, Christian Ferreira³,
4 Ana Clara de Novais Costa³, Yuri Ferreira Mundim Bricio³, Yasmin Burke Ribeiro
5 Harada³, Ana Beatriz Neves Martins³, Mariana Costa Monteiro³, Eliane Fialho^{3*}

6
7 ³ Laboratory of Functional Foods, Institute of Nutrition Josué de Castro, Federal
8 University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.

9
10 [#] These authors contributed equally to this work.

11
12 *Corresponding author:

13 Prof. Eliane Fialho, PhD. Departamento de Nutrição Básica e Experimental,
14 Instituto de Nutrição Josué de Castro, Centro de Ciências da Saúde, Universidade
15 Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Caixa Postal 68041, Cidade Universitária, Ilha
16 do Fundão, Rio de Janeiro, CEP 21941-902, Brazil. Email address:
17 fialho@nutricao.ufrj.br. Fax number: +55 21 2280 8343. Phone number: +55 21
18 3938 6799.

MATERIAL SUPLEMENTAR

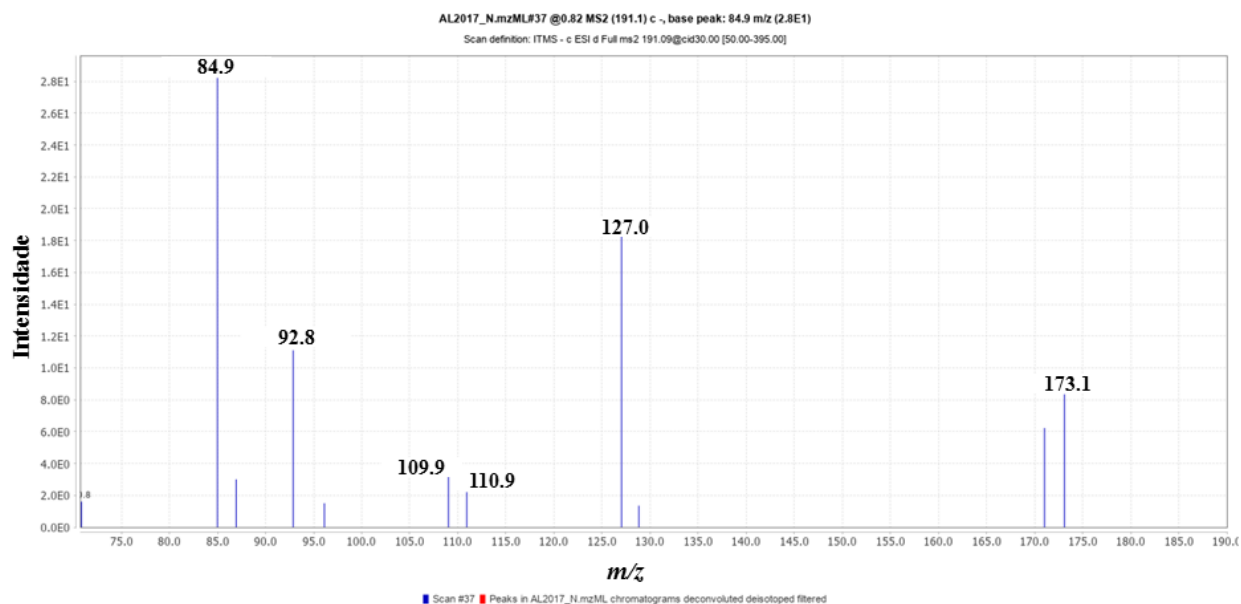
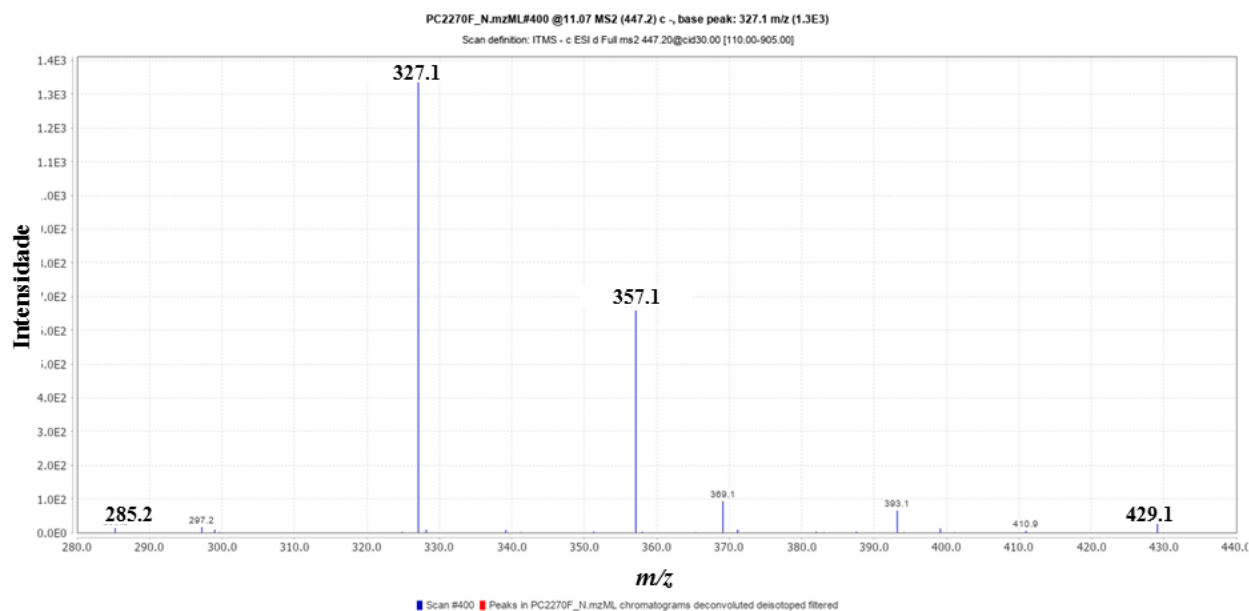
Figura S1. Espectros MS/MS do composto proposto ácido quínico m/z 191.1 [M-H]⁻.Figura S2. Espectros MS/MS do composto proposto orientina m/z 447.2 [M-H]⁻.

Figura S3. Espectros MS/MS do composto proposto quercetina 3-vicianosídeo m/z 595.3 [M-H].

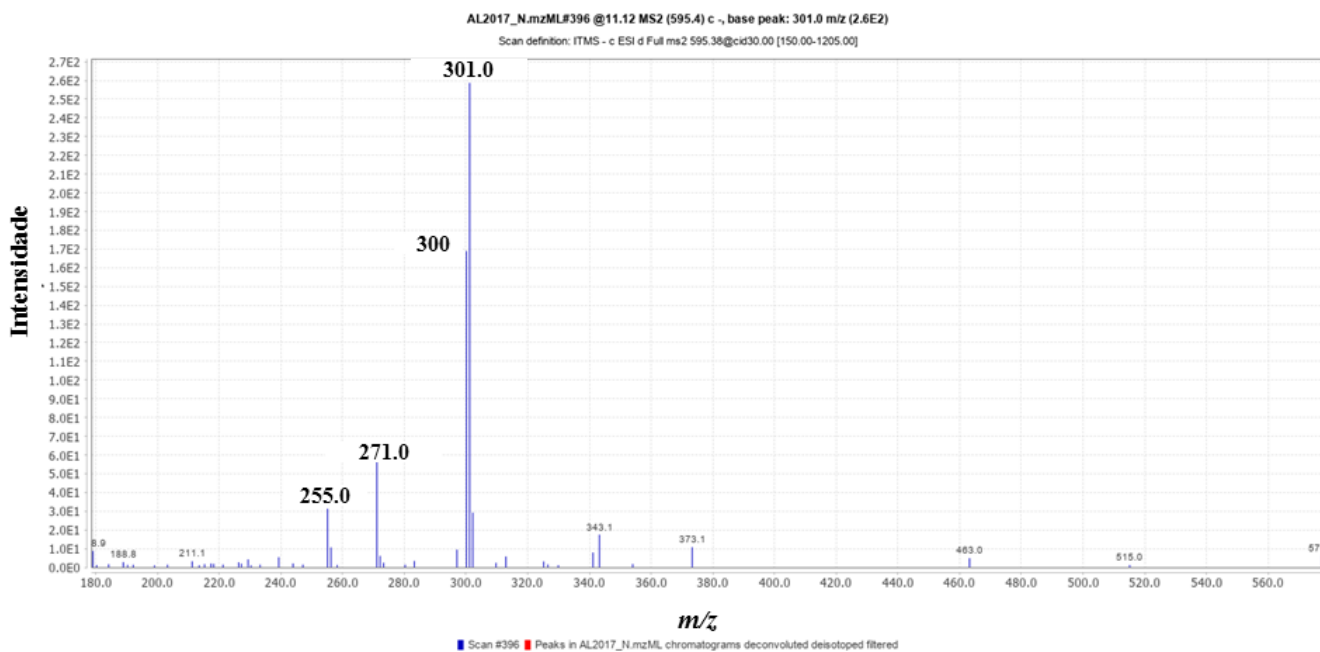


Figura S4. Espectros MS/MS do composto proposto vitexina-2-O-ramnosídeo m/z 577.3 [M-H].

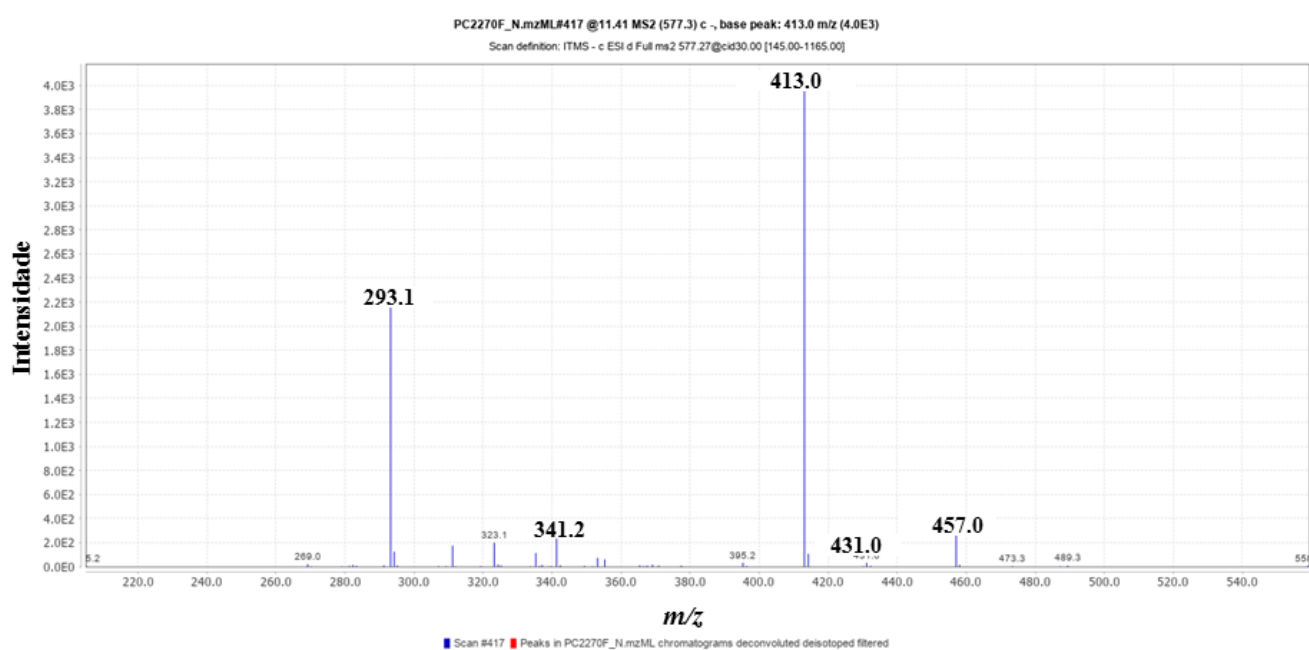


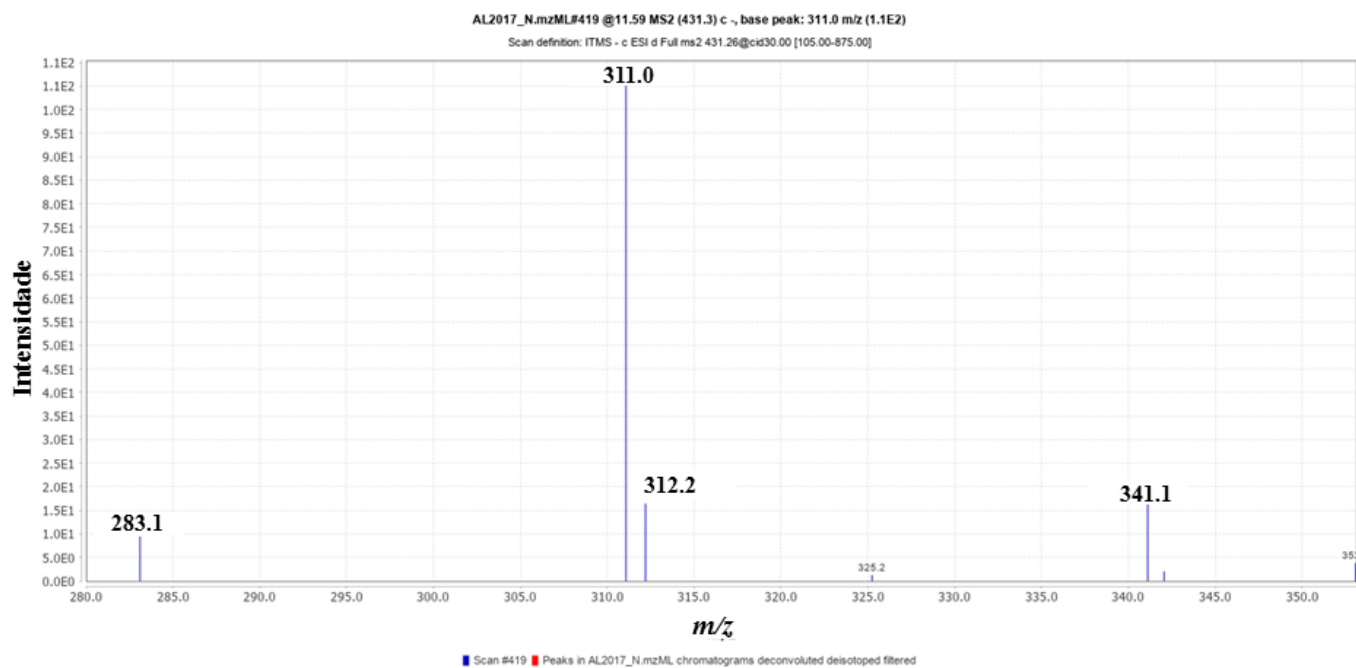
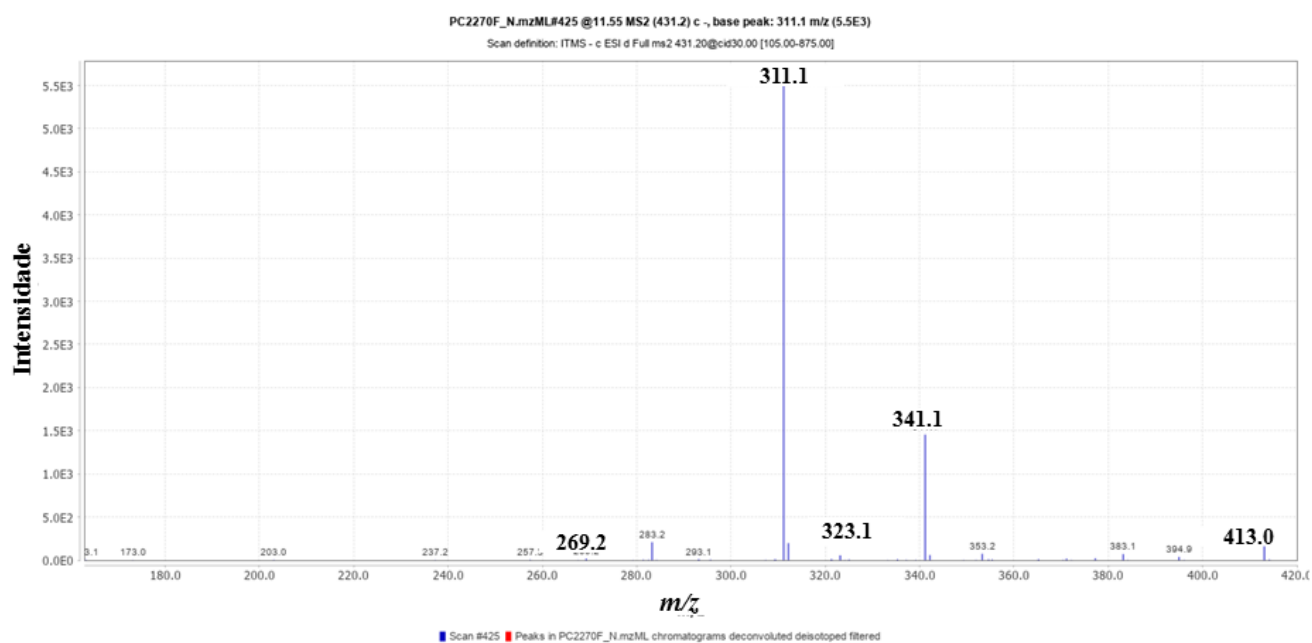
Figura S5. Espectros MS/MS do composto proposto isovitexina m/z 431.3 [M-H]⁻.**Figura S6.** Espectros MS/MS do composto proposto isovitexina m/z 431.2 [M-H]⁻.

Figura S7. Espectros MS/MS do composto proposto homoorientina m/z 449.1 $[M+H]^+$.

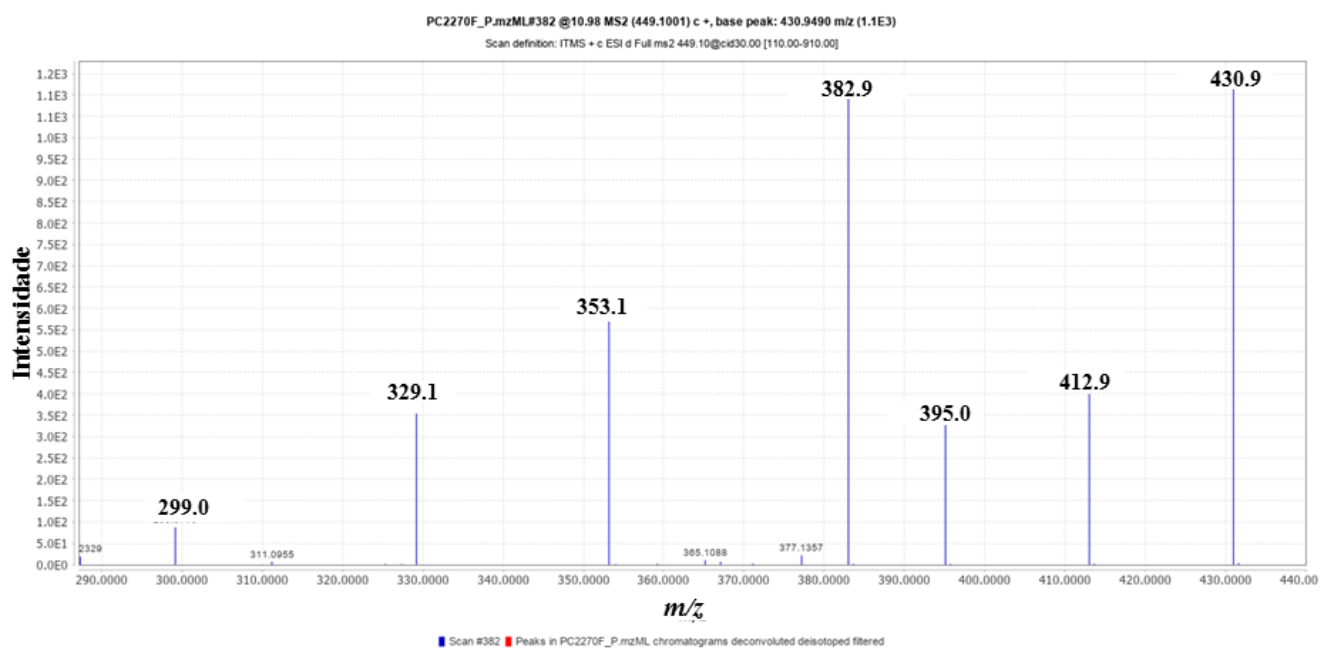


Figura S8. Espectros MS/MS do composto proposto vitexina-2-O-ramnosídeo m/z 579.1 $[M+H]^+$.

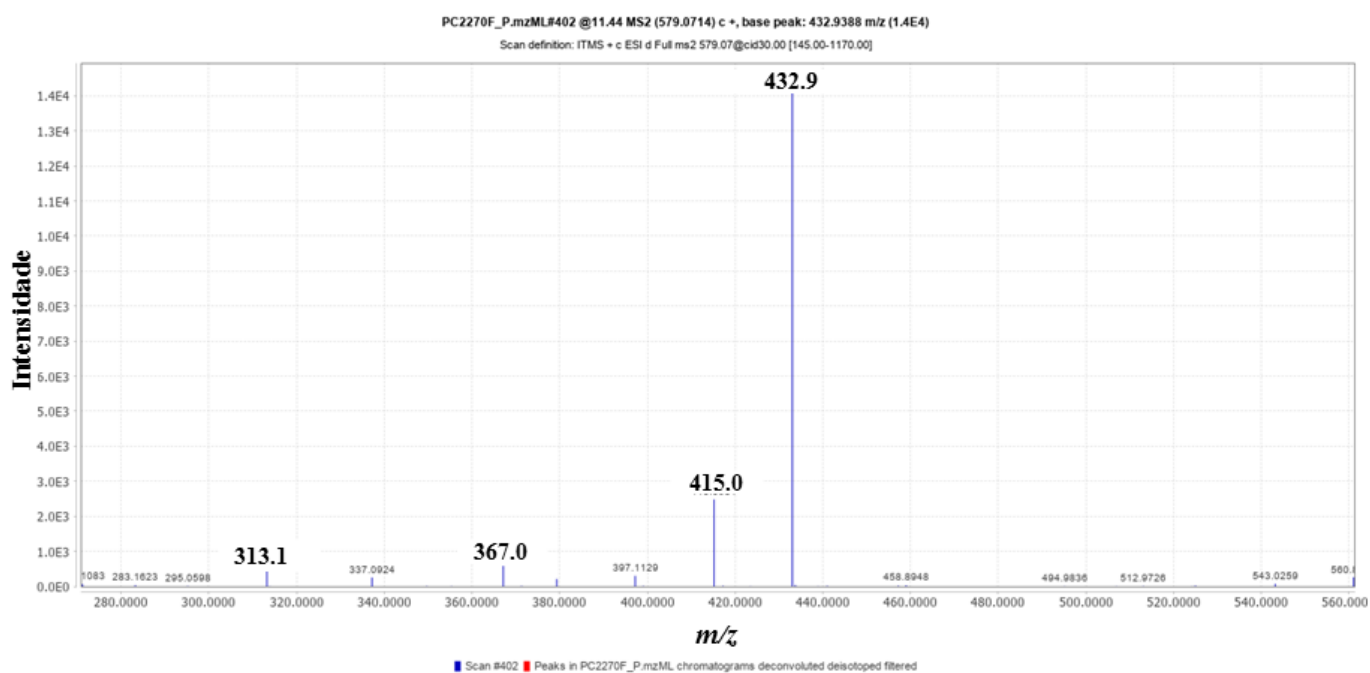


Figura S9. Espectros MS/MS do composto proposto isovitexina m/z 433.1 $[M+H]^+$.

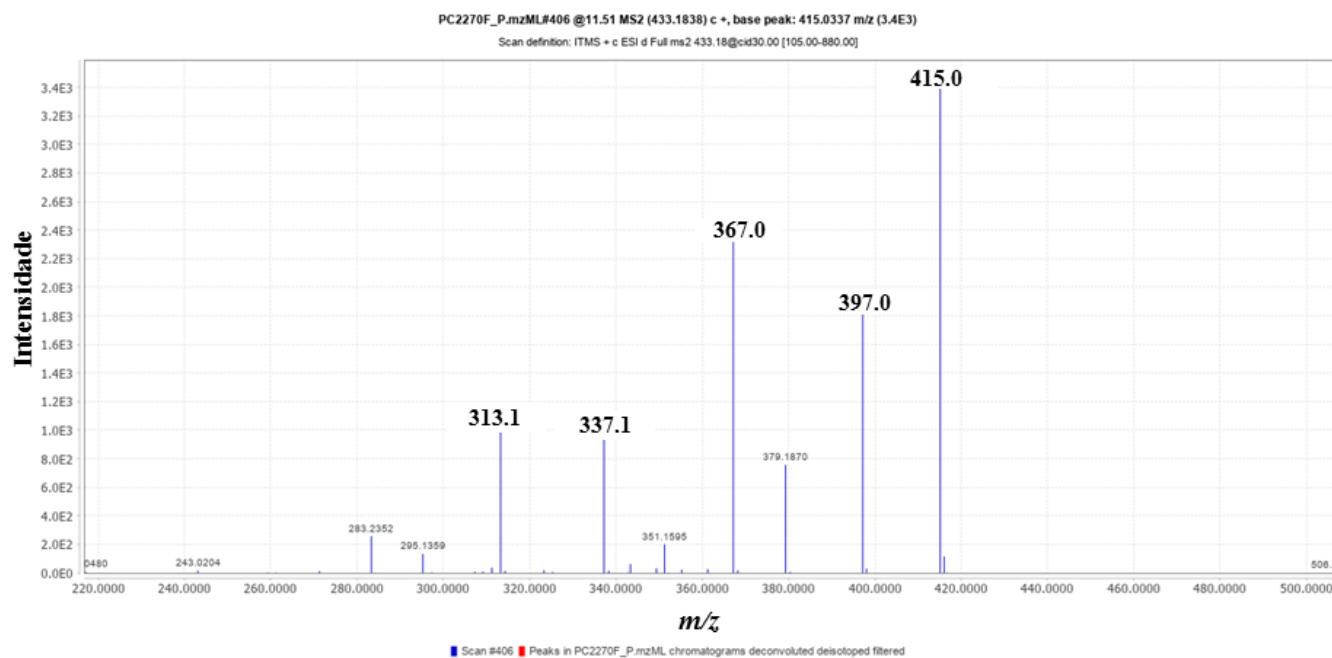


Figura S10. Espectros MS/MS do composto proposto ácido oleanólico m/z 439.3 $[M+H]^+$.

