



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - CCET  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQuim

VICTOR ANTONIO SILVA LIMA

**Caracterização Química e efeito citotóxico do extrato hidroetanólico das partes aéreas  
de *Scoparia dulcis* (Plantaginaceae)**

São Luís - MA  
2025

VICTOR ANTONIO SILVA LIMA

**Caracterização Química e efeito citotóxico do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *Scoparia dulcis* (Plantaginaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Quintino da Rocha

São Luís – MA  
2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Lima, Victor Antonio Silva.

Caracterização Química e efeito citotóxico do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *Scoparia dulcis* Plantaginaceae / Victor Antonio Silva Lima. - 2025.  
97 p.

Orientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2025.

1. Biodiversidade Brasileira. 2. Tratamento do Câncer. 3. Flavonóides. I. da Rocha, Cláudia Quintino. II. Título.

**VICTOR ANTONIO SILVA LIMA**

**Caracterização Química e efeito citotóxico do extrato hidroetanólico das partes aéreas  
de *Scoparia dulcis* (Plantaginaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química (PPGQuim) da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Quintino da Rocha.

Apresentada em: 25/02/2025

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cláudia Quintino da Rocha**

DEQUI/UFMA

---

**Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra**

DEQUI/UFMA

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Janaína Rebouças Marques do Rosário**

DCVET/UEMA

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me capacitar em todas as etapas da minha vida e por proporcionar esses momentos de vitórias. À minha família, em especial a minha mãe Silvia Maria e minha avó Maria, por sempre se sacrificarem e investirem em minha educação, pois a trajetória é árdua. Agradeço também aos meus padrinhos, Sônia e Fernando, por sempre terem contribuído para que todas essas etapas ocorressem, um muito obrigado, sem vocês nada disso teria acontecido.

Agradeço a minha noiva Amanda, por ser sempre minha maior incentivadora e por nunca soltar minha mão e não deixar eu desacreditar em meu potencial. Agradeço ao Sr Sérgio, Dona Berenice, Bruna e Tatiana, por toda convivência e por me tratarem como membro da família, e por substituírem minha família por conta da distância.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Quintino da Rocha, por sua excelente orientação e por fazer com que eu despertasse ainda mais o interesse pela ciência, muito obrigado.

Agradeço aos amigos da família LQPN, pois passo mais tempo com todos do que com a própria família, obrigado a todos pela amizade e parceria.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Juliana Mara Serpeloni e Prof<sup>a</sup> Roberta, por terem aberto as portas do seu laboratório para me receber e por ter dado a oportunidade para que eu aprendesse a trabalhar com cultura celular, algo que era totalmente novo para mim. Agradeço também as meninas do LAMON, por todo apoio e ajuda para que eu pudesse desenvolver meu trabalho da melhor forma possível.

Agradeço ao PPGQuim programa ao qual sou vinculado, Procad, por ter possibilitado minha ida para fazer o estágio em Londrina, na Universidade Estadual do Londrina, a Capes pela bolsa concedida.

## RESUMO

O câncer, uma das principais causas de mortalidade global, apresenta desafios aos tratamentos convencionais, como a quimioterapia, devido à baixa seletividade e à resistência tumoral ao tratamento. Nesse cenário, a biodiversidade brasileira, rica em espécies vegetais com propriedades bioativas, emerge como uma fonte promissora para a descoberta de novos fármacos. Diante disso, este estudo teve como objetivo, investigar a composição química e o potencial biofarmacológico de *Scoparia dulcis*. A anotação química do extrato das folhas de *S. dulcis* (EFSD) por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS), revelou uma ampla variedade de compostos, incluindo flavonoides, terpenoides e ácidos fenólicos, reconhecidos por suas atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antidiabéticas e antiproliferativas. Além disso o extrato foi submetido um processo de separação, onde foi possível isolar dois compostos, VAMF-1 (Flavonoide extraído da vassourinha com metanol - cirsimarina). Para confirmar a identidade do VAMF-1, as espectroscopias de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}$ ) forneceram os sinais característicos, validando sua estrutura química como um flavonoide metoxilado e glicosilado. Na avaliação do potencial antioxidante, pelo método DPPH, as concentrações de 62,5 e 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, demonstraram a capacidade do antioxidante presente no EFSD em neutralizar radicais livres, evidenciada pela redução do DPPH. A viabilidade celular do EFSD, VAMF-1 e VAMF-2 foi avaliada nas linhagens celulares MCF-7 (derivada de adenocarcinoma humano de mama metastático) e T24 (derivada de carcinoma urotelial de células transicionais de bexiga grau III) em modelos bidimensional e apenas o EFSD e VAMF-1 foi analisado em modelos tridimensional. Com relação ao EFSD, foi observada uma inibição da viabilidade celular a partir da concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para as células MCF-7, a concentração inibitória foi de 100,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  após 24 horas de tratamento. Ao ser comparado com as células T24, o EFSD apresentou uma concentração inibitória de 129,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , apresentando uma maior resistência em relação a MCF-7. O EFSD apresentou-se ativo frente a linhagem MCF-7, no entanto, para as células T24 não foi ativo, com concentração inibitória ( $\text{CI}_{50}$ ) de 129,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo superior a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (concentração máxima para que um extrato seja considerado ativo). No ensaio de toxicidade em larvas de *Tenebrio molitor*, a concentração menos citotóxica foi a de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Além da anotação dos metabólitos secundários, o estudo avaliou a atividade antitumoral dos compostos isolados, reforçando seu potencial como candidatos promissores ao desenvolvimento de novos fármacos.

**Palavras-chave:** Biodiversidade Brasileira; Tratamento do câncer; Flavonóides

## ABSTRACT

Cancer, a leading cause of global mortality, presents challenges to conventional treatments such as chemotherapy due to low selectivity and tumor resistance to treatment. In this scenario, Brazilian biodiversity, rich in plant species with bioactive properties, emerges as a promising source for the discovery of new drugs. Therefore, this study aimed to investigate the chemical composition and biopharmacological potential of *Scoparia dulcis*. The chemical annotation of *S. dulcis* leaf extract (EFSD) by Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry (LC-MS), revealed a wide variety of compounds, including flavonoids, terpenoids and phenolic acids, recognized for their anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic and antiproliferative activities. In addition, the extract was subjected to a separation process, where it was possible to isolate two compounds, VAMF-1 (flavonoid extracted from the broom with methanol - cirsimarin). To confirm the identity of VAMF-1, hydrogen ( $^1\text{H}$ ) and carbon ( $^{13}\text{C}$ ) nuclear magnetic resonance spectroscopies provided the characteristic signals, validating its chemical structure as a methoxylated, glycosylated flavonoid. In the evaluation of the antioxidant potential, by the DPPH method, the concentrations of 62.5 and 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, demonstrated the ability of the antioxidant present in EFSD to neutralize free radicals, evidenced by the reduction of DPPH. The cell viability of EFSD, VAMF-1 and VAMF-2 was evaluated in the MCF-7 (derived from metastatic human breast adenocarcinoma) and T24 (derived from grade III transitional bladder urothelial cell carcinoma) cell lines in two-dimensional models and only EFSD and VAMF-1 were analyzed in three-dimensional models. Regarding EFSD, an inhibition of cell viability was observed from the concentration of 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . For MCF-7 cells, the inhibitory concentration was 100.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  after 24 hours of treatment. When compared with T24 cells, EFSD showed an inhibitory concentration of 129.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , showing a higher resistance compared to MCF-7. EFSD was active against the MCF-7 lineage, however, for T24 cells it was not active, with an inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 129.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , being higher than 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (maximum concentration for an extract to be considered active). In the toxicity test on *Tenebrio molitor* larvae, the least cytotoxic concentration was 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In addition to annotating the secondary metabolites, the study evaluated the antitumor activity of the isolated compounds, reinforcing their potential as promising candidates for the development of new drugs.

**Keywords:** Brazilian Biodiversity; Cancer Treatment; Flavonoids

## LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1 - Método de extração do VAMF-1 (cirsimarina) e VAMF-2 (cirsimaritina) .....	36
Esquema 2 - Proposta de fragmentação do Vicenin-2.....	56
Esquema 3 - Proposta de fragmentação da Apigenina-6-C-pentosil-8-C-hexosídeo .....	58
Esquema 4 - Proposta de fragmentação da Isorhamnetina-3-O-hexosil-7-O-pentosídeo .....	59
Esquema 5 - Proposta de fragmentação para a Isovitexina .....	61
Esquema 6 - Proposta de fragmentação para a Escutelarina .....	62
Esquema 7 - Proposta de fragmentação para a Apigenina-7-O-glucuronídeo .....	64
Esquema 8 - Proposta de fragmentação para a Hispidulina-7-O-glucuronídeo.....	65
Esquema 9 - Proposta de fragmentação para o Cirsimarina .....	67
Esquema 10 - Proposta de fragmentação para o Cirsilol .....	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Scoparia dulcis</i> L.....	22
Figura 2 - Estrutura química dos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer .....	29
Figura 3 - Cromatograma HPLC-PDA 254 nm do extrato hidroetanólico das partes aéreas de <i>Scoparia dulcis</i> . Coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4.6 nm; 5 µm), fluxo 1 mL/min.....	45
Figura 4 - Espectros de absorção UV-Vis dos compostos presentes no extrato hidroetanólico .....	46
Figura 5 - Cromatograma HPLC-PDA da fração clorofórmica <i>Scoparia dulcis</i> . Coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4.6 nm; 5 µm), fluxo 1 mL/min.....	47
Figura 6 - Espectro de absorção UV-Vis dos compostos presentes na fração clorofórmica ...	48
Figura 7 - Espectros UV-Vis dos compostos isolados de <i>Scoparia dulcis</i> . a) VAMF-1 e seu respectivo espectro no UV. b) VAMF-2 e seu respectivo espectro no UV. ....	49
Figura 8 - Cromatograma do extrato bruto de <i>Scoparia dulcis</i> analisado por LC-ESI-IT/MS	50
Figura 9 - Compostos anotados no extrato hidroetanólico de <i>Scoparia dulcis</i> .....	53
Figura 10 - Espectros de massas obtidos para o Vicenina-2 .....	55
Figura 11 - Espectros de massas obtidos para o Apigenina-6-C-pentosil-8-C-hexosídeo .....	57
Figura 12 - Espectros de massas obtidos para o Isorhamnetina-3-O-hexosil-7-O-pentosídeo	59
Figura 13 - Espectros de massas obtidos para a Isovitexina.....	60
Figura 14 - Espectros de massas obtidos para a Escutelarina.....	62
Figura 15 - Espectros de massas obtidos para a Apigenina-7-O-glucuronídeo.....	63
Figura 16 - Espectros de massas obtidos para a Hispidulina-7-O-glucuronídeo .....	65
Figura 17 - Espectros de massas obtidos para a Cirsimarina.....	66
Figura 18 - Espectros de massas obtidos para o Cirsiliol.....	68
Figura 19 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da cirsimarina (400 Hz, DMSO (d6) em ppm) .....	70
Figura 20 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da cirsimarina (400 Hz, DMSO (d6) em ppm) .....	70
Figura 21 - Soluções após a adição do DPPH .....	74
Figura 22 - Gráficos da atividade antioxidante do EFSD e do controle trolox .....	74
Figura 23 - Viabilidade Celular (%) de Células MCF-7 Após Tratamento com Cirsimarina em Culturas 2D e 3D .....	76
Figura 24 - Viabilidade celular de VAMF-2. a) T24. b) MCF-7 .....	77
Figura 25 - Viabilidade celular de EFSD. a) MCF-7. b) T24.....	78
Figura 26 - a) Fração de sobrevivência após 24h de tratamento com EFSD. b) Imagens representativas das colônias para cada tratamento.....	80

Figura 27 - a) Fração de sobrevivência após 24h de tratamento com VAMF-1. b) Imagens representativas das colônias para cada tratamento.....	81
Figura 28 - a) Áreas compreendidas pelos esferoides nos tempos 0h e 72h. b) Resultado de viabilidade celular do ensaio de resazurina após tratamento com EFSD. c) Imagens representativas de de EMTs após 2 dias de incubação e 72h de tratamento.....	83
Figura 29 - (a) Volume (área) de células tumorais de mama MCF-7 cultivadas como esferoides 3D e tratadas com VAMF-1 (10 a 320 $\mu$ M), solvente (SV; 0,25% DMSO) e controles positivos (docetaxel, DT 50 e 100 $\mu$ M) avaliados por 16 dias. (b) Imagens representativas da morfologia, estrutura e crescimento dos esferoides MCF-7 foram obtidas a cada 3 dias por 16 dias após o tratamento com SV (painel superior), CIR 40 $\mu$ M (painel central) ou DT 100 $\mu$ M (painel inferior). (c) A viabilidade celular após 16 dias foi medida pelo ensaio de resazurina.....	85
Figura 30 - Avaliação da toxicidade aguda do EFSD em larvas de Tenebrio molitor.....	86

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Mecanismos de ação da quimioterapia.....	27
Tabela 2 - Mecanismos de ação da radioterapia .....	30
Tabela 3 - Rendimento do extrato bruto e da fração clorofórmica de <i>Scoparia dulcis</i>	44
Tabela 4 - Compostos anotados no extrato hidroetanólico de <i>Scoparia dulcis</i> .....	51
Tabela 5 - Valores de deslocamento químico e multiplicidade de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD em ppm) para a cirsimarina.....	71
Tabela 6 - Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico e do controle Trolox.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRCA1: *Breast Cancer Gene 1* – Gene 1 do Câncer de Mama

BRCA2: *Breast Cancer Gene 2* – Gene 2 do Câncer de Mama

CC<sub>50</sub>: Concentração Citotóxica Média

CI<sub>50</sub>: Concentração Inibitória Média

CS: Controle do Solvente

DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMSO-d<sub>6</sub>: Dimetilsulfóxido deuterado

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

EFS: Extrato Hidroetanólico de *Scoparia dulcis*

EMT: Transição Epitelial-Mesenquimal

ESI: *Electrospray Ionization* – Ionização por Eletrospray

GEM: Gemcitabina

[M-H]<sup>-</sup>: Modo de Ionização Negativo

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IT: *Ion trap* (analisador de armadilha de íons)

MCF-7: Linhagem celular de adenocarcinoma mamário

MCTS: Esferóides Multicelulares Tumorais 3D

MeOH: Metanol

MS: *Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massas

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NMP: Ponto de Fusão Normal

PBS: Tampão Fosfato Salino

PDA: *Photodiode array detector* – Detector de matriz de fotodiodos

PTFE: Politetrafluoroetileno

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RNA: Ácido Ribonucleico

RPMI: Meio Gibco Roswell Park Memorial Institute

SFB: Soro Fetal Bovino

SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SPE: Extração em Fase Sólida

T-24: Células Tumorais de Bexiga

TC: Tomografia Computadorizada

UV-Vis: Detector Ultravioleta e Visível

VAMF-1: Cirsimarina

VAMF-2: Cirsimaritina

## SUMÁRIO

1.	<b>Introdução:</b> .....	15
2.	<b>Objetivos</b> .....	17
2.1	Geral .....	17
2.2	Específicos .....	17
3.	<b>Revisão de Literatura</b> .....	18
3.1	Família Plantaginaceae .....	18
3.2	Gênero <i>Scoparia</i> .....	20
3.3	<i>Scoparia dulcis</i> L. ....	21
3.4	Câncer de Mama .....	23
3.5	Câncer de bexiga.....	24
3.6	Terapias do Câncer .....	27
3.6.1	Quimioterapia .....	27
3.6.2	Radioterapia.....	30
4.	<b>Metodologia</b> .....	32
4.1	Coleta.....	32
4.2	Preparo do extrato.....	32
4.3	Partição líquido/líquido .....	33
4.4	Anotação dos constituintes químicos de <i>Scoparia dulcis</i> .....	33
4.4.1	<b>Análise do perfil cromatográfico de extrato bruto e fração clorofórmica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta-visível (HPLC-UV/VIS)</b>	33
4.4.2	<b>Cromatografia líquida acoplada a um íon trap com interface de ionização por eletrospray e um analisador de massas de baixa resolução</b> .....	34
4.4.3	<b>Isolamento do VAMF-1 e VAMF-2</b> .....	35
4.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	37
4.5	Avaliação do potencial antioxidante do EFSD por DPPH .....	37
4.6	Ensaio Anticâncer .....	38
4.6.1	Linhagens celulares e condições de cultura.....	38
4.6.2	Diluição dos Tratamentos .....	39
4.6.2.1	Extrato hidroetanólico, VAMF-1 e VAMF-2.....	39
4.6.2.2	Controles Solvente e Positivo (Docetaxel e Cisplatina).....	39
4.6.3	Ensaio de viabilidade Celular MTT.....	40
4.6.4	Ensaio Clonogênico 2D .....	40
4.6.5	Ensaio 3D .....	41
4.6.5.1	Formação de esferóides multicelulares tumorais 3D (MCTS) .....	41
4.6.5.2	Ensaio de Resazurina e Análise de Integridade .....	42
4.6.6	Análise Estatística.....	42
4.7	Avaliação da toxicidade aguda do EFSD .....	43
4.7.1	Aquisição e manutenção das larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	43
4.7.2	Ensaio de toxicidade aguda do Extrato hidroetanólico.....	43
5.	<b>Resultados e Discussão</b> .....	44

5.1	Rendimento do extrato e fração clorofórmica de <i>Scoparia dulcis</i> .....	44
5.1.1	Perfil químico do extrato, fração clorofórmica.....	44
5.1.2	Análise dos compostos isolados por HPLC-PDA (VAMF-1 e VAMF-2) .....	48
5.1.3	Anotação química por LC-ESI-IT/MS .....	50
5.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear da Cirsimarina .....	69
5.3	Potencial antioxidante do EFSD pelo método DPPH.....	72
5.4	Atividade anticâncer do extrato, VAMF-1 e VAMF-2 .....	75
5.4.1	Efeito citotóxico em linhagens celulares MCF-7 e T24 .....	75
5.4.1.1	VAMF-1 .....	75
5.4.1.2	VAMF-2 .....	76
5.4.1.3	Extrato hidroetanólico das partes aéreas de <i>Scoparia dulcis</i> (EFSD) .....	77
5.4.2	Ensaio Clonogênico .....	79
5.4.3	Ensaio de Resazurina em 3D e Análises Fotomicroscópica.....	82
5.5	Estudo de toxicidade <i>in vivo</i> em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	86
<b>6</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>89</b>

## 1. Introdução:

O câncer é uma das principais ameaças à saúde global, sendo a segunda maior causa de morte, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Sua elevada incidência e mortalidade representam desafios substanciais para os sistemas de saúde em todo o mundo (BRAY et al., 2018). O tratamento oncológico abrange diversas abordagens terapêuticas, que podem ser invasivas, como a cirurgia e a radioterapia, ou não invasivas, como a terapia hormonal e a quimioterapia. Dentre essas, a quimioterapia é amplamente empregada por sua capacidade de atingir células cancerígenas em diferentes estágios da doença (RIZEQ et al., 2020).

Contudo, a eficácia da quimioterapia é limitada pela baixa seletividade, que afeta também células saudáveis, e pelo desenvolvimento de quimiorresistência, em que as células tumorais se tornam resistentes aos medicamentos. Esses fatores ressaltam a necessidade urgente de terapias mais específicas e eficazes, capazes de combater o câncer com maior eficiência e menos efeitos colaterais (ZUBAIR et al., 2017).

Uma abordagem alternativa e promissora para o tratamento de diversas doenças está na Química de Produtos Naturais, área em que o Brasil se destaca devido à sua vasta biodiversidade, na qual abriga uma riqueza de espécies vegetais, o que confere um imenso potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. A exploração dessa biodiversidade tem sido essencial para a identificação de substâncias bioativas com eficácia comprovada, que desempenham um papel crucial no tratamento de inúmeras enfermidades (CSUK AL-HARRASI, 2020).

Entre as diversas plantas brasileiras com potencial biofarmacológico, destacam-se as pertencentes à família Plantaginaceae, que compreende cerca de 107 gêneros e 2277 espécies (WHETERWAX, 2020; WORLD FLORA ONLINE, 2024). As espécies dessa família têm sido amplamente estudadas devido às suas variadas bioatividades, incluindo propriedades antioxidantes (QI et al., 2021), antidiabético (JIANG et al., 2021) anticancerígenas (FENG; SHEN, 2010), anti-inflamatórias (YIN et al., 2019), e analgésicas (XIE et al., 2023).

Dentro desse grupo, *S. dulcis* destaca-se por sua ampla distribuição, relevância medicinal e adaptabilidade às mais diversas condições ambientais. Essa planta herbácea perene, pertencente à família Plantaginaceae, é nativa de regiões tropicais e subtropicais, como a América do Sul, Ásia e África, sendo popularmente conhecida como “vassourinha”. (JIANG et al., 2021).

Na medicina popular, a “vassourinha” é amplamente utilizada para o tratamento de diversos problemas de saúde, incluindo os digestivos, inflamações (COULIBALY et al., 2011),

e como diurético (LANS, 2007). Além disso, a planta tem sido tradicionalmente empregada no controle do diabetes (PAMUNUWA; KARUNARATNE; WAISUNDARA, 2016).

A eficácia terapêutica da “vassourinha” pode ser atribuída à presença de uma variedade de compostos bioativos em sua composição, como flavonoides, terpenoides, alcaloides, e ácidos fenólicos (JIANG et al., 2021). Esses compostos conferem à planta propriedades farmacológicas notáveis, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes (COULIBALY et al., 2011), hepatoprotetores (TSAI et al., 2010) e antidiabéticos (PAMUNUWA; KARUNARATNE; WAISUNDARA, 2016). Assim, a vassourinha combina um perfil complexo de bioatividade que a torna valiosa na medicina tradicional e moderna.

Os flavonoides são a classe predominante de metabólitos presentes na composição química de *S. dulcis*, de acordo com a literatura (JIANG et al., 2021). Esses compostos polifenólicos, amplamente distribuídos nas plantas, são reconhecidos por suas diversas propriedades bioativas e contribuem significativamente para a saúde humana devido aos seus múltiplos efeitos benéficos (JIANG et al., 2021). Serpeloni e colaboradores (2022) conduziram estudos para avaliar a atividade antitumoral da cirsimarina, uma flavona glicosilada isolada das partes aéreas de *S. dulcis*, em células de câncer de mama MCF-7. A pesquisa investigou os mecanismos pelos quais a cirsimarina modula a proliferação, migração e invasão celular, utilizando tanto modelos de cultura bidimensionais (2D) quanto tridimensionais (3D).

Diante da rica diversidade fitoquímica e biológica das espécies da família Plantaginaceae, aliada à escassez de dados sobre *S. dulcis*, uma espécie amplamente encontrada e tradicionalmente utilizada no estado do Maranhão, torna-se essencial uma investigação mais aprofundada. O objetivo foi realizar uma caracterização química detalhada do extrato hidroetanólico, avaliar seu potencial anticancerígeno, além de garantir a segurança e eficácia de seu uso. Esses estudos são fundamentais para o avanço no desenvolvimento de um produto biotecnológico a partir dessa espécie.

## 2. Objetivos

### 2.1 Geral

- ✓ Investigar a composição química e o potencial biofarmacológico de *S. dulcis*.

### 2.2 Específicos

- ✓ Realizar a anotação química dos compostos presentes no EFSD através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;
- ✓ Isolar e caracterizar constituintes químicos presentes no EFSD;
- ✓ Elucidar a estrutura do metabólitos secundário isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do EFSD utilizando o ensaio de captura do radical livre DPPH.
- ✓ Avaliar em células tumorais do câncer de mama (MCF-7) e de bexiga (T-24) os efeitos do tratamento com o EFSD e isolados em modelos bidimensional e tridimensional;
- ✓ Investigar a viabilidade celular do EFSD, VAMF-1 e VAMF-2 por meio do ensaio de MTT;
- ✓ Avaliar a proliferação celular por meio do ensaio clonogênico a partir do extrato e isolados;
- ✓ Avaliar a viabilidade celular e integridade de esferoides multicelulares tumorais por meio do ensaio de resazurina e de análises fotomicroscópicas por meio do extrato e isolados;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda do EFSD em larvas de *T.molitor*.

### 3. Revisão de Literatura

#### 3.1 Família Plantaginaceae

A família Plantaginaceae, pertencente à ordem Lamiales, compreende aproximadamente 107 gêneros e 2277 espécies (WHETERWAX, 2020; WORLD FLORA ONLINE, 2024), amplamente distribuídas em diversas regiões do mundo. Inicialmente, a classificação dessa família era mais restrita, concentrando-se principalmente no gênero *Plantago*. Contudo, revisões taxonômicas recentes, apoiadas em estudos moleculares, resultaram na ampliação dessa classificação, incorporando novos gêneros que anteriormente pertenciam à família Scrophulariaceae (JIA et al., 2022). Essa ampliação reflete não apenas a riqueza de espécies, mas também a complexidade da evolução dessas plantas.

As plantas da família Plantaginaceae demonstram uma grande diversidade morfológica, variando de ervas anuais a perenes e até arbustos. Características como folhas geralmente simples, com venação paralela ou penínérvea, e disposição em rosetas basais, como observado em algumas espécies de *Plantago*, exemplificam essa diversidade. As flores, pequenas e hermafroditas, exibem simetria bilateral (zigomorfa). Além disso, a inflorescência pode ser do tipo espiga ou racemo terminal, originando frutos do tipo cápsula que liberam numerosas sementes pequenas (AL-ABIDE, 2019). Essas características morfológicas variáveis são adaptativas e refletem a ampla distribuição geográfica da família, que abrange tanto regiões temperadas quanto tropicais.

A distribuição global da Plantaginaceae revela sua adaptabilidade a diversos habitats, com membros frequentemente encontrados em pastagens, margens de rios e ambientes urbanos. Essa notável diversidade ecológica é evidenciada por estudos filogenéticos que sugerem que a Plantaginaceae é um grupo monofilético, incluindo tribos como Angelonieae e Gratioleae. Esses estudos também revelam padrões de dispersão, com predominância de transições de ambientes extratropicais para tropicais ao longo do tempo. Essa dinâmica indica que algumas linhagens migraram para regiões tropicais, contribuindo para a biodiversidade em hotspots e destacando a importância de análises geográficas para a compreensão da evolução e distribuição das espécies dessa família (FONSECA, 2021).

Dentro desse contexto de diversidade, diversas espécies, como do gênero *Scoparia* possuem notável importância medicinal e são amplamente utilizadas na medicina popular de diferentes culturas. Entre elas, *S. dulcis* destaca-se por sua relevância terapêutica, sendo tradicionalmente empregada no tratamento de problemas digestivos, distúrbios respiratórios e

como diurético. Estudos científicos corroboram essas aplicações, indicando que os extratos dessa planta apresentam atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas, atribuídas à presença de compostos bioativos como flavonoides, glicosídeos e diterpenos (MURUGAN et al., 2023). Assim, a importância medicinal das espécies de Plantaginaceae complementa suas características morfológicas e ecológicas, ampliando o seu valor para a saúde humana.

Além de suas propriedades medicinais, diversas espécies da família Plantaginaceae desempenham um papel fundamental na recuperação de áreas degradadas, graças à sua alta tolerância a solos compactados e secos. Essas características permitem que contribuam significativamente para o equilíbrio ambiental, estabilizando o solo e promovendo a regeneração de ecossistemas afetados (RESENDE et al., 2015). Essa dualidade de funções destaca a relevância das espécies de Plantaginaceae não apenas na recuperação ambiental, mas também na promoção da saúde e do bem-estar das comunidades que dependem de seu uso medicinal (KONG; HENRY, 2019).

Dessa forma, a família Plantaginaceae destaca-se não apenas pela ampla diversidade morfológica e geográfica, mas também pela relevância medicinal de suas espécies, como *S. dulcis* (SRINIVAS et al., 2016). Investigações filogenéticas recentes têm elucidado a complexidade das relações evolutivas dentro dessa família, ressaltando a importância de revisões taxonômicas para uma compreensão mais abrangente de sua biodiversidade (HÖPKE; MUCINA; ALBACH, 2019). As propriedades terapêuticas dessas plantas, corroboradas por estudos científicos, juntamente com seu papel ecológico na recuperação de áreas degradadas, evidenciam sua multifuncionalidade (SARKAR et al., 2020).

Reconhecer e valorizar as espécies da família Plantaginaceae é, portanto, fundamental para a conservação da biodiversidade e o uso sustentável dos recursos naturais. Essa valorização beneficia tanto o meio ambiente quanto a saúde das comunidades que dependem dessas plantas em suas práticas medicinais. A interconexão entre a diversidade biológica e a prática medicinal reforça a necessidade de promover pesquisas e estratégias de conservação que assegurem a preservação dessas espécies vitais para o futuro.

### 3.2 Gênero *Scoparia*

O gênero *Scoparia*, pertencente à família *Plantaginaceae*, é composto por plantas herbáceas e, em alguns casos, subarborescentes, amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Essas plantas apresentam uma morfologia simples, com folhas alternadas, geralmente ovais ou lanceoladas. As flores, pequenas e discretas, variam entre as cores branca ou amarelada e estão dispostas em inflorescências do tipo espiga ou racemo. O fruto caracteriza-se como uma cápsula seca, contendo sementes pequenas e numerosas (WORLD FLORA ONLINE, 2024).

Além dessas características gerais, as espécies do gênero *Scoparia* destacam-se por sua ocorrência predominantemente em ambientes tropicais, onde se adaptam com facilidade. A maioria das espécies apresenta porte reduzido, com plantas que raramente ultrapassam 60 cm de altura. Possuem caule liso, coloração verde e são frequentemente encontradas como ervas daninhas devido à sua ampla dispersão e crescimento em locais perturbados. Apesar de seu sabor e odor indistintos, essas plantas têm despertado interesse devido à sua presença em ecossistemas tropicais e subtropicais, bem como ao seu potencial ecológico e econômico (BABINCOVÁ; SCHRONEROVÁ; SOURIVONG, 2008).

Os estudos fitoquímicos de *Scoparia* revelam uma diversidade de metabólitos secundários, principalmente flavonoides (KAMEL et al., 2023), terpenoides (ZHANG et al., 2021), cumarinas (KUERBAN et al., 2024) e ácidos fenólicos (NIKITIN et al., 2023), que contribuem para suas propriedades biológicas. Entre os flavonoides mais comuns, destacam-se a vicenina-2, isovitexina, luteolina e apigenina, compostos reconhecidos por suas atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa (MOHARRAM et al., 2017). Além disso, alcaloides (PROTSKA, 2023) e iridóides (CAO et al., 2024) também são frequentemente relatados, sendo esses últimos associados a potenciais efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios.

A riqueza desses compostos bioativos está diretamente relacionada ao amplo uso medicinal das espécies do gênero *Scoparia*. Tradicionalmente, essas plantas são empregadas no tratamento de diversas condições, como diabetes (RAHHAL et al., 2022), inflamações (OFORI-AMOAHA et al., 2024), distúrbios gastrointestinais (VANCE et al., 2014) e infecções microbianas (RAHHAL et al., 2022). Estudos indicam que extratos de *S. dulcis* apresentam atividade hipoglicemiante, possivelmente devido à presença de flavonoides que modulam a ação de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose (DONG et al., 2024). Além disso, a presença de compostos fenólicos e flavonas metoxiladas confere às plantas do gênero

propriedades antioxidantes (QI et al., 2021) e hepatoprotetoras (BENÍNE et al., 2023), reduzindo os danos celulares causados pelo estresse oxidativo.

Dentre as diversas propriedades biológicas atribuídas a *Scoparia*, destaca-se também o seu potencial antitumoral. Estudos recentes demonstram que extratos e compostos isolados desse gênero apresentam atividade antiproliferativa em linhagens celulares de diferentes tipos de câncer (XIANJUN et al., 2021). Acredita-se que esse efeito esteja relacionado à indução de apoptose, regulação do ciclo celular e modulação de vias de sinalização envolvidas na progressão tumoral, tornando essas espécies uma promissora fonte de moléculas bioativas para o desenvolvimento de novas terapias (IKANOVIC et al., 2021).

### 3.3 *Scoparia dulcis* L.

*S. dulcis*, popularmente conhecida como vassourinha, é uma planta herbácea pertencente à família Plantaginaceae. Com distribuição em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, África e Ásia, essa planta tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional devido às suas propriedades terapêuticas e aos inúmeros benefícios que proporciona à saúde. Sua popularidade em diferentes partes do mundo reflete não apenas suas qualidades medicinais, mas também sua capacidade de adaptação a diversos ambientes (PAUL et al., 2017).

Caracterizada por seu pequeno porte, a vassourinha normalmente atinge entre 30 e 100 cm de altura. Suas folhas opostas, lanceoladas e de coloração verde clara, juntamente com suas delicadas flores brancas ou rosadas, conferem à planta uma aparência singela, enquanto seus frutos em forma de cápsulas abrigam sementes pretas e brilhantes (HAYASHI, 1996). Essa combinação de características botânicas, aliada ao seu potencial terapêutico, explica por que tantas culturas a consideram um recurso valioso para tratamentos naturais (LIMA et al., 2019).

A planta apresenta um caule amplamente ramificado desde a base, com folhas simples, dispostas de forma oposta cruzada, constituída por flores pequenas, com 4 sépalas. A espécie produz um grande número de sementes, o que contribui para a sua fácil propagação.

Figura 1 - *Scoparia dulcis* L

Fonte: O autor (2025)

Esse potencial é amplamente atribuído à diversidade de propriedades medicinais da *S. dulcis*, que incluem ações diurética (LANS, 2007), anti-inflamatória (LIN et al., 2023), analgésica (LIMA et al., 2019), antidiabética (PATLE et al., 2023), antifúngica (NGUYEN et al., 2024), antimicrobiana (SIVASANKARAPILLAI et al., 2023) e antioxidante (M; A, 2023). Esses efeitos são proporcionados por compostos bioativos como flavonoides, terpenoides (RAFIQUE et al., 2023), alcaloides (AMINI et al., 2023) e taninos (EL HOSRY et al., 2023), os quais desempenham um papel crucial no tratamento de diversas enfermidades. Essa rica composição química contribui para que a planta seja um elemento importante tanto na medicina tradicional quanto em estudos científicos modernos.

No Brasil, *S. dulcis* é amplamente utilizada na medicina popular para tratar doenças como infecções urinárias (SUMA; VASANTHAKUMARI; VIJAYAKUMAR, 2016), problemas renais (SARKAR et al., 2020), diabetes (AFNAN et al., 2023), inflamações (OFORI-AMOAHA et al., 2024), cólicas menstruais (LANS, 2007) e problemas digestivos (WIDYAWARUYANTI et al., 2020). Além disso, é valorizada como tônico geral, auxiliando no fortalecimento do sistema imunológico e promovendo saúde e bem-estar. Sua presença em diferentes biomas brasileiros, como Caatinga (MAGALHÃES et al., 2019), Cerrado (ALMEIDA et al., 2024), Pantanal (T. S.; GEETHALAKSHMI, 2022) e Mata Atlântica (LOUREIRO et al., 2022), demonstra sua notável adaptabilidade a diversas condições ambientais, o que reforça sua importância cultural e medicinal no território nacional.

Em outras partes do mundo, como na Índia e no sudeste asiático, suas folhas e flores são utilizadas no alívio de problemas como, disenteria (UDDIN; KIBRIA; HASSAN, 2015),

tosse (OFORI-AMOAHA et al., 2024), bronquite (WIDYAWARUYANTI et al., 2020), e hipertensão (WIDYAWARUYANTI et al., 2020). Já na África, a vassourinha é reconhecida por propriedades antivirais (HASNAWATI et al., 2022), anticancerígenas (DURASAMY et al., 2023), digestivas (WIDYAWARUYANTI et al., 2020), afrodisíacas (AKENDENGUE et al., 2005), hepáticas (MISTRY et al., 2012) e eméticas (AKENDENGUE et al., 2005). Essa ampla gama de aplicações reflete o valor global da planta, evidenciando como sua versatilidade medicinal a torna uma das espécies mais apreciadas na medicina natural ao redor do mundo.

### 3.4 Câncer de Mama

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea, caracterizada pela proliferação descontrolada de células anormais no tecido mamário, resultando na formação de tumores com potencial para migrar e invadir tecidos distantes do tumor primário (INCA, 2022a). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2022b), estima-se que ocorram cerca de 73.610 novos casos anuais de câncer de mama durante o triênio de 2023 a 2025, tornando-o o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no Brasil, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. Embora raro, o câncer de mama também pode afetar homens, representando aproximadamente 1% dos casos.

O desenvolvimento do câncer de mama ocorre quando as células do tecido mamário começam a crescer de maneira descontrolada, formando uma neoplasia ou tumor. Essa proliferação anômala é frequentemente resultado de mutações genéticas que alteram o código genético das células, fazendo com que elas percam sua função regulada e comecem a se reproduzir excessivamente (EVANS et al., 2022). A multiplicação desordenada dessas células requer uma grande quantidade de nutrientes, levando à formação de novos vasos sanguíneos ao redor do tumor para suprir suas necessidades. Esse processo, denominado angiogênese, é um mecanismo fisiológico comum em eventos como a cicatrização, onde novos vasos são criados. No entanto, em neoplasias, a angiogênese se torna um fator crucial para a manutenção e sobrevivência das células tumorais, contribuindo para o crescimento contínuo do tumor e favorecendo sua disseminação (GRAFFEO et al., 2022).

Além do papel das mutações genéticas e da angiogênese, diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do câncer de mama. Predisposições genéticas, como mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, são bem documentadas, assim como fatores como idade avançada, histórico familiar e exposição prolongada a hormônios, como na terapia de reposição hormonal. Além disso, fatores ambientais e comportamentais, como o consumo de álcool,

sedentarismo e obesidade, também desempenham um papel importante no risco de desenvolvimento da doença. Embora não se possa prevenir completamente o câncer de mama, mudanças no estilo de vida, como a adoção de uma dieta balanceada e a prática regular de exercícios, podem ajudar a reduzir esses riscos (ŁUKASIEWICZ et al., 2021).

O tratamento do câncer de mama é multifacetado e pode incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapias-alvo, dependendo do estágio e da subtipagem do tumor. Novas abordagens terapêuticas, como a imunoterapia, têm mostrado resultados promissores, aproveitando a capacidade do sistema imunológico para reconhecer e atacar células tumorais. A personalização do tratamento, considerando as características moleculares do tumor e o perfil genético da paciente, tem se tornado uma tendência crescente na oncologia, visando melhorar a eficácia e minimizar os efeitos colaterais. Essa evolução no tratamento destaca a necessidade de pesquisa contínua e inovação na luta contra o câncer de mama (HARBECK et al., 2019).

Assim, a compreensão dos mecanismos subjacentes ao câncer de mama, desde suas características celulares até os fatores de risco associados, é crucial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes. O conhecimento sobre a interação entre fatores genéticos e ambientais não apenas facilita a identificação de indivíduos em risco, mas também pode informar intervenções que visam promover a saúde e reduzir a incidência da doença (OBEAGU; OBEAGU, 2024).

### **3.5 Câncer de bexiga**

O câncer de bexiga é uma das neoplasias mais comuns do sistema urinário, caracterizando-se pelo crescimento descontrolado de células que revestem a parede interna da bexiga. Este tipo de câncer representa uma importante preocupação de saúde pública, sendo o décimo mais frequente no mundo (KITA et al., 2024). Afeta predominantemente homens, pessoas idosas e indivíduos com histórico de tabagismo. Com base nesses dados epidemiológicos, pode-se observar que fatores de risco específicos desempenham um papel central na etiologia dessa doença, influenciando a prevalência em diferentes populações (ANTONI et al., 2017).

O tabagismo é um dos principais fatores de risco associados ao câncer de bexiga, com dados indicando que entre 15% e 25% dos novos diagnósticos ocorrem em indivíduos que ainda fumam ativamente. As substâncias químicas presentes no cigarro são metabolizadas no fígado e excretadas pela urina, expondo diretamente o epitélio da bexiga a carcinógenos. Além disso, a exposição ocupacional a aminas aromáticas, utilizadas em indústrias químicas e de corantes,

também está fortemente relacionada ao desenvolvimento desse tipo de tumor (BASSETT et al., 2021). Outros fatores de risco incluem infecções crônicas, como a esquistossomose, e um histórico familiar de câncer de bexiga, evidenciando a influência de agentes infecciosos e predisposições genéticas. Esses elementos ressaltam a importância de políticas de prevenção, como a promoção da cessação do tabagismo e o controle das exposições ocupacionais, para reduzir a incidência da doença (POWLES et al., 2022).

O diagnóstico precoce do câncer de bexiga é crucial para um melhor prognóstico e é frequentemente realizado por meio de cistoscopia, considerada o método padrão-ouro para detecção da doença (LEE et al., 2022). A cistoscopia permite a visualização direta do interior da bexiga e a coleta de biópsias para análise histopatológica, sendo essencial para confirmar a presença de malignidade. Métodos complementares, como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM), também desempenham um papel importante no estadiamento da doença, auxiliando na avaliação da extensão tumoral. Recentemente, a pesquisa de biomarcadores urinários tem mostrado avanços promissores como alternativas não invasivas para o diagnóstico, ainda que seu uso clínico esteja em fase de desenvolvimento (ANDERSON et al., 2021).

No que se refere à classificação, o câncer de bexiga é predominantemente do tipo carcinoma urotelial, que representa aproximadamente 90% dos casos. Este tipo de tumor pode ser classificado, de acordo com o sistema TNM, com base na profundidade de invasão da parede da bexiga (T), na presença de metástases regionais (N) e à distância (M). A distinção entre tumores não invasivos e invasivos à camada muscular é crucial, pois influencia diretamente o manejo terapêutico e o prognóstico dos pacientes. Tumores superficiais, que não invadem o músculo da bexiga, possuem um comportamento menos agressivo, enquanto os tumores invasivos apresentam maior risco de progressão e disseminação metastática (LIU; WANG; WANG, 2022).

O tratamento do câncer de bexiga envolve uma abordagem integrada que varia conforme o estágio da doença. Para tumores superficiais, a instilação intravesical de quimioterapia, como a gemcitabina (GEM), é uma estratégia promissora, frequentemente combinada com imunoterapia utilizando adjuvantes como CpG. Essa combinação visa não apenas eliminar as células tumorais, mas também estimular uma resposta imunológica, contribuindo para a redução das taxas de recorrência (LIU et al., 2024). Em casos de tumores invasivos, a cistectomia radical é considerada o tratamento padrão, podendo ser acompanhada de quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante. Para estágios metastáticos, a quimioterapia baseada em cisplatina, em conjunto com novas abordagens de imunoterapia, como inibidores

de checkpoint imunológicos, tem mostrado potencial para melhorar a sobrevida dos pacientes (JONES et al., 2024).

O prognóstico do câncer de bexiga é altamente variável e depende principalmente do estágio em que a doença é diagnosticada. Tumores detectados precocemente, que não invadem a camada muscular da bexiga, apresentam taxas de sobrevida em cinco anos superiores a 85%. Em contrapartida, casos com invasão muscular ou metástases à distância estão associados a um prognóstico mais reservado, com taxas de sobrevida de aproximadamente 5-15%. A alta taxa de recorrência, mesmo em tumores superficiais, exige um acompanhamento rigoroso por meio de cistoscopias regulares, o que impõe desafios ao manejo clínico a longo prazo (XIE et al., 2021).

Nos últimos anos, o avanço da imunoterapia e o desenvolvimento de terapias-alvo têm aberto novas perspectivas para o tratamento de pacientes com câncer de bexiga, especialmente em estágios avançados. O uso de inibidores de checkpoint imunológico tem mostrado resultados promissores em ensaios clínicos, ampliando as opções de tratamento para pacientes com doença metastática ou resistente à quimioterapia convencional. Além disso, novas estratégias de diagnóstico, como a detecção de DNA tumoral circulante, estão sendo investigadas para permitir uma detecção mais precoce da doença. Essas inovações têm o potencial de melhorar significativamente o manejo do câncer de bexiga nos próximos anos (XIAO et al., 2024).

O câncer de bexiga continua a representar um desafio considerável na oncologia, especialmente devido às altas taxas de recorrência e à necessidade de vigilância constante. A prevenção primária, focada na cessação do tabagismo e na redução da exposição a agentes químicos, é essencial para diminuir a incidência da doença. Paralelamente, os avanços no diagnóstico precoce e as novas terapias, particularmente a imunoterapia, oferecem esperança de melhores desfechos clínicos e maior qualidade de vida para os pacientes (AHMADI; SHAFEE; MOUDI, 2024).

## 3.6 Terapias do Câncer

### 3.6.1 Quimioterapia

A quimioterapia é um dos métodos mais reconhecidos e amplamente utilizados no tratamento do câncer, sendo uma abordagem que utiliza substâncias químicas para destruir células malignas, impedindo seu crescimento e multiplicação. Desde sua introdução na prática médica, essa terapia evoluiu, contribuindo para o aumento das taxas de sobrevivência e uma melhoria expressiva na qualidade de vida dos pacientes (MOK et al., 2024).

Uma característica fundamental da quimioterapia é a atuação dos agentes quimioterápicos nas diferentes fases do ciclo celular, com um alvo preferencial nas células de divisão rápida. Embora essa especificidade seja eficaz no combate ao câncer, ela também afeta células saudáveis que possuem altas taxas de proliferação celular, como as da medula óssea, do trato digestivo e dos folículos capilares. Como consequência, surgem os efeitos colaterais frequentemente associados a esse tratamento, evidenciando o equilíbrio delicado entre eficácia terapêutica e toxicidade (ATMACA; OGUZ; ILHAN, 2024).

Diferentes classes de agentes quimioterápicos apresentam mecanismos de ação específicos, que variam de acordo com os alvos moleculares e a fase do ciclo celular afetado. Esses mecanismos estão resumidos na Tabela 1, que apresenta uma visão geral das principais classes de quimioterápicos e suas respectivas ações. Além disso, a Figura 2 ilustra os principais quimioterápicos utilizados na prática clínica e suas interações celulares.

Tabela 1 - Mecanismos de ação da quimioterapia

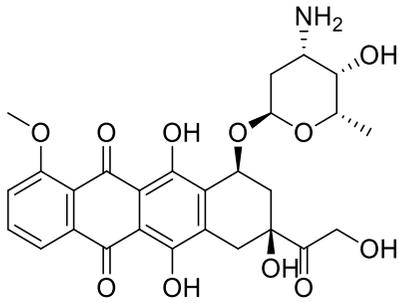
<b>Tipo de Agente</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Referências</b>
Antraciclinas	Doxorrubicina, Epirubicina	Causam quebras no DNA, inibem a topoisomerase II e geram radicais livres, induzindo apoptose celular	(LIU et al., 2022)
Taxanos	Paclitaxel, Docetaxel	Interrompem a formação do fuso mitótico, crucial para a divisão celular, impedindo a mitose.	(KAPLAN et al., 2023)
Antimetabólitos	Metotrexato, 5-Fluorouracil	Interfere na síntese de DNA e RNA, bloqueando a replicação celular	(TIAN et al., 2021)
Alquilantes	Ciclofosfamida	Introduzem grupos alquil no DNA,	(PATIAS et al., 2024)

Inibidores da Topoisomerase	Topotecano, Irinotecano	causando ligações cruzadas e quebras na cadeia de DNA, impedindo a replicação e transcrição. Inibem as enzimas topoisomerase I e II, prevenindo a replicação e transcrição do DNA.	(SCHWANDT et al., 2012)
-----------------------------	-------------------------	---	-------------------------

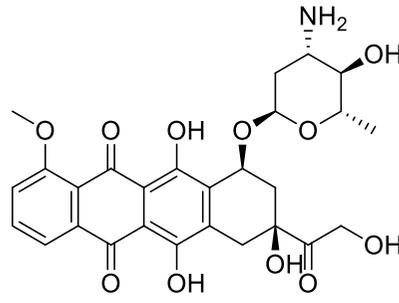
---

Fonte: O autor (2025)

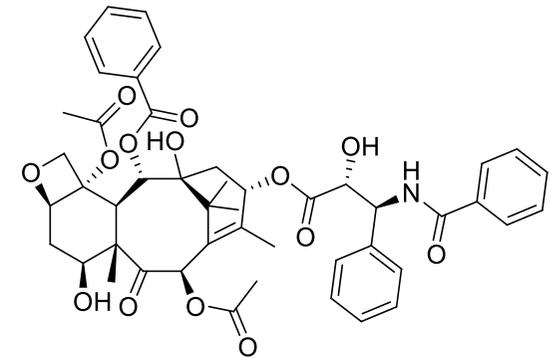
Figura 2 - Estrutura química dos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer



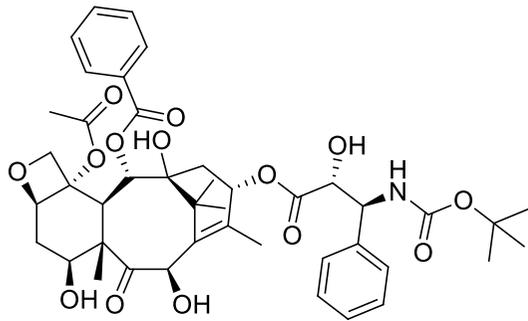
Doxorrubicina



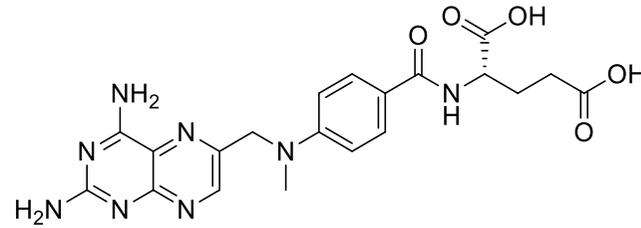
Epirubicina



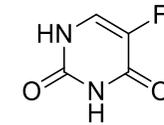
Paclitaxel



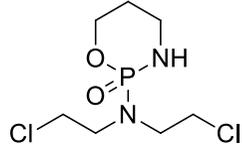
Docetaxel



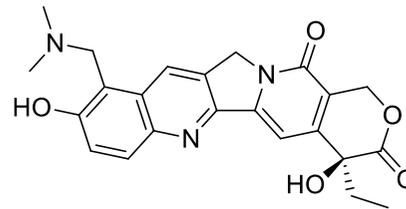
Metotrexato



5-Fluorouracil



Ciclofosfamida



Topotecano

A compreensão dos mecanismos de ação dos quimioterápicos é essencial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos tóxicas. A associação entre diferentes classes de quimioterápicos tem sido uma estratégia amplamente empregada para potencializar a resposta antitumoral, minimizar a resistência celular e reduzir os efeitos colaterais. Estudos recentes têm explorado combinações de agentes quimioterápicos com compostos naturais, visando melhorar a eficácia terapêutica e a tolerabilidade dos tratamentos.

### 3.6.2 Radioterapia

A radioterapia é uma das principais modalidades terapêuticas no tratamento de câncer e outras doenças, desempenhando papel crucial na medicina moderna. O uso de radiação ionizante para controlar o crescimento de tumores malignos tem sido amplamente estudado e aprimorado ao longo dos anos, com avanços nas técnicas de aplicação e nos dispositivos utilizados (FIONDA; REMBIELAK, 2023)

A eficácia desse tratamento reside na capacidade de direcionar altas doses de energia às células cancerígenas, aproveitando as propriedades da radiação ionizante. Essa radiação pode ser administrada por diferentes abordagens, dependendo das características do tumor e do quadro clínico do paciente (LANDAU et al., 2023). A teleterapia, por exemplo, utiliza máquinas externas para emitir a radiação diretamente sobre uma área-alvo (LASKAR et al., 2022), enquanto a braquiterapia envolve a implantação de fontes radioativas próximas ou dentro do tumor, proporcionando um tratamento mais localizado (FIONDA et al., 2023).

Os mecanismos de ação da radioterapia variam conforme a interação da radiação com o tecido tumoral, seja por meio de danos diretos ao DNA (FERREIRA et al., 2023) ou pela geração de radicais livres que comprometem a integridade celular (TAO et al., 2023). **A Tabela 2** apresenta uma síntese dos principais mecanismos de ação envolvidos nesse processo.

Tabela 2 - Mecanismos de ação da radioterapia

<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referências</b>
Danos ao DNA	A radiação ionizante causa quebras nas fitas de DNA, interferindo na capacidade das células se replicarem.	(AMEIXA; BALD, 2024)
Formação de radicais livres	A radiação interage com moléculas de água nas células, produzindo radicais livres que danificam componentes celulares essenciais.	(JAVED et al., 2022)

Indução de Apoptose O dano ao DNA pode ativar vias apoptóticas levando a morte celular programada (KELLO et al., 2020)

---

Fonte: O autor (2025)

## 4. Metodologia

### 4.1 Coleta

As partes aéreas de *S. dulcis* L. foram coletadas na Cidade Universitária Dom Delgado, na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em São Luís (MA, Brasil), em março de 2023. A coleta foi realizada na localização exata de Latitude 02° 33' 8" S, Longitude 44° 18' 25" W e Altitude 24 m.

A espécie foi identificada pela professora Ana Zelia Silva no herbário "Ático Seabra" da UFMA, onde está catalogada sob o número de exsicata 1528. A coleta foi conduzida em conformidade com as leis brasileiras de proteção à biodiversidade, conforme registrado no SisGen (Nº AABBCA4).

### 4.2 Preparo do extrato

As partes aéreas de *S. dulcis* foram submetidas à secagem em temperatura ambiente durante sete dias, em ambiente protegido de luz direta e com ventilação adequada para preservar os compostos bioativos. Após esse período, o material seco foi triturado em moinho de facas até a obtenção de partículas homogêneas, facilitando o contato com o solvente durante a etapa de extração.

O material triturado (100,0 g) foi submetido à extração por percolação exaustiva com etanol 70% como solvente extrator. Inicialmente, o material vegetal foi transferido para um percolador de vidro com capacidade adequada, sendo levemente compactado para evitar obstruções no fluxo do solvente. O etanol 70% foi adicionado até a saturação completa do material, seguido por um período de pré-extração por imersão de 24 horas, garantindo a solubilização inicial dos compostos bioativos.

Após essa etapa, iniciou-se a drenagem lenta e contínua do percolado, que foi coletado em frascos âmbar para evitar a degradação dos compostos sensíveis à luz. Para assegurar uma extração completa, volumes adicionais de etanol 70% foram progressivamente adicionados ao percolador, mantendo uma taxa constante de percolação. O processo foi mantido até que o percolado se tornasse incolor, indicando o esgotamento do material vegetal.

Concluída a extração, o percolado foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, mantendo a temperatura abaixo de 40°C para preservar compostos voláteis e termo-sensíveis. Posteriormente, o concentrado foi liofilizado em liofilizador Liotop,

modelo K105 (Brasil), por 48 horas, a uma temperatura de  $-95^{\circ}\text{C}$  e pressão de  $12\ \mu\text{Hg}$ , resultando na obtenção de um extrato seco, pronto para análises posteriores.

### 4.3 Partição líquido/líquido

O Extrato Bruto (EFSD) foi submetido a um processo de extração líquido-líquido em grande escala, utilizando solventes com diferentes polaridades para a separação dos compostos presentes. Primeiramente, 8 g do extrato bruto foram dissolvidos em 80 mL de uma solução aquosa de água/metanol na proporção de 7:3, visando solubilizar os compostos com diferentes características químicas. Após essa dissolução, a mistura foi particionada com 160 mL clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), escolhido como solvente de interesse devido à sua capacidade de extrair compostos apolares.

O particionamento foi realizado em três etapas consecutivas, com um intervalo de 24 horas entre cada extração. Após a mistura, a fase orgânica (clorofórmio) foi separada e coletada ao final de cada extração, visando a obtenção da fração de interesse. Esse processo permitiu a concentração e o isolamento de compostos lipofílicos presentes no extrato bruto.

### 4.4 Anotação dos constituintes químicos de *Scoparia dulcis*

#### 4.4.1 Análise do perfil cromatográfico de extrato bruto e fração clorofórmica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta-visível (HPLC-UV/VIS)

O extrato bruto e a fração clorofórmica foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta-visível (HPLC-UV-Vis). Para a preparação das amostras, 5 mg do extrato bruto e da fração clorofórmica foram dissolvidos em 1 mL de metanol grau HPLC.

Para o extrato bruto, foi realizada uma etapa de limpeza para remover possíveis contaminantes, como a clorofila. Essa etapa foi conduzida por extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 (500 mg de fase estacionária), previamente ativados com 5 mL de metanol e equilibrados com 5 mL de uma solução de metanol e água (8:2, v/v). Após a purificação, o extrato foi filtrado em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) com porosidade de  $0,22\ \mu\text{m}$  e posteriormente seco. O resíduo seco foi dissolvido em metanol de grau HPLC, resultando em uma concentração final de  $10\ \text{mg/mL}$ . Alíquotas de  $20\ \mu\text{L}$  dessa

solução foram injetadas diretamente no sistema HPLC-PDA, com detecção em uma faixa de absorção de 254 a 365 nm.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizado foi um modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), composto por um módulo de injeção de solvente, uma bomba binária e um detector UV-Vis (SPA-10A). A coluna empregada foi uma Luna C18 5,0  $\mu\text{m}$  100 Å (150 mm  $\times$  4,6 mm). Os solventes de eluição foram: A (0,01% ácido fórmico em água) e B (metanol). O extrato e a fração clorofórmica foram analisados utilizando um gradiente de eluição de 5 a 100% de B em 60 minutos. O fluxo foi mantido a 1 mL/min e a temperatura da coluna foi ajustada para 20 °C. O volume de injeção das amostras foi de 30  $\mu\text{L}$ . Os dados obtidos foram processados com o software LC Solution 2.3 (Shimadzu).

#### **4.4.2 Cromatografia líquida acoplada a um íon trap com interface de ionização por eletrospray e um analisador de massas de baixa resolução**

Os componentes A e B da fase móvel consistiram em água deionizada (A) e metanol (B) de pureza HPLC, com a adição de 0,1% de ácido fórmico. As amostras (extrato bruto e a fração clorofórmica) foram analisadas em modo gradiente, iniciando com 5% de B e aumentando gradualmente até 100% após 60 minutos, com um fluxo de 1 mL/min, utilizando uma coluna Luna C18 de 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å (250 x 4,6 mm). O forno da coluna foi mantido a 35 °C durante todas as análises. A faixa de aquisição do comprimento de onda do detector DAD foi de 190 a 800 nm.

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados em um espectrômetro de massas Bruker. A matriz foi analisada utilizando ionização por eletrospray (ESI), com fragmentação em múltiplos estágios ( $\text{MS}^2$  e  $\text{MS}^3$ ) realizada em uma interface de aprisionamento de íons (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massa de primeira ordem (MS), e o experimento foi conduzido nas seguintes condições: pressão do gás de nebulização ajustada para 50,0 psi; temperatura capilar de 300 °C; voltagem de entrada do capilar de transferência mantida a -4500 V. O gás de dessolvatação ( $\text{N}_2$ ) foi usado com um fluxo de 10 L/min, e o gás de colisão foi o hélio (He). A faixa de aquisição foi de  $m/z$  50-1200. O software Data Analysis foi utilizado para adquirir e processar os dados.

#### 4.4.3 Isolamento do VAMF-1 e VAMF-2

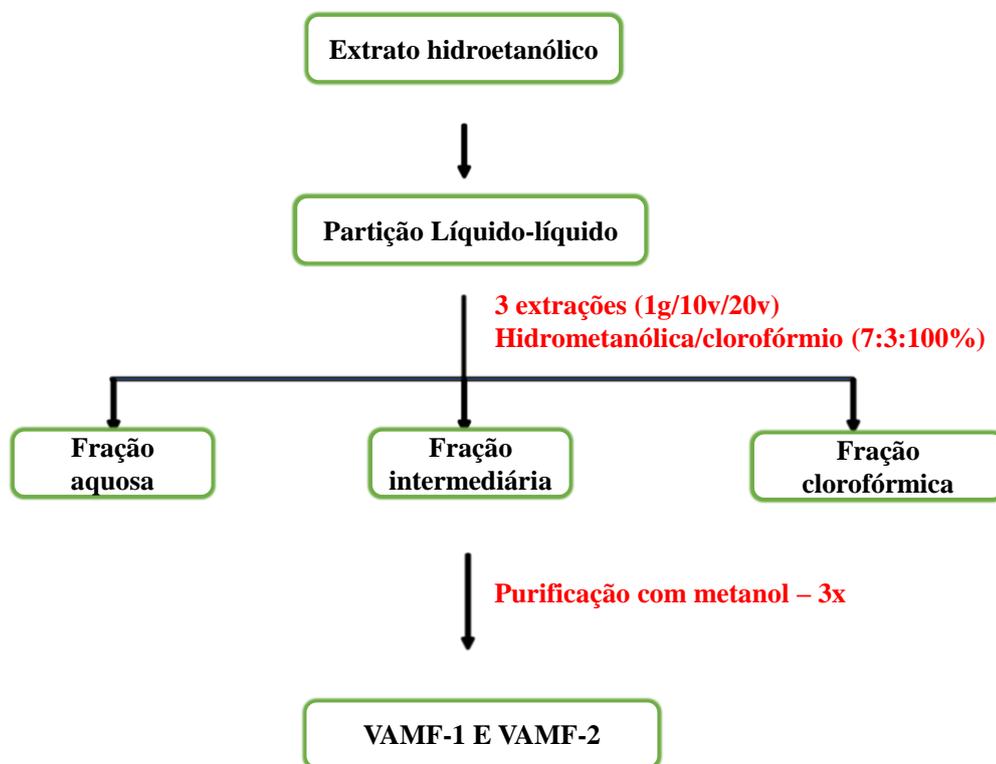
O VAMF-1 e o VAMF-2 foram obtidos por meio de uma extração líquido-líquido, onde três fases distintas foram formadas no funil de separação. Os compostos de interesse foram localizados na fase intermediária, que foi cuidadosamente extraída, conforme ilustrado no Esquema 1. A seguir, a fração intermediária foi submetida a um processo de purificação por recristalização com metanol. Durante esse processo, o VAMF-1 foi isolado por precipitação a partir da amostra, enquanto o VAMF-2 foi obtido a partir do sobrenadante da recristalização, que continha os compostos não precipitados.

A recristalização foi realizada para melhorar a pureza dos compostos, permitindo a separação de impurezas solúveis e a obtenção dos compostos de interesse em forma mais pura. Após esse procedimento, o VAMF-1 foi coletado como um sólido precipitado, enquanto o VAMF-2 permaneceu na fase líquida, sendo separado e recuperado após a decantação.

Essa metodologia foi padronizada pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), garantindo a reprodutibilidade e a eficiência do processo de isolamento e purificação.

Uma vez purificados, os compostos VAMF-1 e VAMF-2 foram analisados por técnicas de perfil químico e espectrometria de massas, utilizando os métodos descritos nas seções 4.4.1 e 4.4.2. Além disso, ambos os compostos foram submetidos a ensaios biológicos e citotóxicos para investigar suas atividades biológicas e potenciais efeitos terapêuticos.

Esquema 1 - Método de extração do VAMF-1 (cirsimarina) e VAMF-2 (cirsimaritina)



Fonte: O autor (2025).

#### 4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .

Os dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D foram obtidos em um equipamento da Bruker Ascend 400 MHz com campo magnético de 14,1 T. Os deslocamentos químicos foram referidos em partes por milhão ( $\delta$ ) usando o sinal residual do tetrametilsilano (TMS), DMSO ( $d_6$ ) sinais ( $\delta\text{H}$  2.5;  $\delta\text{C}$  39.5), como padrões internos para RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Os dados foram processados no software MestreNova da empresa Mestrelab Research.

#### 4.5 Avaliação do potencial antioxidante do EFSD por DPPH

A atividade antioxidante do EFSD foi avaliada pelo ensaio de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Para isso, 2000  $\mu\text{g}$  do extrato foram solubilizados em 1 mL de etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), obtendo-se uma solução estoque na concentração de 2 mg/mL. A partir dessa solução, foram preparadas diluições para atingir as concentrações finais de 500, 250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ .

A solução de DPPH foi preparada dissolvendo-se 2 mg do radical em 50 mL de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de cada concentração do extrato, seguidos de 190  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH. Após incubação por 30 minutos, a absorbância foi medida a 518 nm e os valores foram convertidos na porcentagem de atividade antioxidante.

O controle positivo consistiu em trolox na concentração de 2500  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto o controle negativo foi composto por metanol e DMSO. O branco continha apenas metanol. O ensaio foi realizado em triplicata.

O teste foi conduzido apenas com o extrato, uma vez que a classe de metabólitos secundários predominante consiste em flavonoides, que possuem grupos hidroxila em sua estrutura. Essas hidroxilas permitem a doação de elétrons, favorecendo a neutralização dos radicais livres e justificando a avaliação antioxidante do extrato como um todo.

Os valores de  $\text{CI}_{50}$  foram determinados por regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), com experimentos realizados em triplicata.

## 4.6 Ensaio Anticâncer

### 4.6.1 Linhagens celulares e condições de cultura

A linhagem celular MCF-7 (ATCC® HTB-22™), derivada de adenocarcinoma de mama metastático, foi adquirida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ; Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células MCF-7 foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB), ambas fornecidas pela Gibco (Grand Island, NY, EUA). Além disso, o meio de cultivo continha penicilina (0,06 g/L, CAS: 69-57-8), estreptomicina (0,10 g/L, CAS: 3810-74-0) e bicarbonato de sódio (0,24%, Sigma-Aldrich). As culturas celulares foram mantidas em frascos de 60 mL com uma área de crescimento de 25 cm<sup>2</sup>, incubadas a 37°C em uma atmosfera controlada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa, utilizando uma incubadora Thermo Scientific 3110 Series II CO<sub>2</sub> Water Jacketed (Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA, EUA). As células foram subcultivadas ao atingirem 80-90% de confluência, com trocas regulares do meio de cultura a cada 2-3 dias para garantir condições ótimas de crescimento. Todos os experimentos foram conduzidos utilizando células entre a terceira e a oitava passagem, garantindo a consistência e reprodutibilidade dos resultados.

A linhagem celular T24 (ATCC® HTB-4), derivada de carcinoma urotelial de células transicionais da bexiga grau III, foi gentilmente doada pelo Dr. Wagner José Favaro, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As células T24 foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, 11875093, Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino triplamente filtrado e esteril (FBS, 10-bio500, Nova Biotecnologia, BR) e 1% de solução antibiótico-antimicótico 100X (15240062, Gibco, EUA). A cultura foi mantida em estufa umidificada a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

Nos ensaios experimentais, as concentrações do extrato bruto (50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL) utilizadas na linhagem MCF-7 foram aplicadas de forma idêntica às células T24. O VAMF-1 foi avaliado exclusivamente na linhagem MCF-7, nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160 e 320 µM, uma vez que o grupo de pesquisa do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON) já realiza ensaios com esse composto, e todas as concentrações testadas seguiram o protocolo do laboratório. O VAMF-2 foi testado em ambas as linhagens, nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 40, 80 e 160 µM.

Para garantir a uniformidade e reprodutibilidade dos tratamentos, tanto o extrato quanto o VAMF-1 e VAMF-2 foram solubilizados previamente em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5%.

#### 4.6.2 Diluição dos Tratamentos

##### 4.6.2.1 Extrato hidroetanólico, VAMF-1 e VAMF-2

O extrato bruto, o VAMF-1 e o VAMF-2 foram dissolvidos em uma solução composta por dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão fosfato salino (PBS), misturados em proporções iguais, assegurando a solubilidade adequada dos compostos em cultura celular. Essas diluições foram preparadas de modo a permitir uma avaliação precisa da resposta celular aos tratamentos, garantindo que as concentrações fossem adequadas para os testes de viabilidade e atividade biológica nas culturas celulares.

##### 4.6.2.2 Controles Solvente e Positivo (Docetaxel e Cisplatina)

O extrato hidroetanólico bruto, o VAMF-1 e o VAMF-2 foram inicialmente diluídos em partes iguais de dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão fosfato salino (PBS), resultando em uma solução com 50% de DMSO. Essa solução foi subsequentemente diluída 100 vezes para os tratamentos em cultura celular, estabelecendo uma concentração final de 0,5% de DMSO nos ensaios bidimensionais (2D).

Nos ensaios tridimensionais (3D), a concentração final do controle solvente foi ajustada para 0,25% de DMSO, devido à diluição adicional dos tratamentos com 50% do meio de cultura utilizado nas células. As concentrações testadas para o extrato bruto variaram entre 50-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o VAMF-1 foi avaliado exclusivamente na linhagem MCF-7 com concentrações de 10-320  $\mu\text{M}$ , enquanto o VAMF-2 foi aplicado em ambas linhagens com concentrações de 1-160  $\mu\text{M}$ .

Como controle positivo, foram utilizados docetaxel e cisplatina a 50  $\mu\text{M}$  nos ensaios 2D, enquanto nos ensaios 3D o controle consistiu em docetaxel a 92,8  $\mu\text{M}$ . Esse planejamento experimental assegurou a padronização dos tratamentos, minimizando interferências do solvente e possibilitando uma avaliação precisa das respostas celulares.

#### 4.6.3 Ensaio de viabilidade Celular MTT

A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], onde células viáveis são detectadas por sua capacidade de converter MTT em cristais insolúveis de formazan, conforme descrito por (DENIZOT; LANG, 1986). Células de câncer mama e bexiga foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço com meio DMEM e RPMI, respectivamente para as duas linhagens, contendo 10% de SFB e incubadas nas condições anteriores. No dia seguinte, após a adesão celular, o meio foi substituído por diferentes concentrações de extrato bruto (50-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), VAMF-1 (10-320  $\mu\text{M}$ ) e VAMF-2 (1-160  $\mu\text{M}$ ), e as células foram incubadas por 24h.. Após o período de incubação, o tratamento foi removido, os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (tampão PBS, pH 7,2) e, em seguida, uma solução de meio contendo 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  de reagente MTT foi adicionada a cada poço e a placa foi incubada nas condições anteriores por 3 h (item 4.6.1). Em seguida, a solução de MTT foi descartada e os cristais de formazan azul escuro foram dissolvidos em etanol. A absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de espectrofotômetro de microplacas (Epoch®, BioTekInstruments USA/ Gen5 Software). Os resultados foram expressos como porcentagens de células vivas em comparação com células controle (células sem tratamento). Os dados foram analisados usando ANOVA One-Way, Teste de Normalidade e Linearidade, seguido de comparações do Teste de Shapiro-Wilk com o software GraphPad Prism8. Para cada amostra, os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes, com cada experimento realizado em triplicata. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.6.4 Ensaio Clonogênico 2D

O ensaio clonogênico foi realizado de acordo com Franken et al. (2006) para avaliar a sobrevivência celular. Primeiramente, células MCF-7 ( $5 \times 10^5$ ) foram semeadas em placas de 24 poços (Cat. No. K12-012; Kasvi, Guangzhou, China) e estabilizadas em meio de cultura completo por 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com EFSD (25-100  $\mu\text{g/mL}$ ) e VAMF-1 (10-320  $\mu\text{M}$ ) por mais 24 h na ausência de SFB. O VAMF-2 não foi testado, pois apresentou baixa eficiência no ensaio de viabilidade celular com MTT, motivo pelo qual não foram realizados os ensaios seguintes com esse composto. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e 300 células viáveis foram transferidas para placas de 6 poços (Cat. No. K12-

006; Kasvi, Guangzhou, China) contendo meio completo. As placas foram incubadas por 10 dias. Após esse período, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e fixadas com ácido acético, metanol e água destilada (1:1:8) por 30 min. As células foram coradas com 5% de Giemsa por 5 min, lavadas com água destilada e secas ao ar em temperatura ambiente. As colônias foram contadas usando um estereomicroscópio binocular Leica ES2 Microsystems (Schweiz), com uma colônia definida como contendo aproximadamente 50 células. Os resultados foram normalizados para o controle de solvente (SV), definido como 100% de sobrevivência celular.

#### 4.6.5 Ensaios 3D

##### 4.6.5.1 Formação de esferóides multicelulares tumorais 3D (MCTS)

Os MCTSs 3D foram cultivados conforme descrito por Friedrich et al. (2009). A formação dos esferóides 3D foi iniciada em placas de 96 poços (Greiner Bio-One; Monroe, NC, EUA), previamente revestidas com 1,5% de agarose de ponto de fusão normal (NMP) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (Vinci et al., 2013). Para o revestimento, 450 mg de agarose NMP foram dissolvidos em 33 mL de meio DMEM incompleto. A solução foi autoclavada por 20 minutos a 121 °C, e 50 µL dessa solução foram pipetados em cada poço das placas de 96 poços utilizando um multipipetador CappR10 (Capp, Nordhausen, Alemanha).

Após a solidificação da agarose, 200 µL de meio DMEM completo contendo células MCF-7 ( $5,0 \times 10^3$ ) foram adicionados a cada poço. As placas foram então centrifugadas em uma centrífuga de microplacas Mini P25 por 5 minutos, resultando na formação de um esferóide por poço. Em seguida, as placas foram transferidas para uma incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C e 95% de umidade, onde foram mantidas imóveis por três dias (72 horas).

As fotomicrografias dos esferóides foram capturadas usando um sistema de imagem acoplado ao microscópio invertido Olympus CKX41, com objetivo de 4×, e o software Qimaging Pro 7.1 (Teledyne, Canadá). As imagens foram analisadas com o software Zen 2.3.

#### 4.6.5.2 Ensaio de Resazurina e Análise de Integridade

O ensaio de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi conduzido conforme o protocolo descrito por Walzl et al. (2014), realizado 72 horas após a formação dos esferoides. Após o tratamento com o extrato, adicionou-se a cada poço da placa 40  $\mu$ L de uma solução de resazurina a 0,015 mg/mL, diluída em PBS. A placa foi incubada por 24 horas em uma estufa Thermo Scientific, mantida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 96% de umidade relativa.

Após a incubação, a leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro Biotek Elx800 (Winooski, EUA), utilizando comprimentos de onda de 570 nm para resofurina e 600 nm para resazurina. As absorbâncias obtidas foram corrigidas pelo fator de oxidação específico para cada comprimento de onda. A viabilidade celular foi calculada com base na diferença entre os valores obtidos a 570 nm e 600 nm. Os dados foram normalizados considerando o controle do solvente (CS) como 100% de viabilidade celular.

Além disso, foi realizada a análise da integridade dos esferoides por meio de fotomicrografias obtidas nos tempos de 0h (dois dias após a iniciação) e 72h. As imagens dos esferoides foram capturadas em um microscópio invertido Olympus CKX41 com objetiva de 4x, utilizando o software Qimaging Pro 7.1 (Teledyne, Canadá). As imagens foram avaliadas para detectar irregularidades nos esferoides, como desagregação ou aglomeração celular, a fim de analisar a integridade e a morfologia dos esferoides. Para a análise de volume e crescimento, foi medida a circunferência dos esferoides com o auxílio do software Zen 2.3 (Zeiss, Alemanha), utilizando a ferramenta 'Measure'. A área correspondente ao esferoide foi expressa em  $\mu$ m<sup>2</sup>.

#### 4.6.6 Análise Estatística

Os ensaios descritos foram realizados em triplicatas biológicas. Os resultados dos ensaios biológicos obtidos após tratamentos com o extrato e VAMF-2 e seus respectivos controles (solvente e positivo) foram submetidos à análise de normalidade de distribuição de dados pelo Teste de Shapiro-Wilk. As amostras que demonstraram distribuição paramétrica foram analisadas pelo teste de ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet ou Tukey, considerando valores de  $p \leq 0,05$  como significativos. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, EUA)

## 4.7 Avaliação da toxicidade aguda do EFSD

### 4.7.1 Aquisição e manutenção das larvas de *Tenebrio molitor*

Para o processo de aquisição e manutenção, utilizou-se a metodologia empregada por Navarro *et. al.*, (2019), com algumas adaptações. As larvas de *T. molitor* entre o 10º e 12º estágio larval foram adquiridas comercialmente através de fornecedores especializados na venda de animais invertebrados e posteriormente mantidas no Laboratório de Química de Produtos Naturais. As larvas foram acondicionadas em recipientes plásticos cobertos com tela ao abrigo de luz, contendo ração padronizada a base de farelo de trigo, milho e aveia na proporção 2:2:2.

Para a definição dos grupos teste, seguiu-se alguns critérios, sendo excluídas do ensaio as larvas que apresentaram alterações em sua cor padrão, sem resposta ao toque e motilidade lenta, incluindo larvas com tamanhos similares e aspecto visualmente saudáveis.

### 4.7.2 Ensaio de toxicidade aguda do Extrato hidroetanólico

O teste de toxicidade aguda foi realizado como descrito por Silva *et al.*, (2022), com adaptações. Para a definição dos grupos teste foram selecionadas larvas em condições favoráveis como descrito no item 4.7.1 foi estabelecido n=10 de larvas para cada grupo.

A formação dos grupos foi determinada de acordo com as concentrações definidas do EFSD, 1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e como controles foram utilizados, controle Limpo (grupo constituído apenas pelas larvas e a alimentação), controle Trauma (grupo formado pelas larvas e a alimentação, mas sem a aplicação de nenhuma amostra, sendo apenas utilizada uma seringa para induzir o estímulo nas larvas), além dos grupos tratados com PBS 1%, DMSO 1% e água e álcool 70%. Para o procedimento das injeções agudas das substâncias teste, as larvas inicialmente foram submetidas à paralisação por esfriamento em superfície de vidro com gelo, e após foram submetidas à desinfecção na porção ventral com álcool 70% e, com o auxílio de uma seringa analítica (Hamilton, Modified Microliter™) foram injetados 10 $\mu\text{L}$  dos diferentes tratamentos pela via intrahemocélica no quarto metâmero, na porção ventral das larvas.

Após o procedimento as larvas foram transferidas para as suas respectivas placas de Petri, de acordo com os seus grupos, contendo ração padronizada e protegidas da luz, com temperatura e umidade favoráveis. A sobrevivência foi monitorada diariamente, durante 7 dias,

quantificou-se o número de larvas mortas, observando-se a melanização das larvas e a resposta a um estímulo de toque suave com uma pinça.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Rendimento do extrato e fração clorofórmica de *Scoparia dulcis*

A obtenção do extrato bruto das partes aéreas de *S. dulcis*, e da fração clorofórmica seguiu a metodologia estabelecida pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-UFMA), para a extração de metabólitos secundários. A tabela 3 mostra o rendimento obtido tanto do extrato, quanto da fração clorofórmica.

Tabela 3 - Rendimento do extrato bruto e da fração clorofórmica de *Scoparia dulcis*

Etapa	Material inicial	Material obtido	Rendimento
Extrato bruto	100g do material botânico	15g	15%
Fração clorofórmica	8g do extrato bruto	0,8g	10%

Fonte: O autor (2025).

O etanol a 70%, devido à sua polaridade intermediária, mostrou-se um solvente altamente eficiente e seletivo para a extração de metabólitos secundários das partes aéreas de *S. dulcis*. Com um rendimento de 15%, esse solvente é capaz de extrair uma ampla gama de compostos, abrangendo desde os de alta polaridade até os de polaridade intermediária. Isso ocorre porque o etanol a 70% pode interagir com uma diversidade de grupos funcionais presentes nas moléculas, como hidroxilas e outras funções polares, favorecendo a extração de substâncias tanto hidrossolúveis quanto moderadamente lipofílicas.

Por outro lado, o clorofórmio, devido à sua natureza apolar e alta solubilidade para compostos lipofílicos, demonstrou ser mais eficaz na extração de substâncias com baixa polaridade. Esses compostos, geralmente de características mais lipofílicas, como certos flavonoides prenilados e terpenos, são mais facilmente solubilizados em solventes apolares, como o clorofórmio. Assim, cada solvente foi escolhido com base nas propriedades de polaridade dos metabólitos a serem extraídos, garantindo a obtenção de frações representativas das diferentes classes de compostos presentes no extrato de *S. dulcis*.

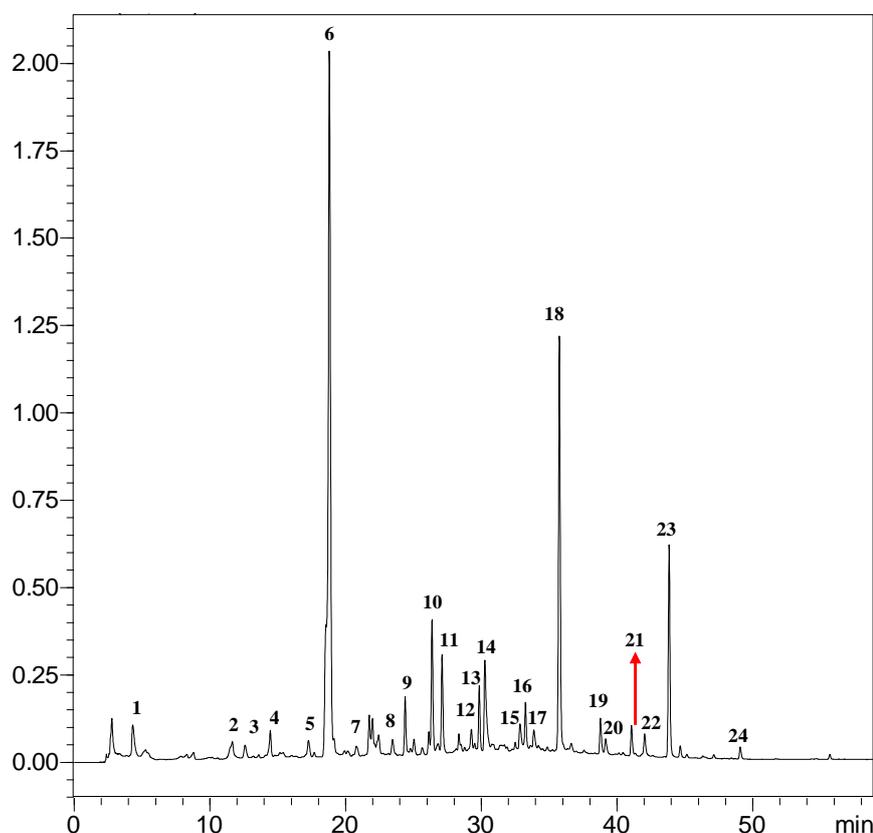
#### 5.1.1 Perfil químico do extrato, fração clorofórmica

A análise cromatográfica por HPLC-PDA revelou perfis químicos distintos para o extrato bruto, a fração clorofórmica, VAMF-1 e VAMF-2. O cromatograma do extrato bruto

apresentou uma eluição eficiente, utilizando o método exploratório, com picos bem definidos e simétricos (Figura 3). Esse perfil complexo indica a presença de uma diversidade de compostos, abrangendo moléculas de alta, média e baixa polaridade. No início do cromatograma, predominam compostos de alta polaridade, enquanto os compostos de baixa polaridade eluem no final da corrida cromatográfica, onde se pode observar uma variedade de moléculas e de classes químicas, como ácidos fenólicos e flavonoides, tanto glicosilados quanto metoxilados, evidenciando a complexidade e a diversidade química do extrato.

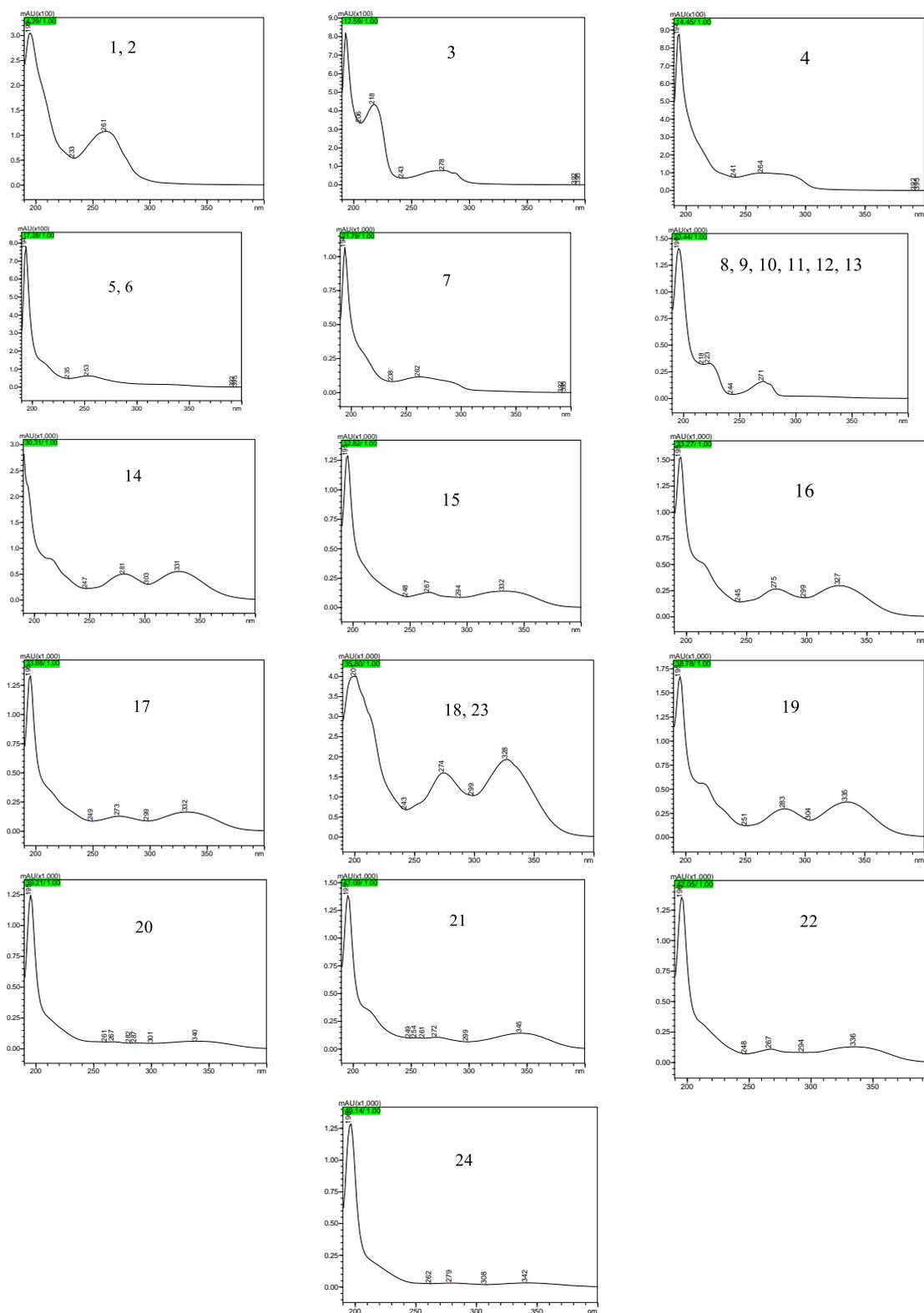
A análise dos espectros UV obtidos durante a cromatografia confirmou essa diversidade química, revelando padrões de absorção típicos dessas classes de compostos (Figura 4). Os flavonoides exibiram duas bandas principais de absorção, associadas às transições eletrônicas  $\pi \rightarrow \pi^*$ : a Banda I (300-380 nm), atribuída ao anel B, e a Banda II (240-280 nm), relacionada ao anel A. Por outro lado, os ácidos fenólicos apresentaram uma única banda de absorção na faixa de 250 a 280 nm, correspondente à transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  do núcleo benzênico (HARBORNE; MABRY; MABRY, 1975).

Figura 3 - Cromatograma HPLC-PDA 254 nm do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *Scoparia- dulcis*. Coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4.6 nm; 5  $\mu$ m), fluxo 1 mL/min.



Fonte: O autor (2025).

Figura 4 - Espectros de absorção UV-Vis dos compostos presentes no extrato hidroetanólico



Fonte: O autor (2025).

Pelo perfil obtido da fração clorofórmica, observa-se que a extração líquido-líquido (Item 4.3) foi bastante seletiva, uma vez que extraiu os compostos com maiores tempos de

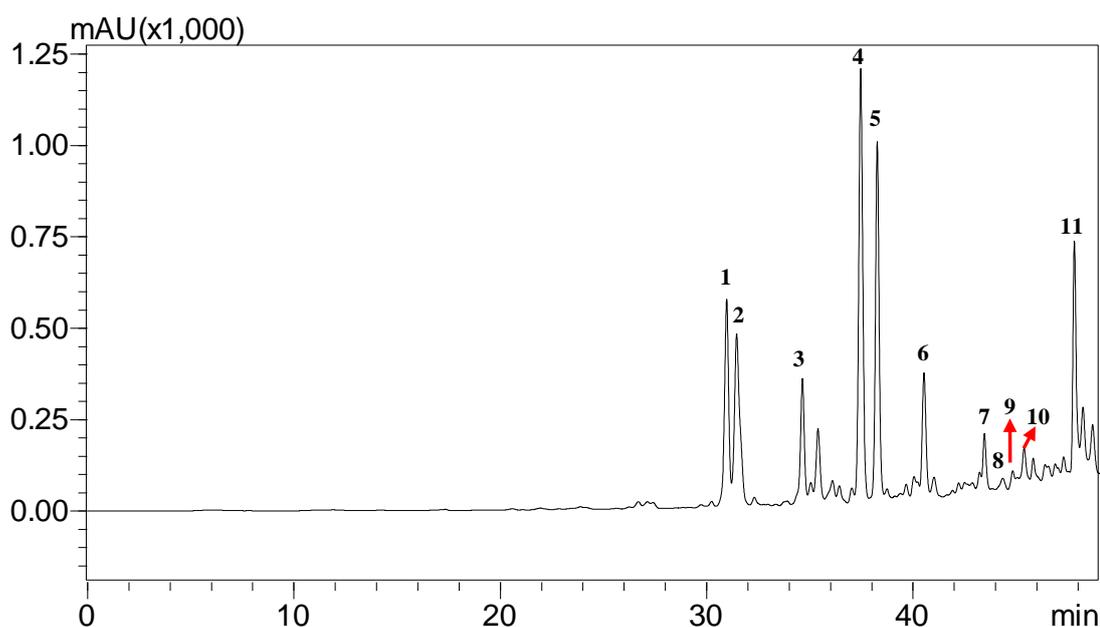
retenção, ou seja, os compostos mais lipofílicos com uma fração enriquecida com compostos mais apolares (**Figura 5**).

A análise espectral no UV-Vis da fração clorofórmica (**Figura 6**) revelou características típicas associadas à presença predominante de flavonoides metoxilados, compostos mais lipofílicos em comparação com os flavonoides hidroxilados. Esses flavonoides possuem grupos metoxi (-OCH<sub>3</sub>) ligados ao núcleo aromático, o que altera suas propriedades espectrais devido ao efeito eletrônico desses substituintes.

O perfil espectral dessa fração apresentou a Banda I, na faixa de 300 a 380 nm, associada ao sistema conjugado envolvendo o anel B, com um leve deslocamento para comprimentos de onda maiores em comparação com os flavonoides hidroxilados. Esse comportamento é atribuído ao efeito batocrômico promovido pelos grupos metoxi. Já a Banda II, na faixa de 240 a 280 nm, relacionada ao anel A, mostrou-se menos intensa e com menor variação em comparação à Banda I, refletindo a menor influência da substituição metoxilada nesse sistema.

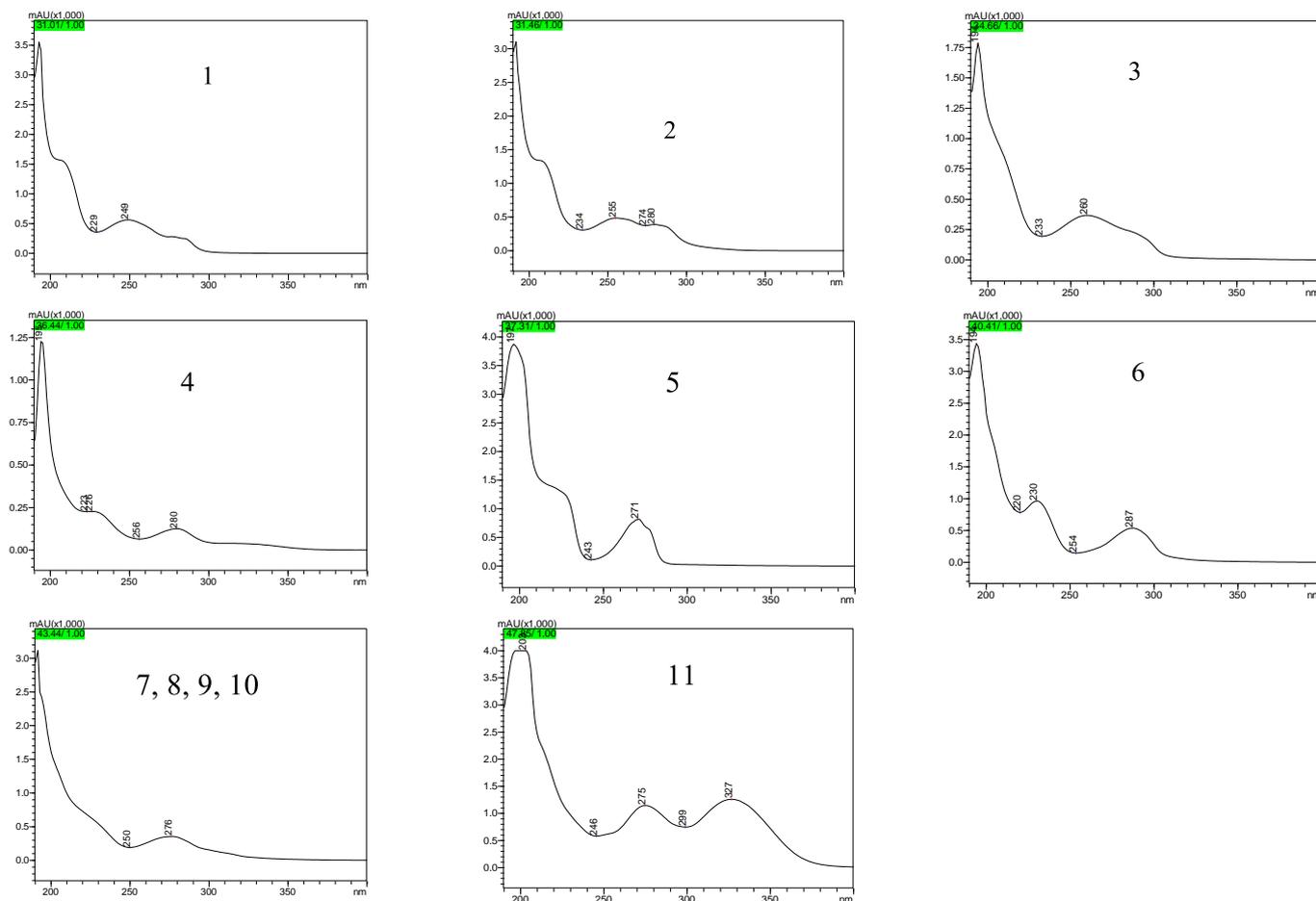
A predominância de compostos metoxilados na fração clorofórmica também está diretamente relacionada à sua maior lipofilicidade, uma vez que a substituição de hidroxilas por grupos metoxi reduz a polaridade das moléculas, favorecendo sua solubilidade em solventes orgânicos, como o clorofórmio.

Figura 5 - Cromatograma HPLC-PDA da fração clorofórmica *Scoparia dulcis*. Coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4.6 nm; 5 µm), fluxo 1 mL/min



Fonte: O autor (2025).

Figura 6 - Espectro de absorção UV-Vis dos compostos presentes na fração clorofórmica



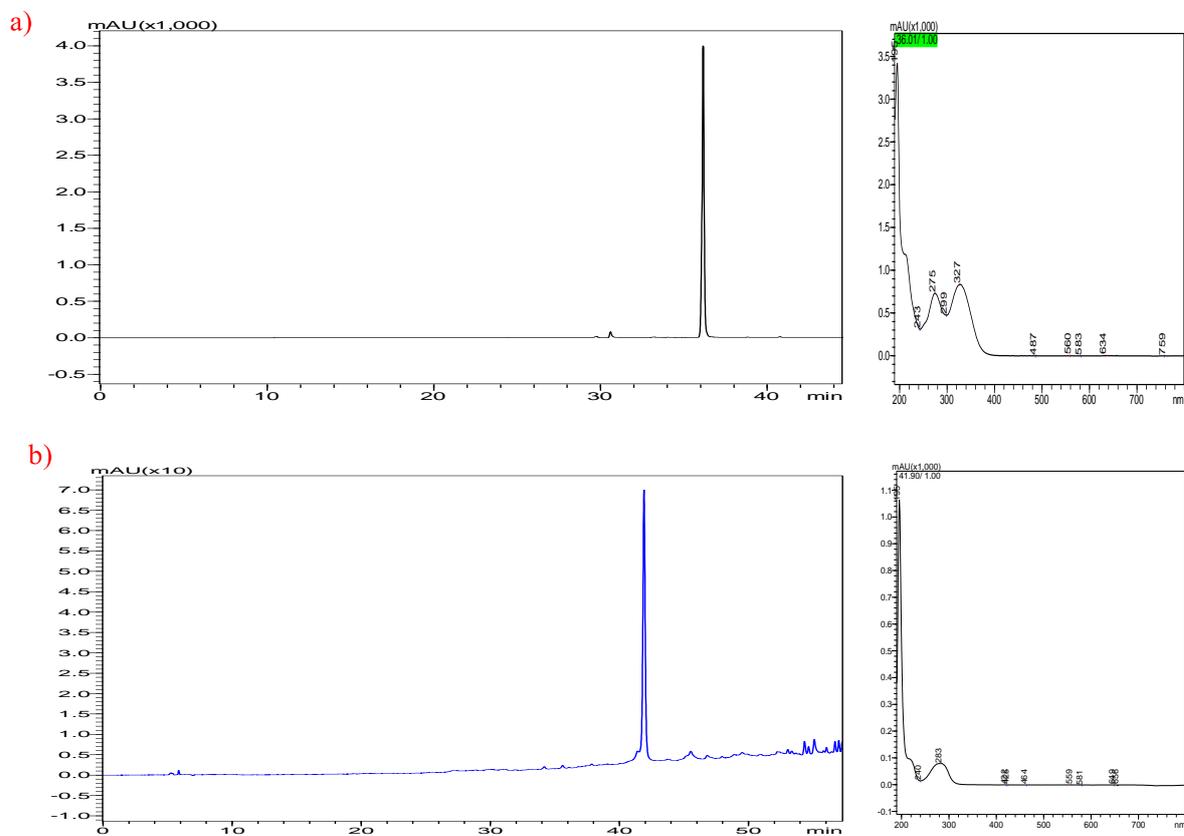
Fonte: O autor (2025).

### 5.1.2 Análise dos compostos isolados por HPLC-PDA (VAMF-1 e VAMF-2)

Após o isolamento, o VAMF-1 foi analisado por HPLC-PDA (Figura 7a), revelando a presença de um pico único, o que indica alta pureza. O espectro UV exibiu bandas de absorção em 275 nm e 327 nm, características típicas de flavonoides, sugerindo a presença de um núcleo aromático conjugado. Essas bandas estão associadas às transições eletrônicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  nos anéis aromáticos, com a posição das bandas podendo ser influenciada por substituições eletrônicas, como grupos hidroxila ou metoxi, que modula as propriedades espectrais do composto.

O VAMF-2 (Figura 7b), apesar de ter apresentado alguns ruídos no cromatograma, uma consequência da baixa concentração do composto injetado, exibiu um espectro no UV um pouco diferente do VAMF-1, se tratando de uma outra estrutura química, com bandas de absorção de 240 e 283 nm.

Figura 7 - Espectros UV-Vis dos compostos isolados de *Scoparia dulcis*. a) VAMF-1 e seu respectivo espectro no UV. b) VAMF-2 e seu respectivo espectro no UV.



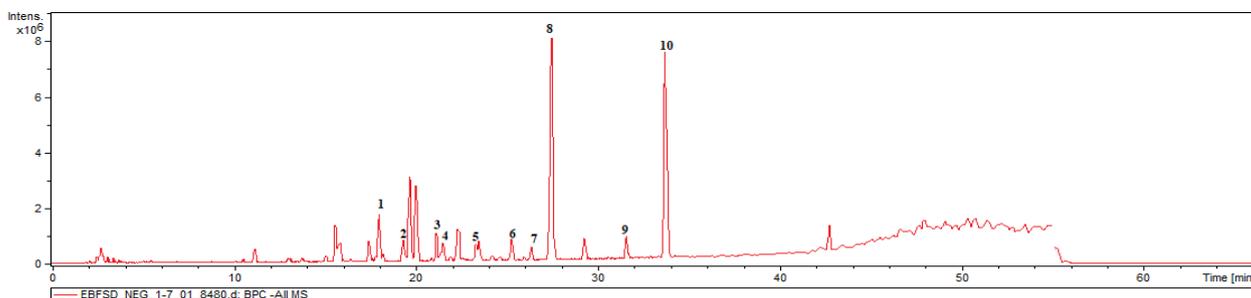
### 5.1.3 Anotação química por LC-ESI-IT/MS

Os espectros de massas dos compostos presentes no extrato foram obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um espectrômetro de massas de baixa resolução, equipado com uma fonte de ionização por eletrospray e um analisador de armadilha iônica (HPLC-ESI-IT/MS). A análise focou nos íons moleculares desprotonados  $[M-H]^-$  em todos os espectros, correspondentes aos compostos listados na Tabela 3. Foram propostos mecanismos de fragmentação com base nos íons fragmentos coletados, permitindo uma anotação detalhada dos compostos. O cromatograma do extrato bruto está representado na **Figura 8**, enquanto as estruturas dos compostos estão ilustradas na **Figura 9**.

A comparação entre os cromatogramas obtidos por LC-MS e HPLC-PDA revelou um menor número de picos no cromatograma de LC-MS. Essa diferença pode ser atribuída à limitada capacidade de ionização de determinados compostos no espectrômetro de massas, especialmente aqueles com baixa polaridade ou tendência reduzida a ganhar ou perder prótons. Além disso, compostos com concentração abaixo do limite de detecção do LC-MS podem não ser registrados, ainda que sejam claramente detectáveis no PDA devido à sua absorção UV-Vis.

Fatores adicionais, como a fragmentação completa de alguns compostos durante a ionização e a maior seletividade do detector de massas em relação ao PDA, também contribuem para essas discrepâncias. Esse comportamento reforça a importância de utilizar técnicas complementares para a caracterização química de extratos complexos, garantindo uma identificação mais abrangente dos compostos presentes.

Figura 8 - Cromatograma do extrato bruto de *Scoparia dulcis* analisado por LC-ESI-IT/MS



Fonte: O autor (2025).

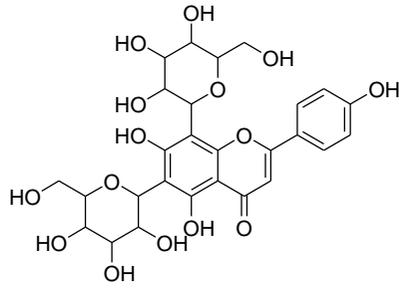
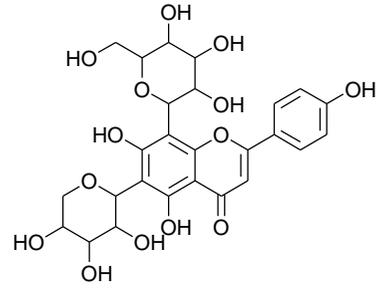
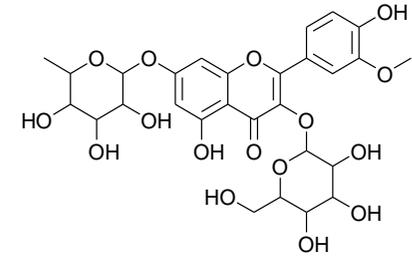
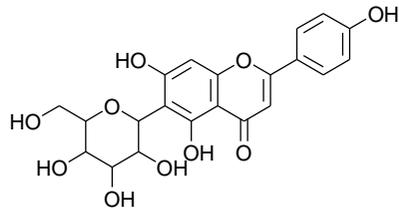
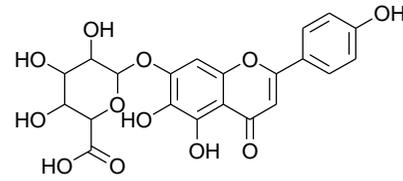
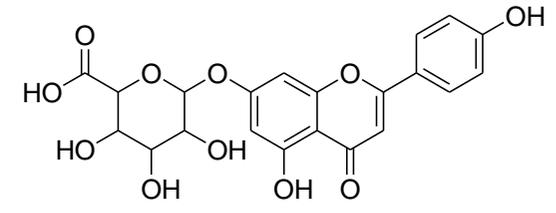
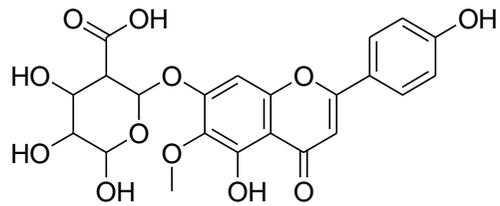
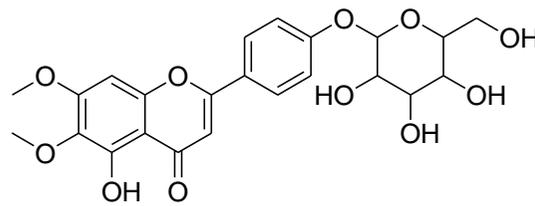
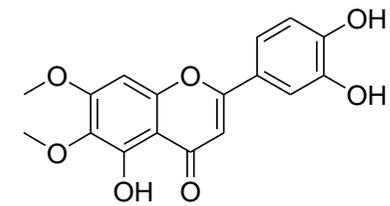
Tabela 4 - Compostos anotados no extrato hidroetanólico de *Scoparia dulcis*

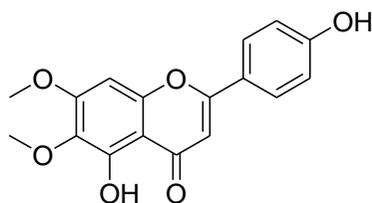
Picos	TR (min)	Compostos	Modo (-)	Fragmentos (m/z)	Referências
1	18,1	Vicenina-2	MS <sup>2</sup>	593,29 [M-H] <sup>-</sup> ; 575,20 (7,55); 503,13 (25,78); 473,22 (93,13); 383,20 (42,88); <b>353,20</b> (100)	(JANDRI et al., 2017); (DUAN et al., 2022); (JEONG et al., 2017)
			MS <sup>3</sup>	593 [M-H] <sup>-</sup> ; 473,22 (13,36); 353,25 (98,98); <b>325,20</b> (100); 297,15 (51,62)	
2	19,4	Apigenina-6-C-pentosil-8-C-hexosídeo	MS <sup>2</sup>	563,30 [M-H] <sup>-</sup> ; 545,17 (21,53); 503,13 (44,15); 473,20 (59,39); 443,13 (43,77); 383,23 (66,40); <b>353,25</b> (100)	(GOUVEIA; CASTILHO, 2013); (OZAROWSKI et al., 2018)
			MS <sup>3</sup>	563 [M-H] <sup>-</sup> ; 473,20 (6,45); 353,25 (95,87); <b>325,20</b> (100); 297,13 (58,56)	
3	21,2	Isorhamnetina-3-O-hexosil-7-O-pentosídeo	MS <sup>2</sup>	623,35 [M-H] <sup>-</sup> ; <b>461,26</b> (100); 315,19 (4,25)	(YAO et al., 2012)
			MS <sup>3</sup>	623 [M-H] <sup>-</sup> ; <b>315,19</b> (100); 160,85 (8,18); 135,04 (54,83)	
4	21,5	Isovitexina	MS <sup>2</sup>	431,25 [M-H] <sup>-</sup> ; 341,25 (7,41); <b>311,12</b> (100)	(PISLAK et al., 2015)
			MS <sup>3</sup>	431 [M-H] <sup>-</sup> ; 311 (18,14); <b>283,10</b> (100); 119,06 (4)	
5	23,4	Escutelarina	MS <sup>2</sup>	461 [M-H] <sup>-</sup> ; <b>285</b> (100); 175 (5);	(ELE et al. 2016)
			MS <sup>3</sup>	461 [M-H] <sup>-</sup> ; <b>285</b> (100); 267 (27,76) 239 (4,34); 159 (14,57)	
6	25,3	Apigenina-7-O-glucuronídeo	MS <sup>2</sup>	445 [M-H] <sup>-</sup> ; 309 (6,71); <b>269</b> (100); 175 (11,35)	(AGHAKHANI; KHARZIAN e GOOINI, 2018)
			MS <sup>3</sup>	445 [M-H] <sup>-</sup> ; <b>269</b> (100)	

Picos	TR (min)	Compostos	Modo (-)	Fragmentos ( <i>m/z</i> )	Referências
7	26,4	Hispidulina-7- <i>O</i> - glucuronídeo	MS <sup>2</sup>	475 [M-H] <sup>-</sup> ; 299 (100); 175 (11,44)	(ELE et al. 2016)
			MS <sup>3</sup>	475 [M-H] <sup>-</sup> ; 299 (2,21); <b>284</b> (100)	
8	27,5	Cirsimarina	MS <sup>2</sup>	511 [M-H-2H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ; 313 (100); 298 (21,54)	(SREEJA et al 2018)
			MS <sup>3</sup>	475 [M-H] <sup>-</sup> ; 313; 298 (22,31); 283 (100); 269 (13,34)	
9	31,6	Cirsiliol	MS <sup>2</sup>	329 [M-H] <sup>-</sup> ; 329 (100); 314 (23,12)	(YABOUB et al 2018)
			MS <sup>3</sup>	329 [M-H] <sup>-</sup> ; <b>314</b> (100); 299 (93); 285 (23,29)	
10	33,7	Cirsimaritina	MS <sup>2</sup>	<b>313</b> [M-H] <sup>-</sup> ; 298	NI
			MS <sup>3</sup>		

Fonte: O autor (2025).

Legenda: NI – não identificado

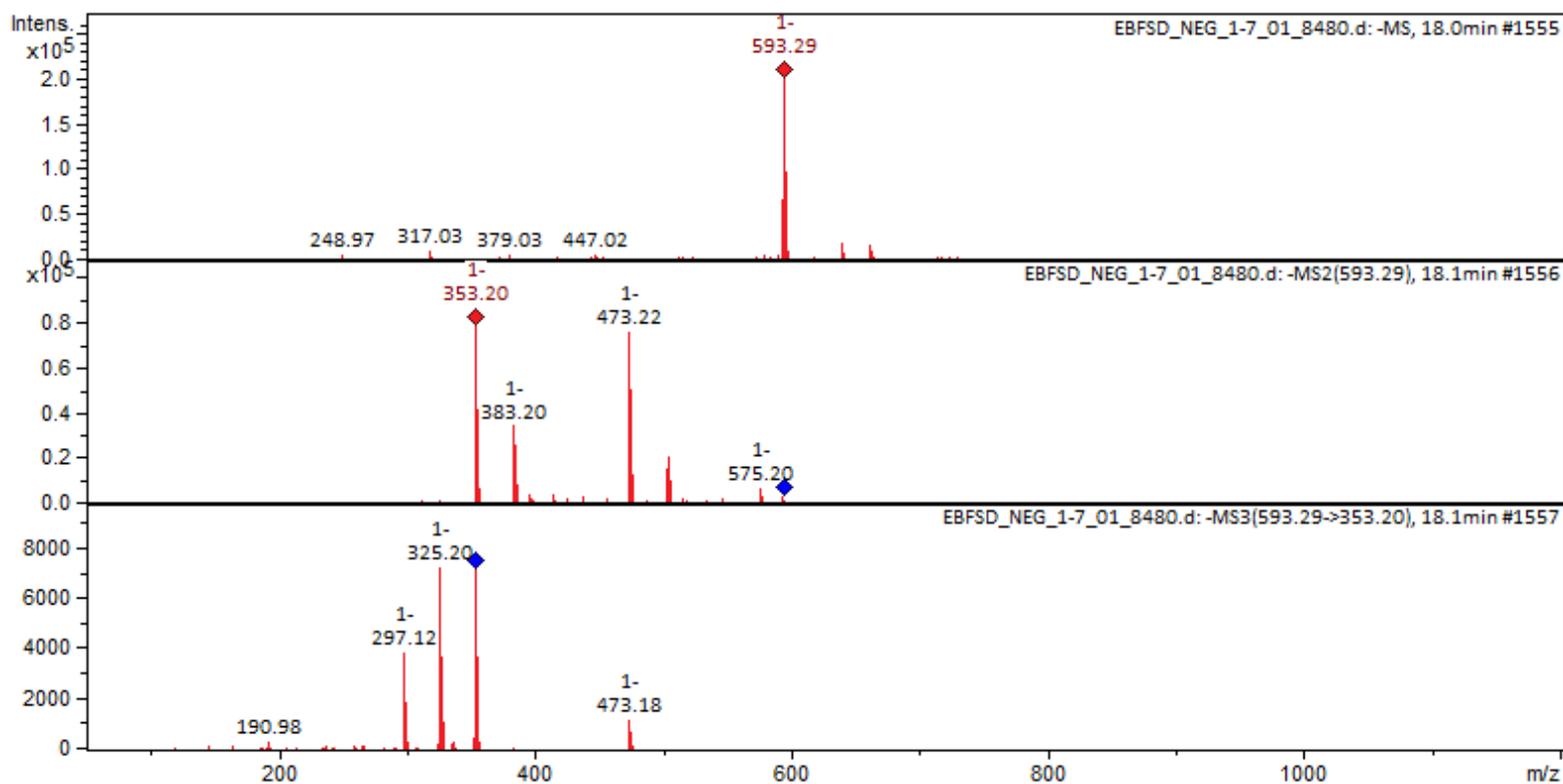
Figura 9 - Compostos anotados no extrato hidroetanólico de *Scoparia dulcis***1****2****3****4****5****6****7****8****9**

**10**

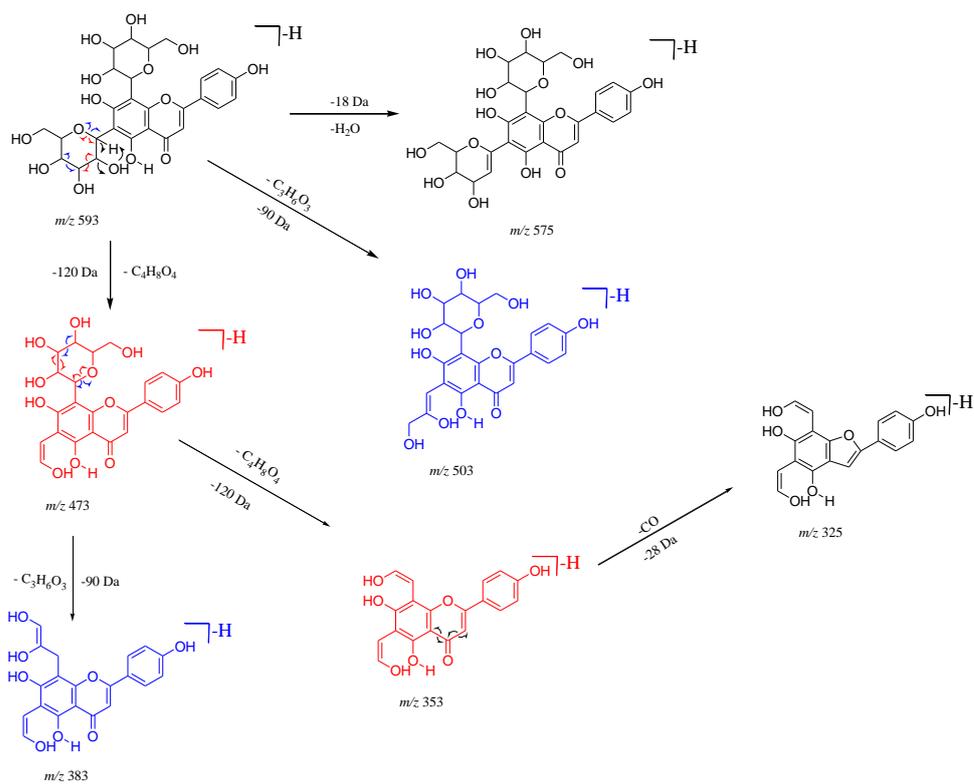
Fonte: O autor (2025)

Nos dados de espectrometria de massa de baixa resolução, o composto 1 (Vicenina-2) apresentou um íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$  com  $m/z$  593,29 anotado como vicenina-2 (**Figura 10**). Como mostrado no **Esquema 2**, no segundo estágio de fragmentação ( $MS^2$ ), o íon molecular passou por uma desidratação  $[M-H-H_2O]^-$  na unidade de açúcar localizada na posição C6 do anel A, registrando um íon molecular  $m/z$  575. Os íons  $m/z$  503,13 e 473,22 correspondem a perdas de 90 e 120 Da, respectivamente, na unidade C-glicosídica em C6. Essas perdas são típicas em estruturas contendo hexoses ligadas à aglicona por ligações C – C, na qual a clivagem do açúcar é parcial, preservando parte da estrutura glicosídica. Entretanto, essas perdas (90 e 120 Da) também ocorrem na posição C8 da unidade de hexose, registrando íons  $m/z$  383,21 e 353,20 (pico de maior abundância).

Figura 10 - Espectros de massas obtidos para o Vicenina-2



Esquema 2 - Proposta de fragmentação do Vicenin-2

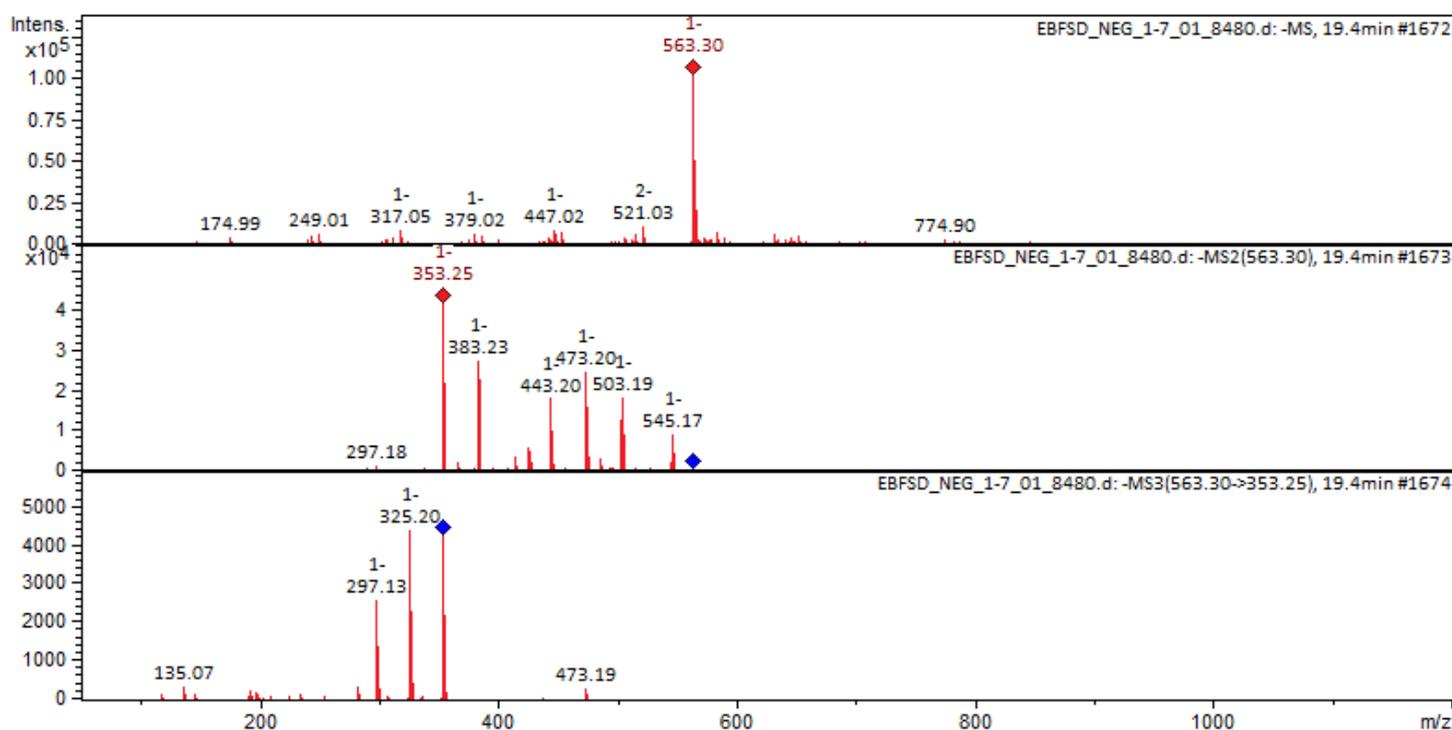


Fonte: O autor (2025).

O composto 2 apresentou um espectro de massa caracterizado por um íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$  com  $m/z$  563,20 (**Figura 11**), indicativo de apigenina-6-*C*-pentosil-8-*C*-hexosídeo. A primeira fragmentação significativa observada foi a perda de uma molécula de água  $[M-H-H_2O]^-$ , resultante da desidratação da pentose ligada à posição C6 do anel A, formando um íon com  $m/z$  545,17 (**Esquema 3**). Este processo de desidratação é comum em açúcares e sugere a presença de um grupo de hidroxila livre na pentose.

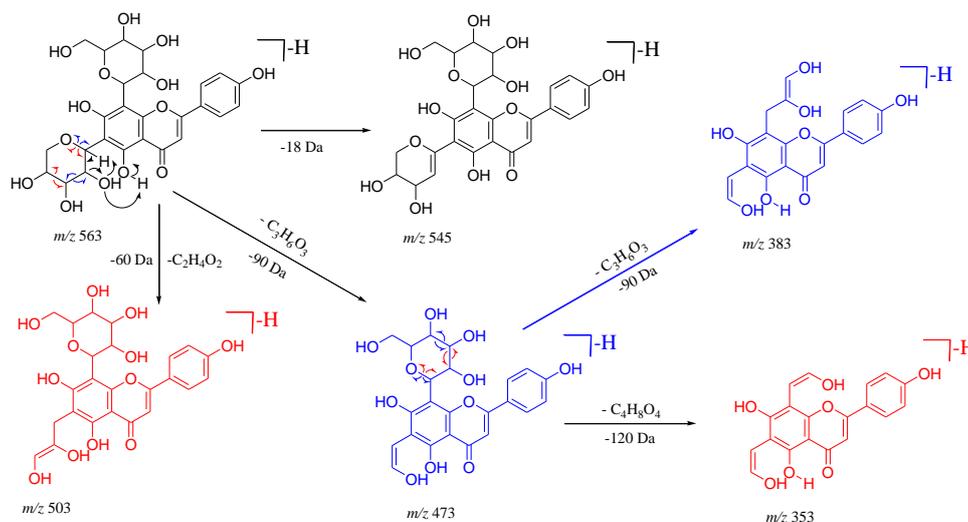
Posteriormente, foram observadas perdas de 60 e 90 Da, correspondendo aos fragmentos  $[M-H-60]^-$ ,  $[M-H-90]^-$  que resultaram de clivagens homolíticas nas ligações nas ligações  $^{0,3}X_6$  e  $^{0,2}X_6$  da pentose, gerando íons moleculares em  $m/z$  503 e 473, respectivamente. A partir do fragmento com  $m/z$  473,22, foram registradas perdas adicionais de 90 e 120 Da, formando os fragmentos  $[M-H-90]^-$  e  $[M-H-120]^-$ , que também resultaram de clivagens homolíticas nas ligações  $^{0,3}X_8$  e  $^{0,2}X_8$  da hexose, registrando os íons moleculares  $m/z$  383 e 353 (pico base), respectivamente. Estes resultados confirmam a presença de unidades de pentose e hexose nas posições C6 e C8, e fornecem evidências da ligação C-glicosídica entre o açúcar e o núcleo flavonoide.

Figura 11 - Espectros de massas obtidos para o Apigenina-6-*C*-pentosil-8-*C*-hexosídeo



Fonte: O autor (2025).

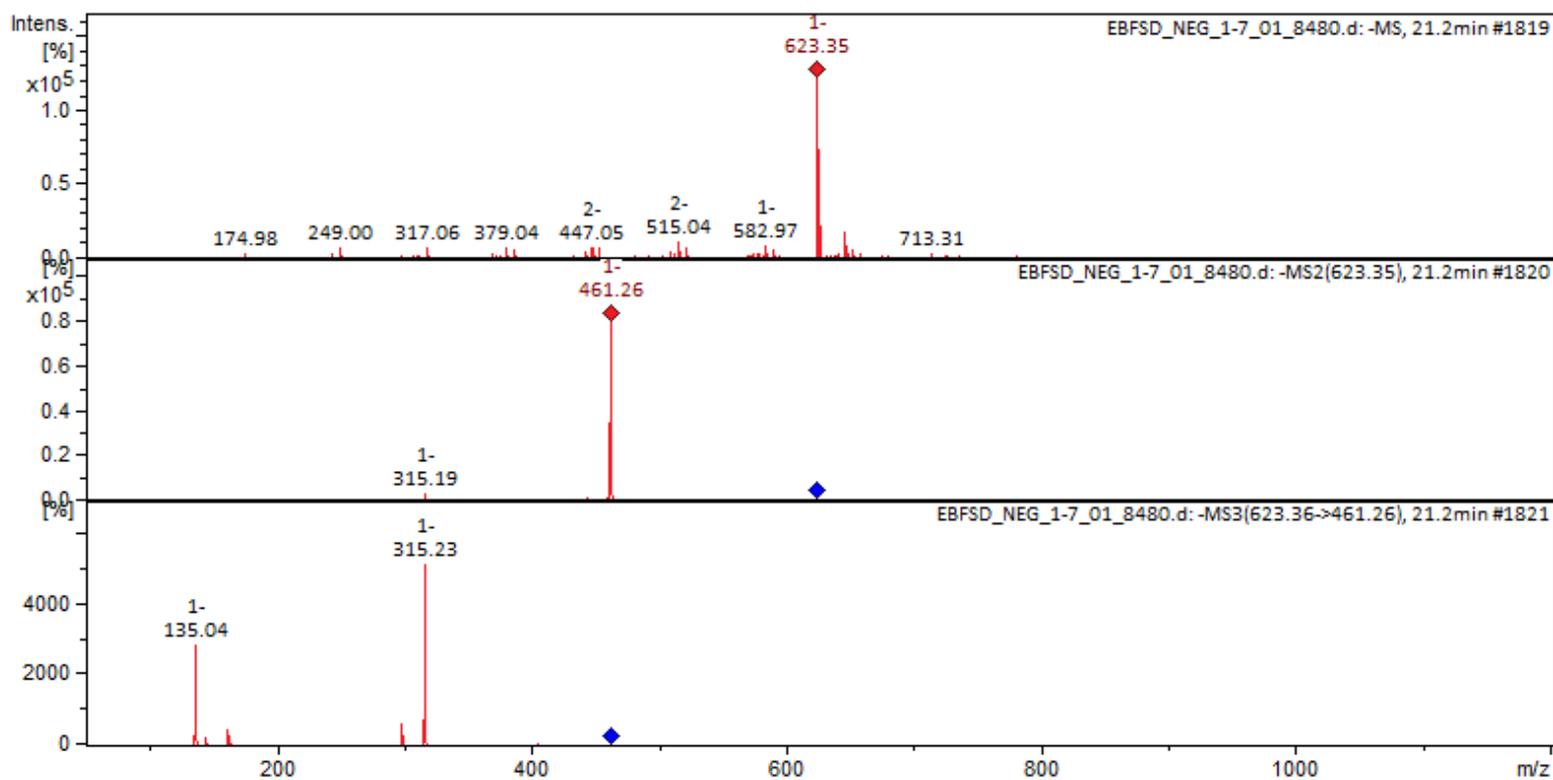
Esquema 3 - Proposta de fragmentação da Apigenina-6-C-pentosil-8-C-hexosideo



Fonte: O autor (2025).

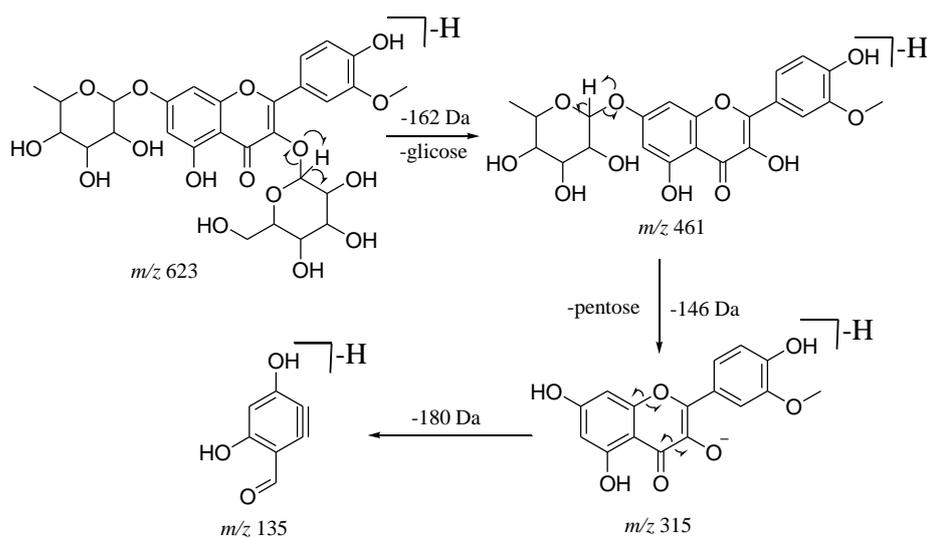
O composto 3 foi proposto como isorhamnetina-3-*O*-hexosil-7-*O*-pentosídeo, uma vez que gerou um pico do íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$  com  $m/z$  623 (**Figura 12**). A primeira fragmentação observada foi uma perda de 162 Da, referente a uma ligação *O*-glicosídica na posição C3 da aglicona, registrando um íon molecular  $m/z$  461,26, que representou o pico de maior estabilidade (**Esquema 4**). A segunda fragmentação registrada, foi de uma perda de 146 Da, correspondente à ramnose ligada na posição C7, resultando em íon molecular  $m/z$  315,23. A partir do íon  $m/z$  315, houveram clivagens homolíticas nas ligações 0,3X, resultando na perda de 180 Da, e na formação de um íon com  $m/z$  135,04.

Figura 12 - Espectros de massas obtidos para o Isorhamnetina-3-O-hexosil-7-O-pentosídeo



Fonte: O autor (2025).

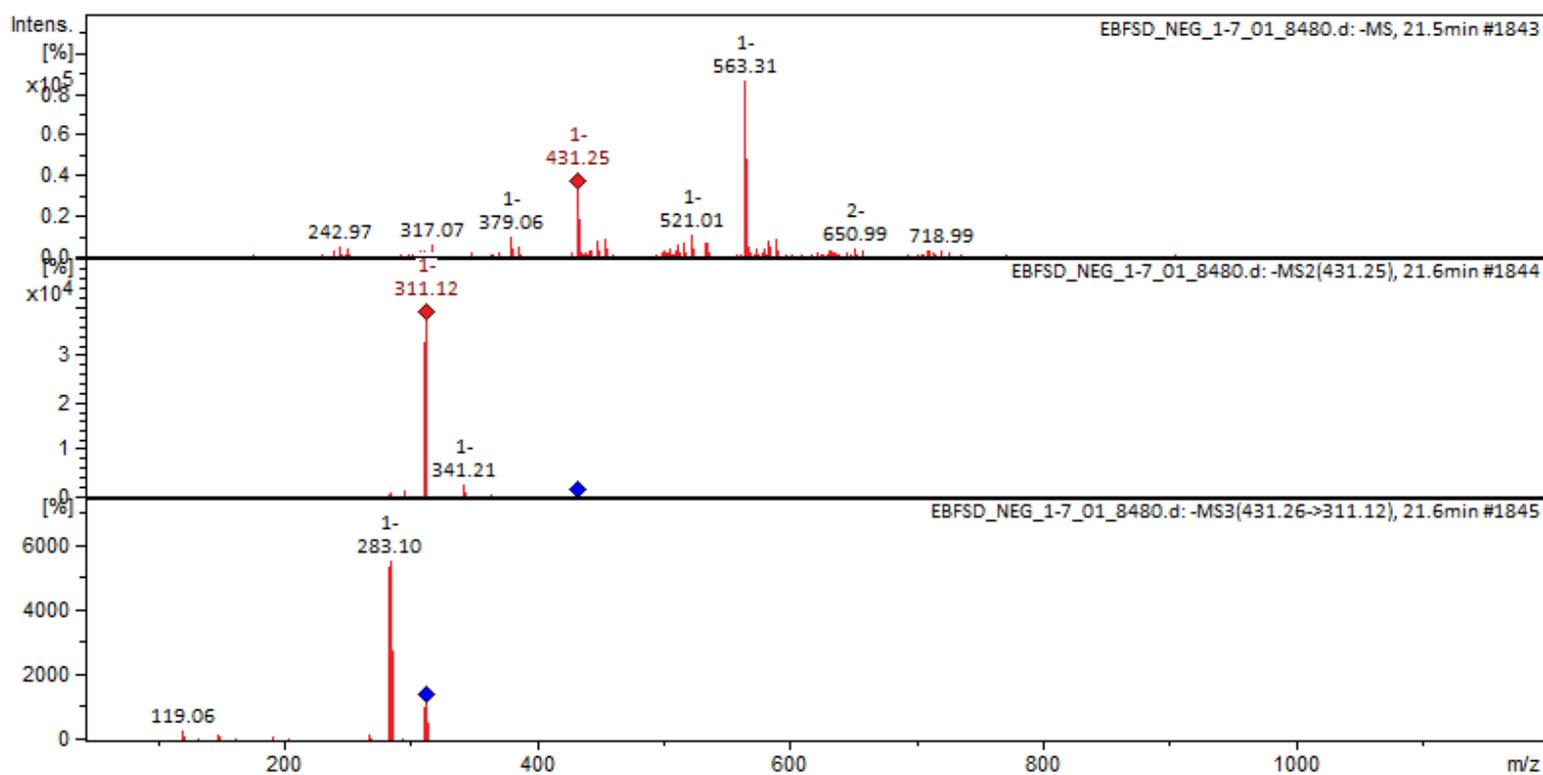
Esquema 4 - Proposta de fragmentação da Isorhamnetina-3-O-hexosil-7-O-pentosídeo



Fonte: O autor (2025).

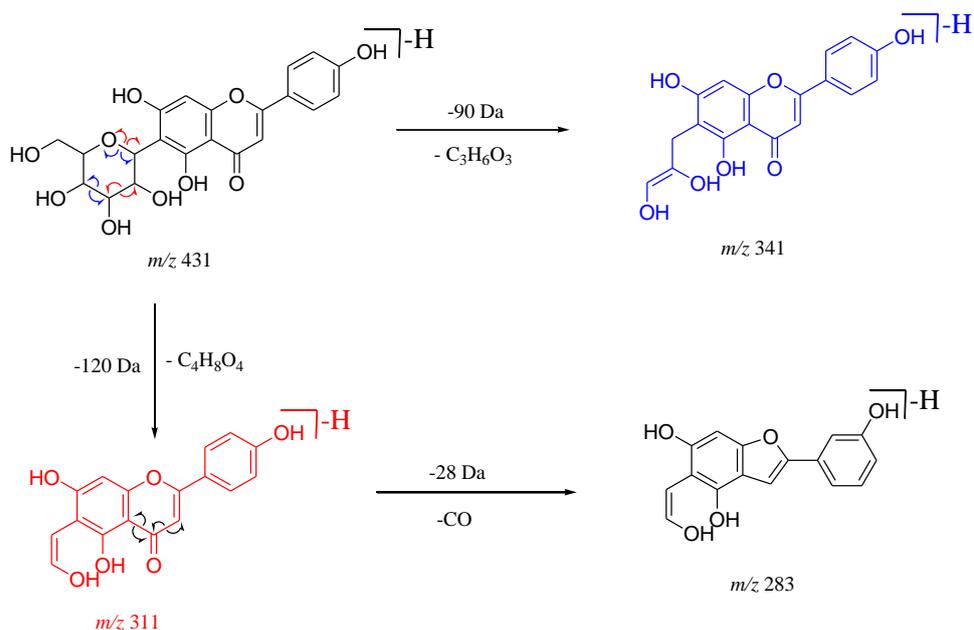
O pico 4, anotado como isovitexina, corresponde a um íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$   $m/z$  431,25 (**Figura 13**). Foi observado a presença de um resíduo de açúcar ligado a aglicona, além de perdas de 90 e 120 Da  $[M-H-90]^-$ ,  $[M-H-120]^-$ , característico de ligações C-glicosídicas, registrando íons  $m/z$  341 e 311 (pico base), respectivamente (**Esquema 5**). A partir do pico base foi detectado uma perda de 28 Da, referente a carbonila localizada no anel C da aglicona, e um íon  $m/z$  283.

Figura 13 - Espectros de massas obtidos para a Isovitexina



Fonte: O autor (2025).

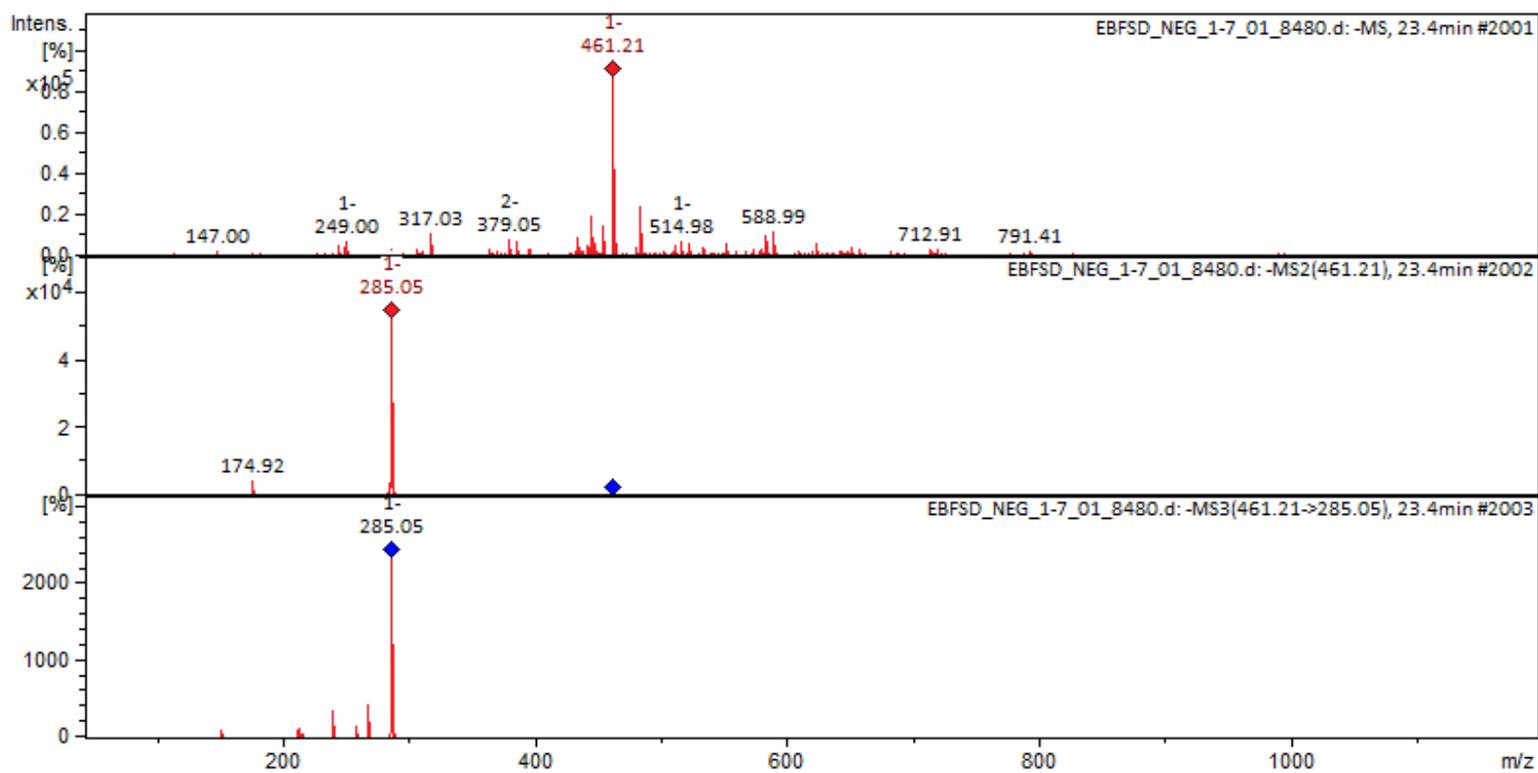
Esquema 5 - Proposta de fragmentação para a Isovitexina



Fonte: O autor (2025).

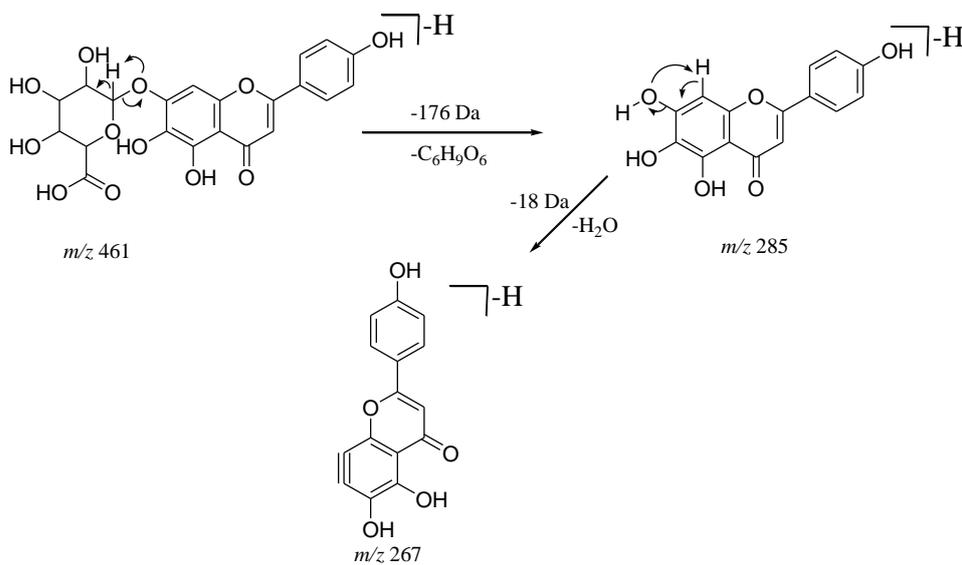
O pico 5, foi proposto como escutelarina, baseado na detecção de um íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$  com  $m/z$  461,21 (**Figura 14**). No espectro  $MS^2$ , registrou um fragmento com  $m/z$  285, identificado como o íon de maior estabilidade, resultado de uma perda de 176 Da (**Esquema 6**). Esta perda é atribuída à eliminação de um ácido fenólico ligado à posição C7 da aglicona por meio de uma ligação *O*-glicosídica. A partir do íon de maior abundância ( $m/z$  285), foi observada uma desidratação no anel A da aglicona, levando à formação de um íon com  $m/z$  267.

Figura 14 - Espectros de massas obtidos para a Escutelarina



Fonte: O autor (2025).

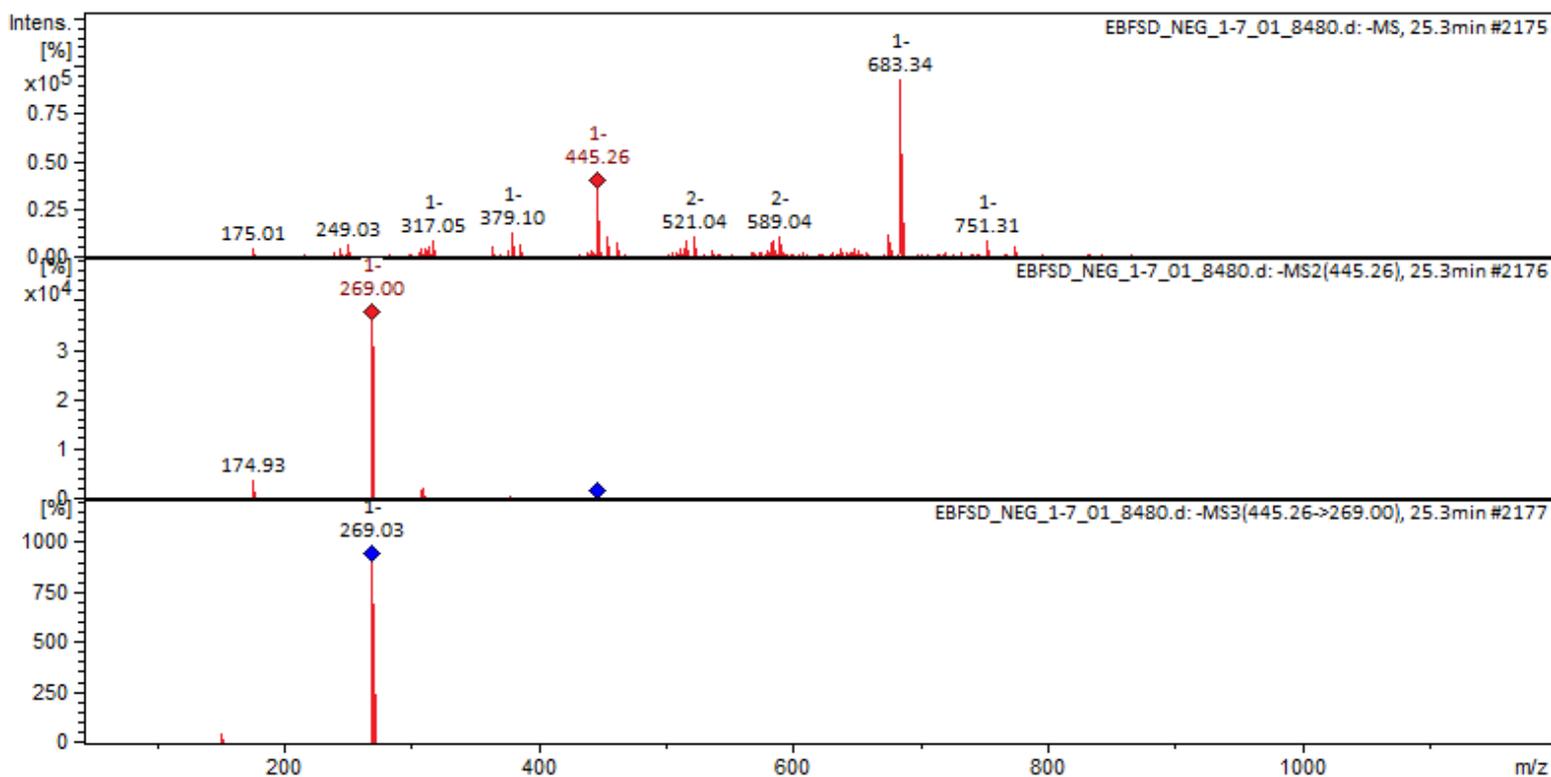
Esquema 6 - Proposta de fragmentação para a Escutelarina



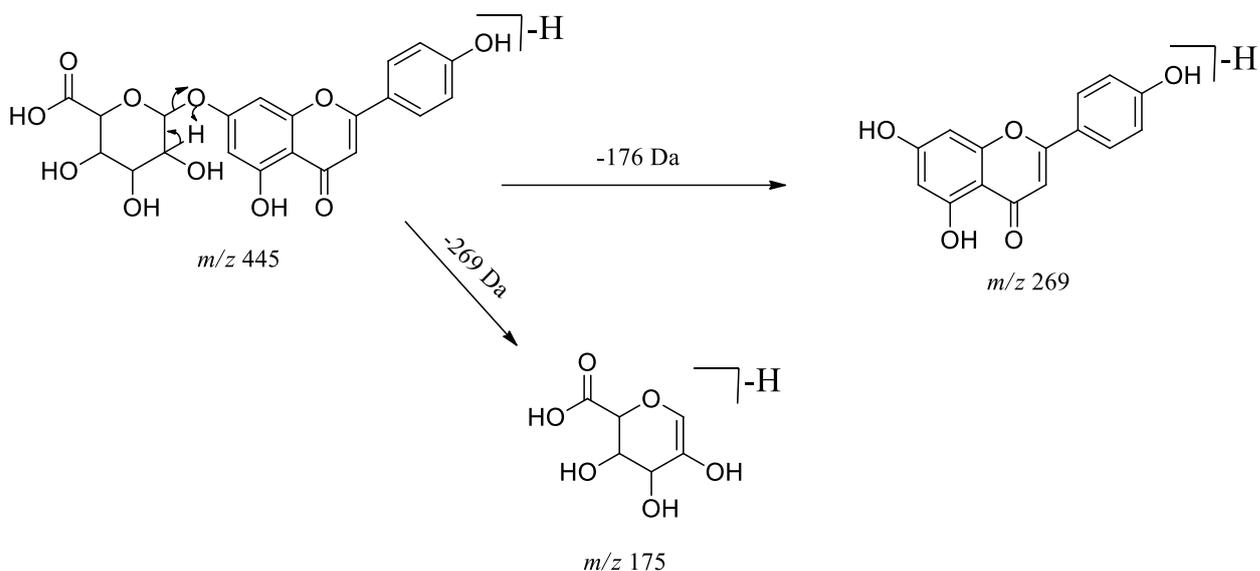
Fonte: O autor (2025).

O pico 6, revelou um pico do íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$   $m/z$  445 e proposto como apigenina-7-*O*-glucuronídeo (**Figura 15**). A perda de uma unidade de ácido glucurônico foi identificada, resultando em  $[M-H-176]^-$  e no registro do íon molecular  $m/z$  269, no qual é o pico de maior abundância relativa (**Esquema 7**). Uma outra possibilidade de fragmentação foi, a perda da aglicona  $[M-H-269]^-$  e o registro do ácido glucurônico com  $m/z$  175.

Figura 15 - Espectros de massas obtidos para a Apigenina-7-*O*-glucuronídeo

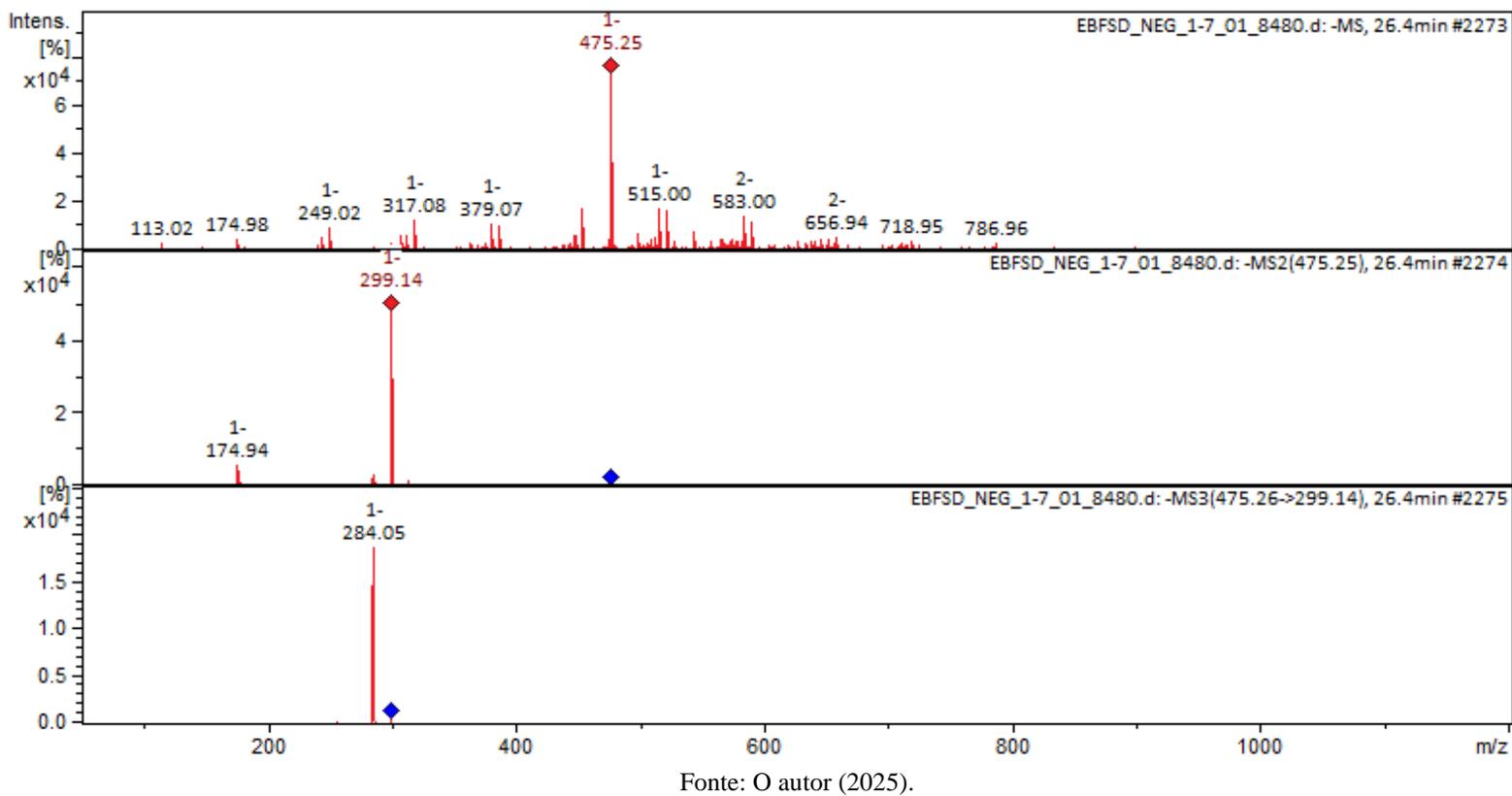
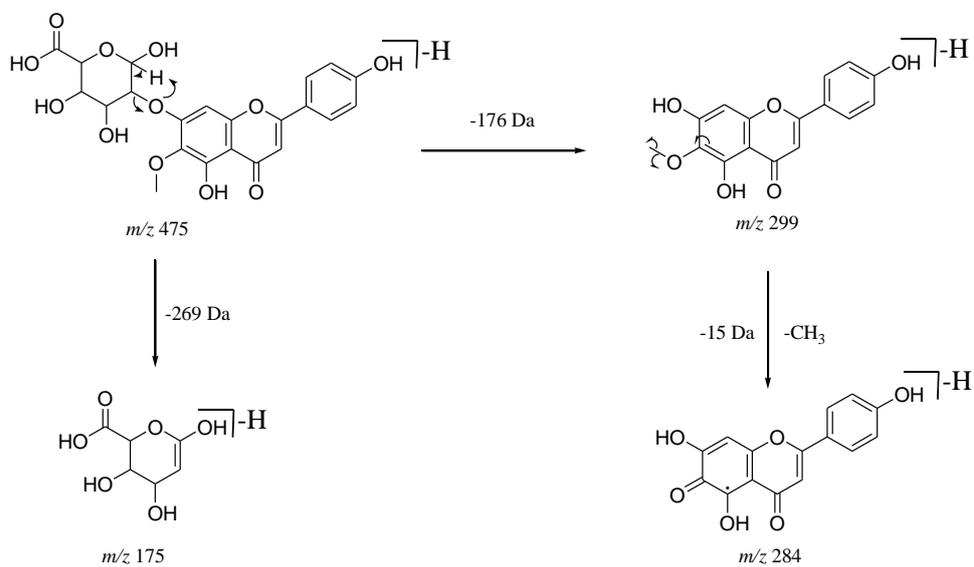


Fonte: O autor (2025).

Esquema 7 - Proposta de fragmentação para a Apigenina-7-*O*-glucuronídeo

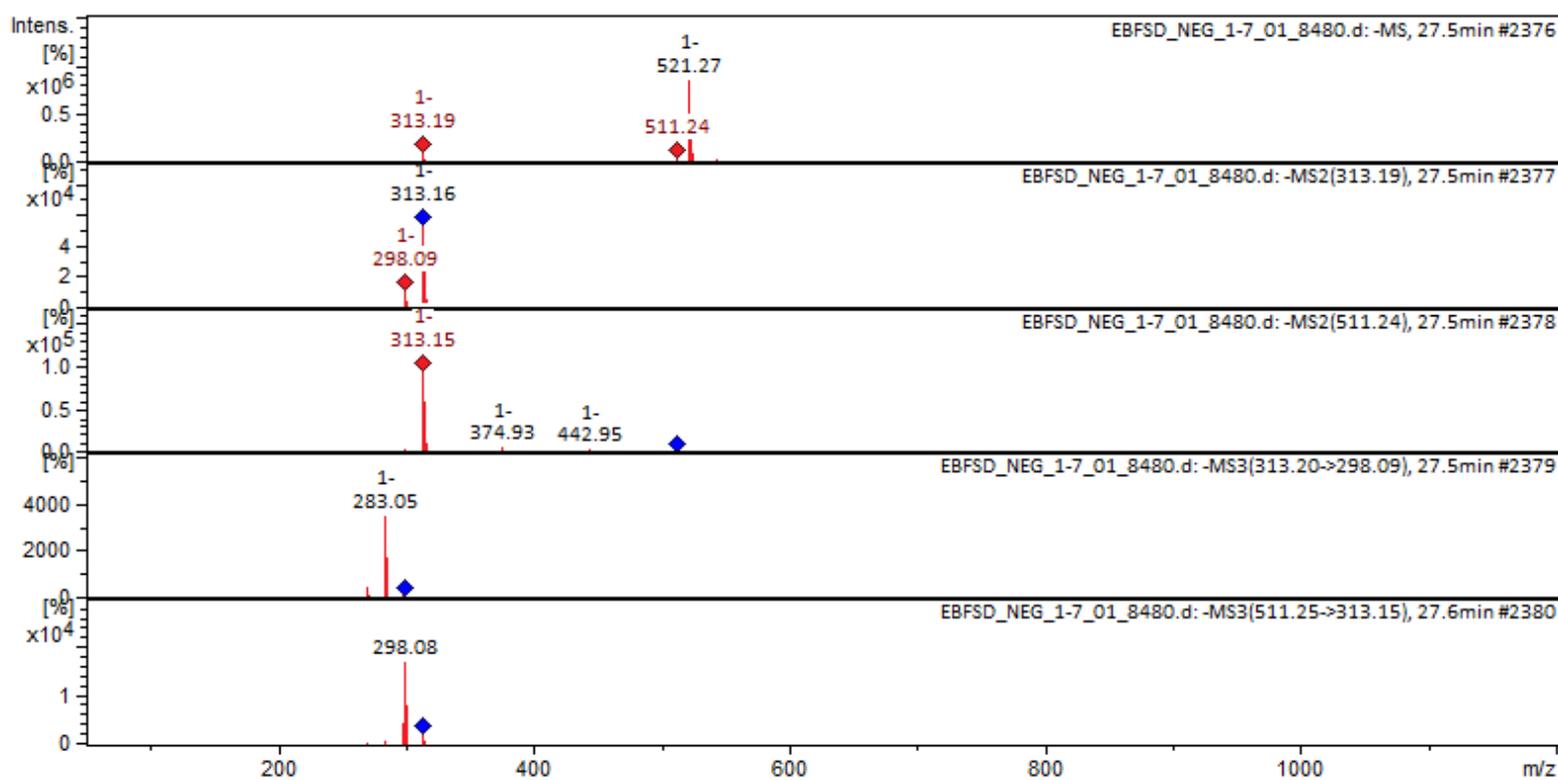
Fonte: O autor (2025).

A molécula 7, foi proposta como hispidulina-7-*O*-glucuronídeo, identificada por um íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$  com  $m/z$  475 (**Figura 16**). No espectro  $MS^2$ , foi observado uma perda de 175 Da, correspondente ao ácido glucurônico, resultando na formação de um íon com  $m/z$  299, que corresponde à aglicona hispidulina, uma flavona pertencente à classe dos flavonoides (**Esquema 8**). Este íon de  $m/z$  299 foi identificado como o pico base, evidenciando a estabilidade da aglicona. Além disso, foi registrada a perda completa da aglicona, gerando um íon com  $m/z$  175, que corresponde ao ácido glucurônico. No  $MS^3$ , houve uma perda adicional de 15 Da, provavelmente associada à eliminação de um grupo metila ( $CH_3$ ), resultando em um íon com  $m/z$  284, que se tornou a nova base de pico.

Figura 16 - Espectros de massas obtidos para a Hispidulina-7-*O*-glucuronídeoEsquema 8 - Proposta de fragmentação para a Hispidulina-7-*O*-glucuronídeo

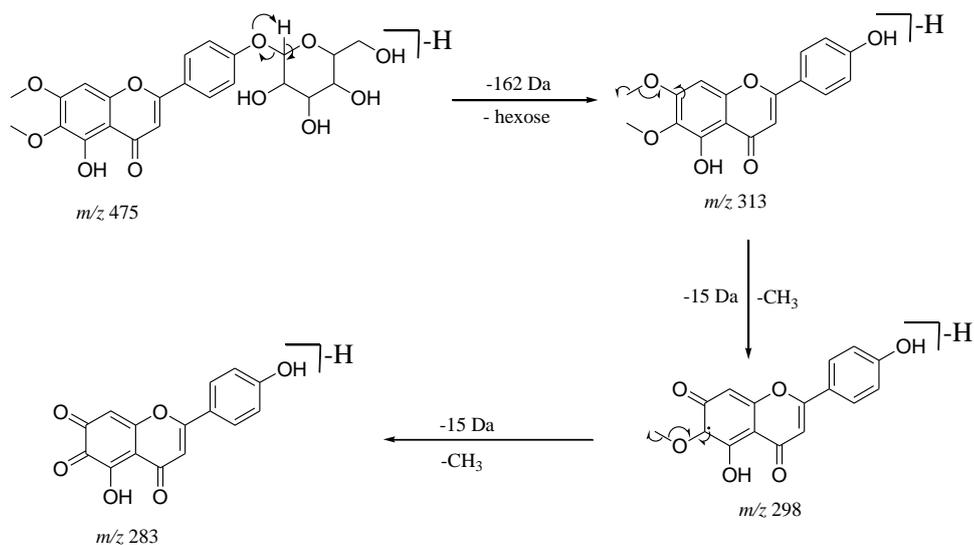
A estrutura 8, foi preliminarmente identificada como cirsimarina, apresentando um pico de íon molecular desprotonado com  $m/z$  511 (Figura 17), possuindo adutos de água na sua composição. A primeira fragmentação envolveu a perda de resíduos de açúcar, localizada na posição C4' do anel B da aglicona, com a eliminação de duas moléculas de água ( $[M-H-2H_2O]^-$ ), resultando na formação de um íon com  $m/z$  313, que se destaca como o íon de maior estabilidade (Esquema 9). Posteriormente, ocorreram desmetilações na aglicona, especificamente nas posições C6 e C7, gerando íons com  $m/z$  299 e 284, respectivamente.

Figura 17 - Espectros de massas obtidos para a Cirsimarina



Fonte: O autor (2025).

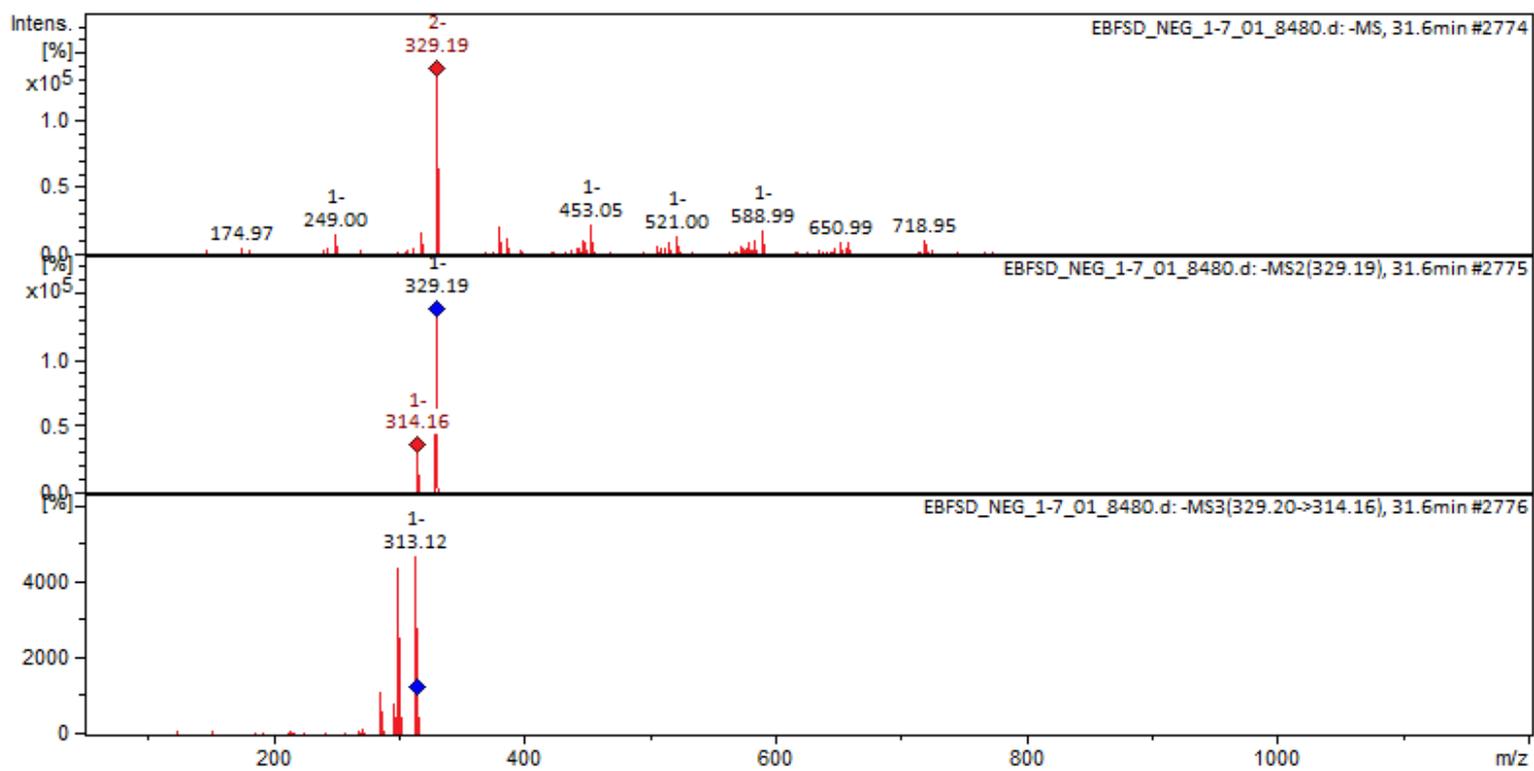
Esquema 9 - Proposta de fragmentação para o Cirsimarina



Fonte: O autor (2025).

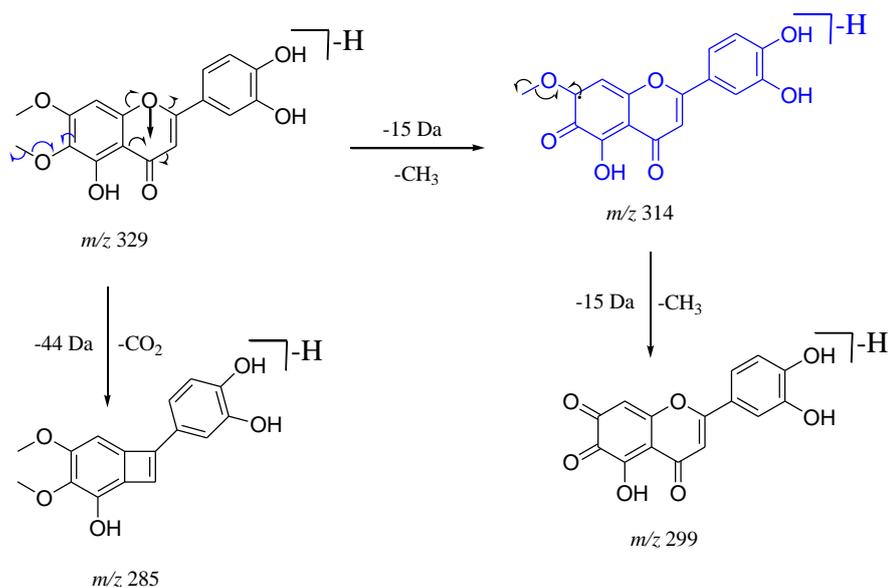
O composto 9, foi anotado como cirsiliol, exibindo um pico de íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$  com  $m/z$  329 (**Figura 18**), que também corresponde ao pico de maior estabilidade. Durante a análise das fragmentações, foram observadas perdas sucessivas de 15 Da, correspondendo à eliminação de grupos metila nas posições C6 e C7 do anel A da aglicona, resultando na formação de íons com  $m/z$  314 e 299, respectivamente (**Esquema 10**). Além disso, o íon com  $m/z$  285 foi gerado, diminuindo uma perda neutra de 44 Da, associada à eliminação de  $CO_2$   $[M-H-44]^-$ . Essa perda sugere clivagens homolíticas simultâneas nas ligações 0,1,3 e 4 do anel C, com o ataque do oxigênio do heteroátomo à carbonila.

Figura 18 - Espectros de massas obtidos para o Cirsiliol



Fonte: O autor (2025).

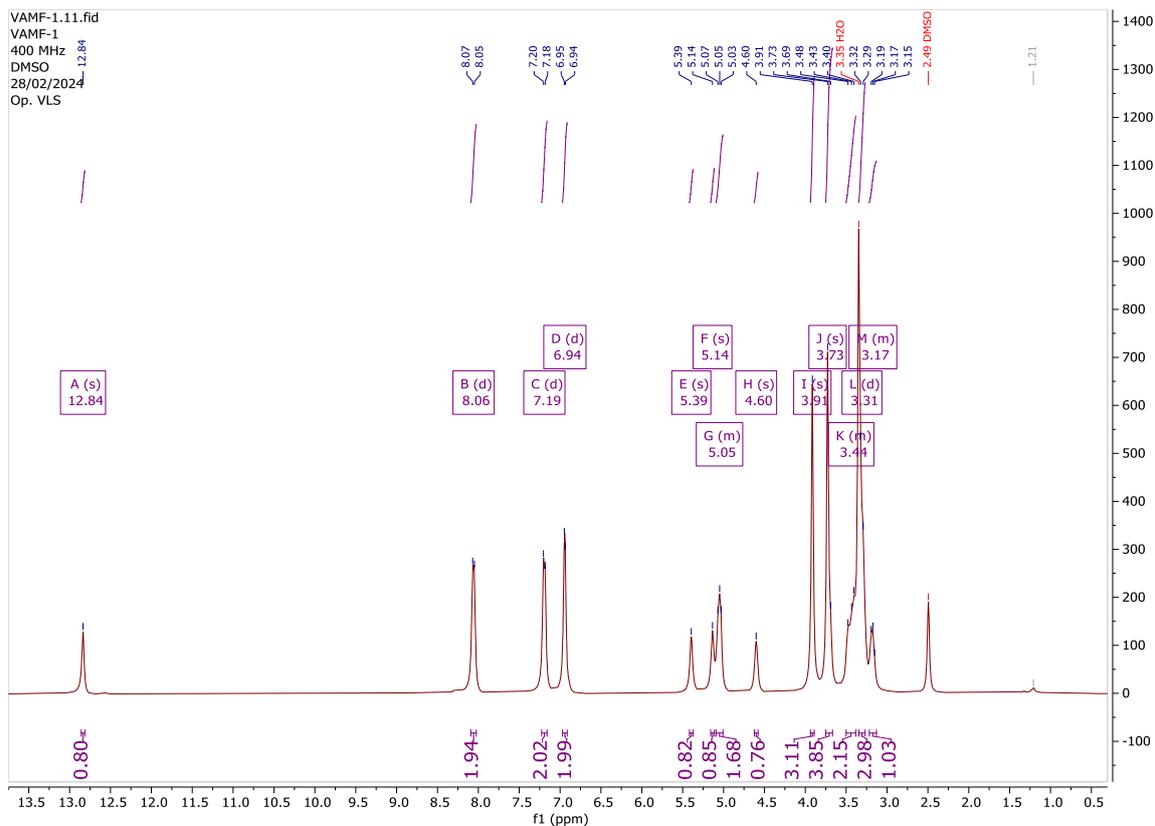
Esquema 10 - Proposta de fragmentação para o Cirsiliol



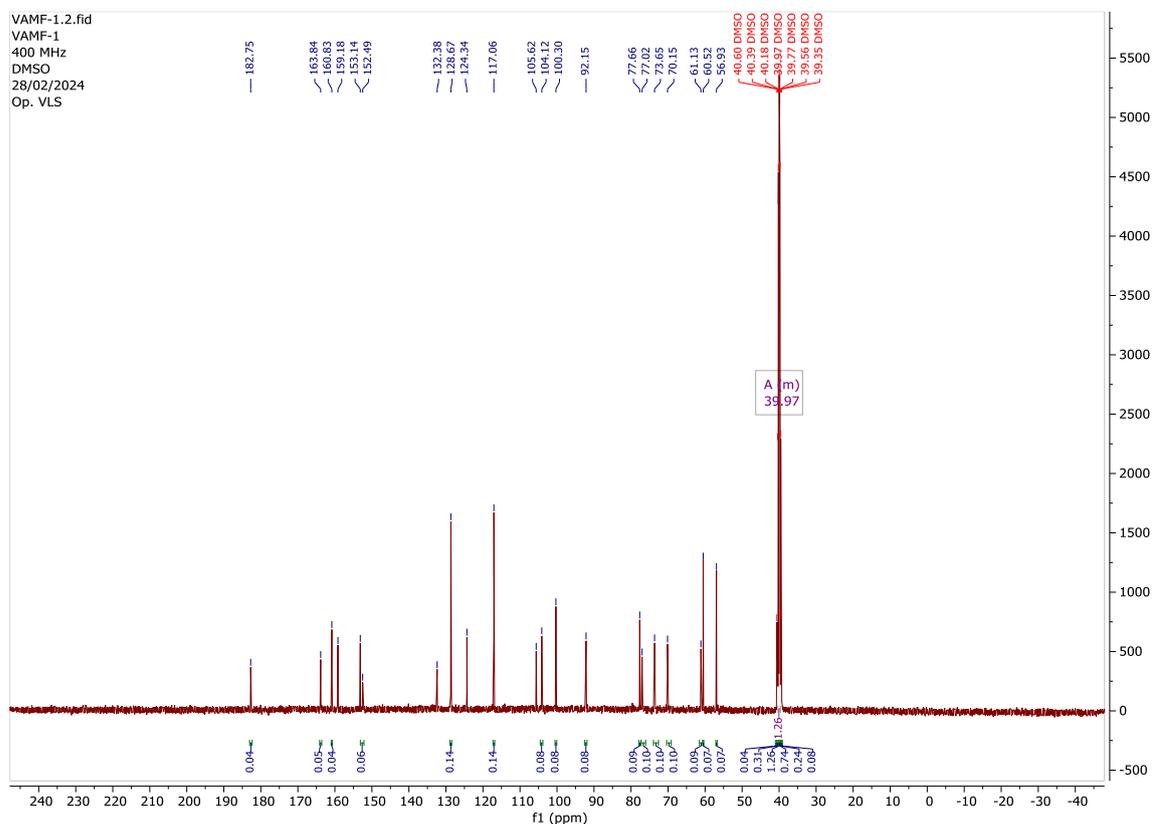
Fonte: O autor (2025).

## 5.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear da Cirsimarina

As análises dos espectros de RMN de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}$ ) permitiram a identificação dos sinais característicos da cirsimarina corroborando com sua estrutura química de flavonoide metoxilado e glicosilado proposto por Espectrometria de Massas. As Figuras 19 e 20 apresentam os espectros correspondentes, evidenciando os deslocamentos químicos discutidos.

Figura 19 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da cirsimarina (400 Hz, DMSO ( $d_6$ ) em ppm)

Fonte: O autor (2025).

Figura 20 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da cirsimarina (400 Hz, DMSO ( $d_6$ ) em ppm)

Fonte: O autor (2025).

No espectro de  $^1\text{H}$ , foram observados sinais típicos para flavonoides **Tabela 5**. O próton em C3 apresentou-se como um simpleto em  $\delta$  6,94 ppm, característico de um carbono aromático com um único próton não acoplado. O sinal em  $\delta$  8,50 ppm foi atribuído ao próton em C8, que também aparece como simpleto devido à ausência de prótons vizinhos, sendo este valor elevado justificado pela desblindagem provocada pelos grupos metoxila presentes nas posições C6 e C7. A presença de substituintes metoxila foi confirmada por dois sinais simples em  $\delta$  3,91 ppm e  $\delta$  3,73 ppm, referentes às metoxilas ligadas aos carbonos C6 e C7, respectivamente.

Tabela 5 - Valores de deslocamento químico e multiplicidade de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  em ppm) para a cirsimarina.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$
2		163,55
3	6,94 (s, 1H)	100,06
4		182,35
5 - OH	12,84 (s, 1H)	152,14
6 - $\text{OCH}_3$	3,91 (s, 1H)	60,34
7 - $\text{OCH}_3$	3,73 (s, 1H)	56,75
8	8,5 (s, 1H),	91,90
9		153,13
10		104,52
2' e 6'	8,06 (d, 2H)	128,43
3' e 5'	7,19 (d, 2H)	116,82
4' - glicose	3,44 (m, 11H)	69,14

Fonte: O autor (2025).

O sinal em  $\delta$  12,84 ppm foi atribuído à hidroxila em C5. Esse elevado deslocamento químico está relacionado à formação de ligação de hidrogênio intramolecular, fenômeno comum em flavonoides com hidroxilas fenólicas. Os prótons aromáticos do anel B apresentaram-se como dois pares de dubletos: H-2'/H-6' em  $\delta$  8,06 ppm e H-3'/H-5' em  $\delta$  7,19 ppm, confirmando o padrão simétrico desse anel. A presença de uma unidade hexose foi evidenciada pelo múltiplo em  $\delta$  3,44 ppm, referente aos prótons do açúcar, incluindo o próton anomérico.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  mostrou 13 sinais distintos, compatíveis com a estrutura proposta da cirsimarina. O carbono C3 apresentou deslocamento em  $\delta$  100,06 ppm, valor típico de carbonos aromáticos portando um próton. O carbono carbonílico em C4 foi identificado em  $\delta$  182,35 ppm, enquanto os carbonos fenólicos C5 e C9 foram detectados em  $\delta$  152,14 ppm e  $\delta$  153,13 ppm, respectivamente. Os carbonos ligados aos grupos metoxila apresentaram deslocamentos em  $\delta$  60,34 ppm (C6) e  $\delta$  56,75 ppm (C7).

No anel B, os carbonos C2'/C6' foram observados em  $\delta$  128,43 ppm, enquanto os carbonos C3'/C5' apareceram em  $\delta$  116,82 ppm. O carbono C4', que suporta a ligação com a unidade hexose, apresentou deslocamento em  $\delta$  69,14 ppm, valor coerente com a presença de um substituinte glicosídico.

Os dados obtidos confirmam a presença de grupos aromáticos, metoxilas, hidroxilas fenólicas e uma unidade hexose na estrutura da cirsimarina. Os deslocamentos químicos e padrões de multiplicidade observados corroboram com a configuração esperada para esse flavonoide metoxilado e glicosilado, validando sua caracterização estrutural.

### 5.3 Potencial antioxidante do EFSD pelo método DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH indicou que o EFSD apresentou atividade significativa, quando comparado ao padrão Trolox, conforme demonstrado na tabela 6. Além disso, extratos são considerados bioativos quando a concentração inibidora de 50% (CI<sub>50</sub>) é inferior a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que reforça a eficácia do EFSD como potencial antioxidante (SILVEIRA et al., 2018).

Tabela 6 - Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico e do controle Trolox

Amostras	Valores de CI <sub>50</sub>
EFSD	0,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Trolox	1,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Fonte: O autor (2025).

Com base na **Figura 21**, os tubos 1 e 2, correspondentes às concentrações de 500 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, demonstraram a capacidade do antioxidante presente no EFSD em neutralizar radicais livres, evidenciada pela redução do DPPH. A diminuição na coloração violeta característica da solução de DPPH é um indicativo direto da atividade antioxidante, pois reflete a transferência de elétrons do antioxidante para estabilizar os radicais livres.

Por outro lado, os tubos 3 e 4, que receberam concentrações mais baixas do extrato testado, não conseguiram neutralizar eficazmente o radical livre do DPPH, o que pode ser atribuído à baixa concentração do extrato nessas condições. Isso sugere que, para uma atividade antioxidante significativa, uma concentração mínima do extrato é necessária para que os compostos antioxidantes presentes no EFSD desempenhem seu papel de neutralização dos radicais livres.

Com base na **Figura 22**, a análise quantitativa revelou que o EFSD apresentou uma atividade antioxidante de  $0,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto o padrão Trolox, utilizado como referência, exibiu uma atividade de  $1,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Embora o valor do EFSD seja ligeiramente inferior ao do Trolox, os dados sugerem uma relevante capacidade antioxidante do extrato, reforçando seu potencial como fonte de compostos bioativos com propriedades redutoras de radicais livres. Essa diferença pode estar relacionada à concentração e à natureza química dos compostos presentes no EFSD, como os flavonoides e ácidos fenólicos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes.

Sivasankarapillai et al. (2022) relataram a atividade antioxidante das nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas a partir do extrato de *S. dulcis*, o qual apresentou um valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $1,78 \mu\text{g mL}^{-1}$  no ensaio de DPPH, indicando uma excelente atividade antioxidante e eficácia na captura de radicais livres.

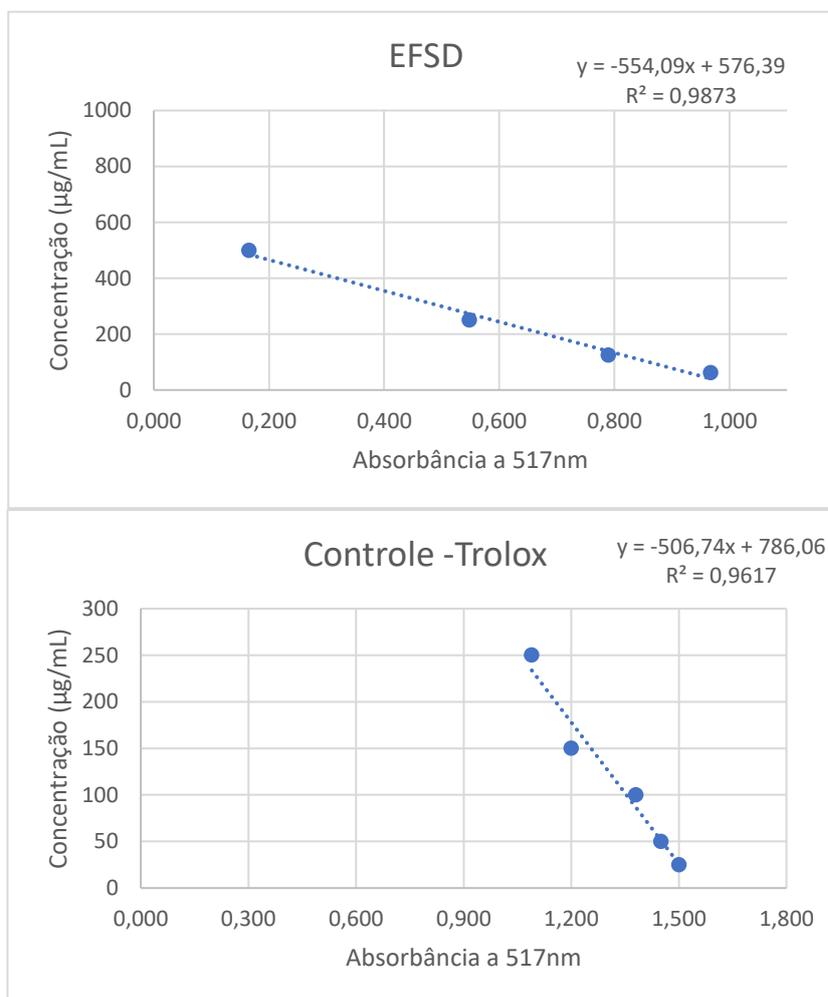
A relação entre a estrutura e a atividade antioxidante dos flavonoides está fortemente associada à presença de grupos hidroxila (-OH) em sua estrutura molecular (SARIAN et al., 2017). Esses grupos desempenham um papel fundamental na capacidade antioxidante, pois são responsáveis pela doação de elétrons ou átomos de hidrogênio, o que permite neutralizar radicais livres de forma eficiente. Flavonoides com múltiplos grupos hidroxila, especialmente nas posições orto ou meta, tendem a apresentar uma atividade antioxidante mais elevada, devido à sua maior capacidade de formar complexos com os radicais livres (JEONG et al., 2007). Além disso, a configuração espacial da molécula, como a conjugação de anéis aromáticos e a presença de grupos adicionais, como carbonilas ou metoxilas, também pode influenciar significativamente sua atividade antioxidante (ZHANG et al., 2020).

Figura 21 - Soluções após a adição do DPPH



Fonte: O autor (2025).

Figura 22 - Gráficos da atividade antioxidante do EFSD e do controle trolox



Fonte: O autor (2025).

O extrato demonstrou um relevante potencial antioxidante. Isso reforça a importância de compostos bioativos presentes no extrato de *S. dulcis*, como flavonoides e ácidos fenólicos, no combate aos radicais livres. A diferença observada entre o EFSD e o Trolox pode ser atribuída à concentração e à natureza química dos compostos antioxidantes, além de sugerir que o EFSD pode ser uma fonte promissora para o desenvolvimento de futuros agentes antioxidantes naturais.

## 5.4 Atividade anticâncer do extrato, VAMF-1 e VAMF-2

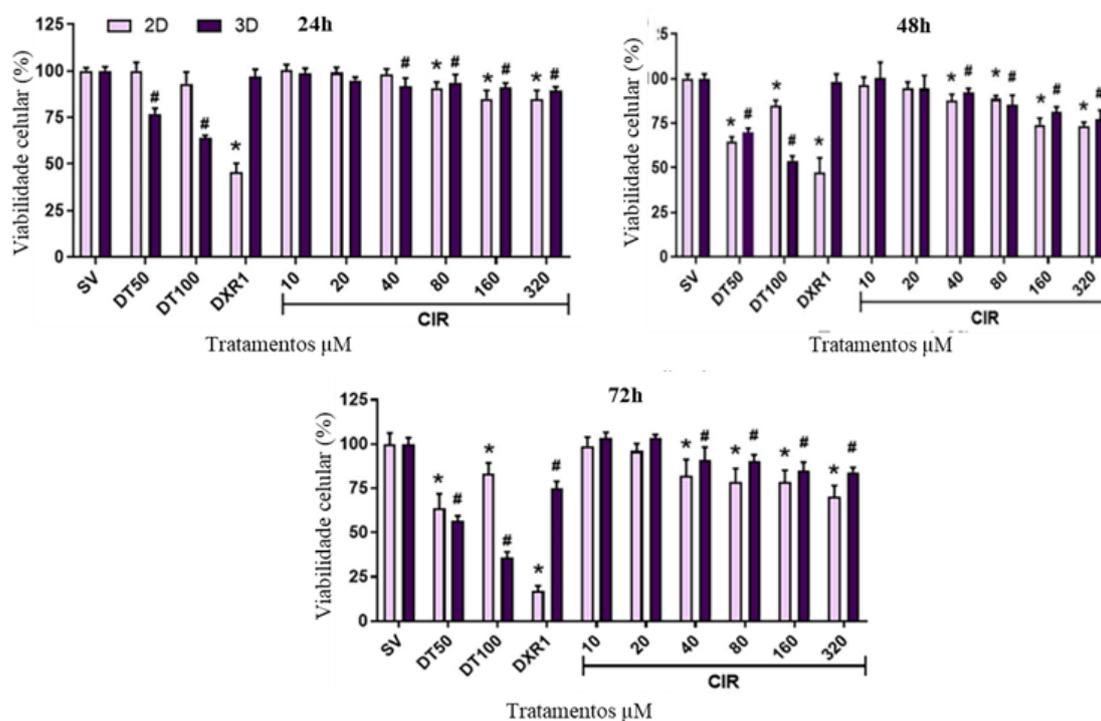
### 5.4.1 Efeito citotóxico em linhagens celulares MCF-7 e T24

#### 5.4.1.1 VAMF-1

A análise dos dados apresentados na **Figura 23** permite discutir aspectos importantes sobre a citotoxicidade da VAMF-1 em células MCF-7, evidenciando seu potencial antitumoral em diferentes modelos de cultura celular. Os resultados indicam que o VAMF-1 promove uma redução significativa nas especificações celulares em concentrações entre 10 e 320  $\mu\text{M}$ , com efeitos já perceptíveis a partir de 40  $\mu\text{M}$ . Essa característica é relevante, pois sugere que o VAMF-1 apresenta atividade citotóxica mesmo em concentrações baixas, o que pode ser vantajoso no contexto de terapias que visam minimizar os efeitos adversos associados ao uso de doses elevadas de compostos bioativos (SERPELONI et al., 2022).

Observe-se uma clara relação tempo-dependente na citotoxicidade, com a intensificação do efeito à medida que o período de exposição aumenta. Os tratamentos realizados por 24, 48 e 72 horas obtiveram  $\text{CI}_{50}$  de 80, 40 e 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente, mostrando uma melhoria progressiva da viabilidade celular. Esses dados indicam que a permanência do VAMF-1 no microambiente celular favorece a indução de apoptose. Esse comportamento é consistente com estudos que associam a exposição prolongada a agentes bioativos ao maior comprometimento das defesas celulares, o que ressalta a importância de avaliar cuidadosamente a duração do tratamento em contextos pré-clínicos.

Figura 23 - Viabilidade Celular (%) de Células MCF-7 Após Tratamento com Cirsimarina em Culturas 2D e 3D



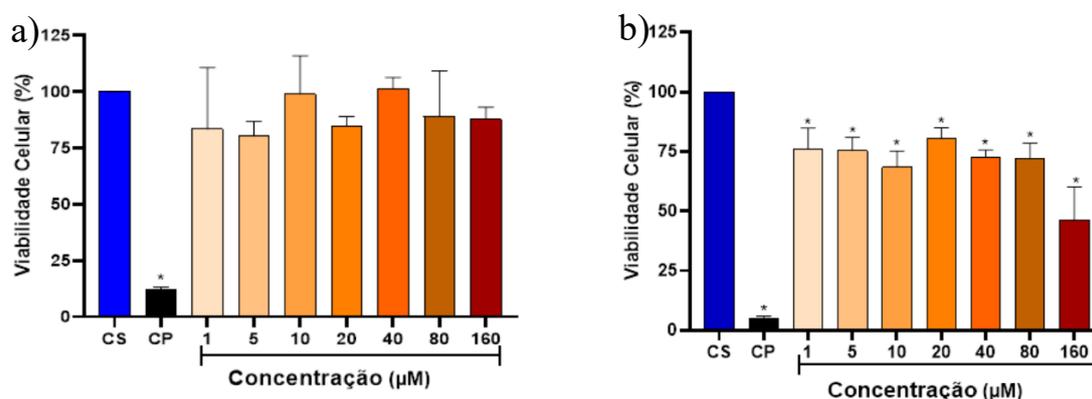
Fonte: O autor (2025)

Outro aspecto relevante discutido refere-se às diferenças observadas entre as culturas 2D e 3D. Os esferoides multicelulares (3D) apresentaram maior resistência ao VAMF-1 quando comparados às culturas bidimensionais, comportamento frequentemente relatado na literatura devido à presença de um microambiente mais complexo e protetor nos modelos tridimensionais. Tal estrutura dificulta não apenas a abrangência do composto, mas também a sua interação com alvos celulares críticos, reforçando a necessidade de utilizar modelos 3D para avaliar a eficácia de compostos com potencial terapêutico, dado que esses sistemas reproduzem de forma mais fiel a complexidade tumoral *in vivo*.

#### 5.4.1.2 VAMF-2

A viabilidade celular de VAMF-2 foi avaliada nas linhagens MCF-7 e T24, conforme ilustrado na **Figura 24**. O composto VAMF-2 apresentou um comportamento distinto entre as duas linhagens celulares.

Figura 24 - Viabilidade celular de VAMF-2. a) T24. b) MCF-7



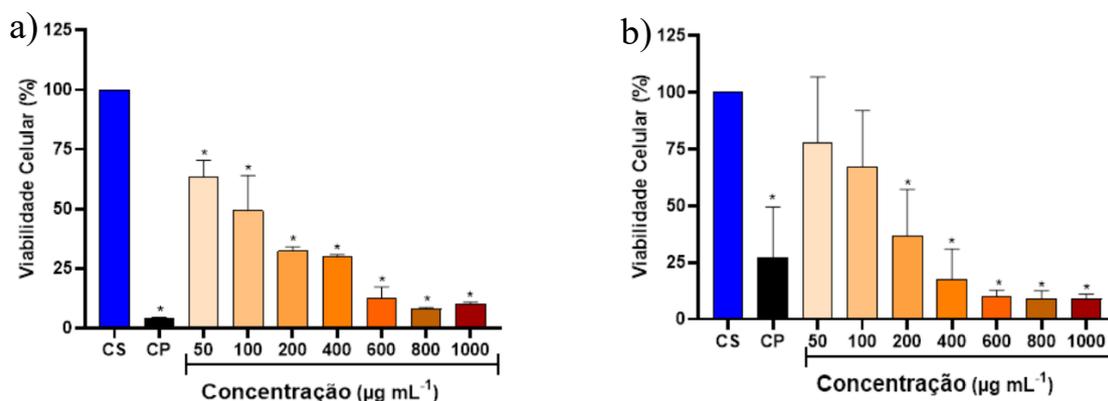
Fonte: O autor (2025)

Nas células MCF-7, a concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) foi de 112,1 µM, reduziu uma resposta antiproliferativa moderadamente. No entanto, conforme a literatura, compostos puros são considerados ativos apenas quando apresentam CI<sub>50</sub> inferior a 25 µM (VERONIKA BUTTERWECK; ADOLF NAHRSTEDT, 2017). Nas células T24, nenhuma das concentrações testadas de VAMF-2 foi capaz de reduzir a previsão celular em 50%, proporcionando uma resistência relativa dessa linhagem ao tratamento com o composto. Esses resultados destacam a necessidade de avaliar com mais profundidade o potencial do VAMF-2 em modelos tumorais diferentes e explorar estratégias possíveis para superar a resistência observada.

#### 5.4.1.3 Extrato hidroetanólico das partes aéreas de *Scoparia dulcis* (EFSD)

A viabilidade celular do EFSD foi avaliada nas linhagens celulares MCF-7 e T24, conforme ilustrado na **Figura 25**. Foi observada uma inibição da viabilidade celular a partir da segunda concentração testada (100 µg mL<sup>-1</sup>). Para as células MCF-7, o CI<sub>50</sub> foi de 100,1 µg mL<sup>-1</sup> após 24 horas de tratamento. Em comparação com as células T24, o EFSD apresentou uma concentração citotóxica de 129,4 µg mL<sup>-1</sup>, evidenciando uma maior resistência das células T24 em relação às MCF-7. Essas concentrações estão de acordo com a literatura, que estabelece que para os extratos serem considerados ativos, devem apresentar uma CI<sub>50</sub> inferior a 100 µg mL<sup>-1</sup> (VERONIKA BUTTERWECK; ADOLF NAHRSTEDT, 2017).

Figura 25 - Viabilidade celular de EFSD. a) MCF-7. b) T24



Fonte: O autor (2025).

O EFSD apresenta uma citotoxicidade promissora, devido a presença de compostos em sua composição química que contribuem para a redução da viabilidade das linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) e de bexiga (T24). Estudos conduzidos por Serpeloni *et al* (2022) demonstraram que a cirsimarina reduziu a viabilidade celular em culturas em monocamada 2D após 24 horas de tratamento com concentrações a partir de 80 µM. Além disso, após 48 e 72 horas de tratamento, o composto na concentração de 40 µM também resultou em diminuição da viabilidade celular. A atividade antiproliferativa dessas flavonas estão associadas à posição do grupo metóxi no anel A, por exemplo, tanto a 5-metoxiflavona quanto a 7-metoxiflavona demonstraram atividade moderada para células em células HL-60, com  $CC_{50} = 48$  e 68 µM, respectivamente (KAWAII; ISHIKAWA; YOSHIZAWA, 2018).

A isovitexina, também conhecida como apigenina-6-C-hexosídeo, que apresenta um perfil terapêutico abrangendo atividades antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e neuroprotetora (He et al., 2016). Estudos sobre a isovitexina revelam seu impacto em diferentes tipos de neoplasias, como carcinoma de mama (Epstein Shochet et al., 2015), carcinoma oral (Yang et al., 2013), leucemia (Lee et al., 2012), tumores cerebrais (Choi et al., 2006) e câncer esofágico (An et al., 2015). Em células de carcinoma de mama, por exemplo, a isovitexina inibiu a migração celular em uma concentração de 2 µM, sugerindo um efeito antimetastático promissor. Em células de carcinoma oral, a viabilidade celular foi reduzida com concentrações de 25 a 100 µM, reforçando seu potencial terapêutico (He et al., 2016).

A escutelarina, por sua vez, também se destaca por sua capacidade de inibir a proliferação de várias linhagens celulares cancerígenas, incluindo células de glioma, como U87 e U251. De acordo com estudos, esse composto promove uma redução dose-dependente na

viabilidade celular, ou seja, concentrações mais elevadas resultam em uma maior diminuição na multiplicação das células tumorais (TANG; GAO; HU, 2019).

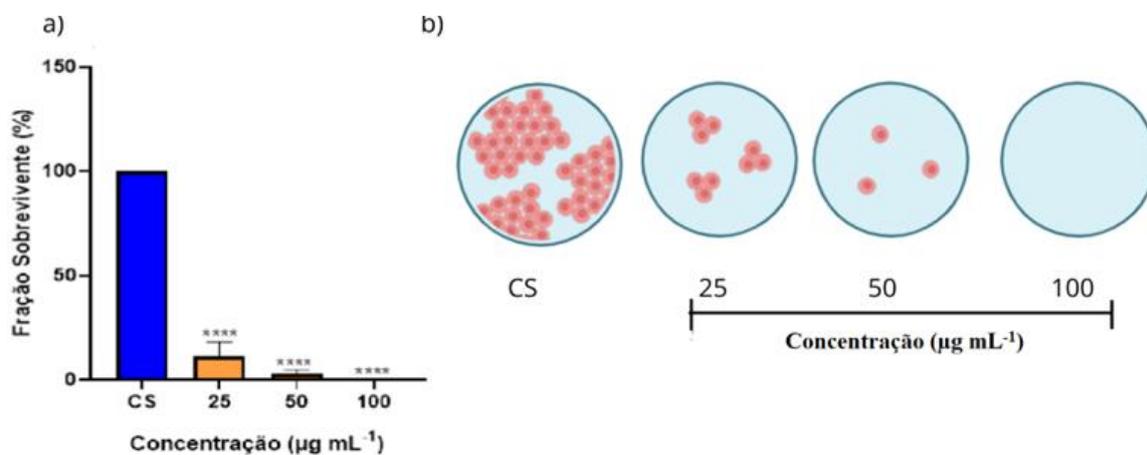
A vicenina-2 apresenta diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena. Estudos relatam que essa substância exerce efeitos antiangiogênicos, pró-apoptóticos e antiproliferativos em células de câncer de próstata, além de inibir a proliferação de células de câncer de cólon (HT-29) por meio da via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina (YANG et al., 2018).

As flavonas extraídas de produtos naturais apresentam atividade anticancerígena, com ação predominante nas mitocôndrias. O mecanismo de ação da vicenina-2 envolve a indução de apoptose, um processo de morte celular programada. Esse composto afeta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e compromete a integridade da membrana mitocondrial, desencadeando cascatas de sinalização que levam à morte celular. Além disso, a vicenina-2 interage com proteínas e genes reguladores do ciclo celular e da apoptose, contribuindo tanto para a inibição da proliferação tumoral quanto para a eliminação de células cancerígenas (CHEN et al., 2022).

#### 5.4.2 Ensaio Clonogênico

Os resultados do ensaio clonogênico para o EFSD e VAMF-1, ilustrados na **Figura 26** e **Figura 27**, foram obtidos após 24 horas de exposição aos tratamentos, seguido de 10 dias de incubação para o crescimento das colônias. A análise revelou uma redução acentuada na capacidade proliferativa das células em todas as concentrações testadas do EFSD. Na dose de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , apenas 11,23% das células semeadas conseguiram formar colônias, evidenciando uma inibição da proliferação celular. Esse efeito se tornou ainda mais evidente com o aumento da concentração para  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , resultando na formação de colônias por apenas 3,21% das células, o que demonstra uma redução drástica da capacidade de clonagem.

Figura 26 - a) Fração de sobrevivência após 24h de tratamento com EFSD. b) Imagens representativas das colônias para cada tratamento.

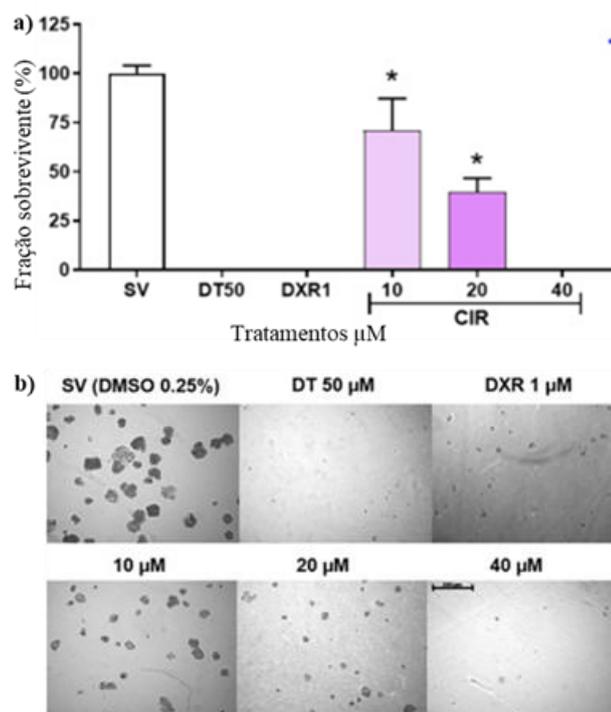


Fonte: O autor (2025).

Na maior concentração avaliada, observou-se uma inibição completa, sem a formação de qualquer colônia, indicando que o EFSD provocou um efeito citotóxico total. Esse resultado sugere que, em concentrações elevadas, o composto elimina totalmente a viabilidade celular, destacando seu potencial citotóxico e sua eficácia em bloquear a proliferação e regeneração celular (KOCH et al., 2023).

Os efeitos do VAMF-1 na viabilidade de longo prazo e na capacidade replicativa das células MCF-7 foram avaliados. Observou-se que o tratamento com VAMF-1 nas concentrações de 10, 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$  resultou em uma redução considerável na formação de colônias (**Figura 27a**).

Figura 27 - a) Fração de sobrevivência após 24h de tratamento com VAMF-1. b) Imagens representativas das colônias para cada tratamento.



Fonte: O autor (2025).

Os controles positivos, DXR (1  $\mu\text{M}$ ) e DT (50  $\mu\text{M}$ ), inibiram completamente a formação de colônias. No entanto, como ilustrado na **Figura 27**, no tratamento com DXR, algumas células permaneceram isoladas ou formaram colônias com um número reduzido de células. Já os tratamentos com VAMF-1 (10 e 20  $\mu\text{M}$ ) resultaram em uma redução no número de unidades formadoras de colônias, além de reduzir o tamanho das colônias formadas em comparação ao controle SV. Com as concentrações de VAMF-1  $\geq$  40  $\mu\text{M}$ , não foram observadas células isoladas ou colônias pequenas (**Figura 27a**).

### 5.4.3 Ensaio de Resazurina em 3D e Análises Fotomicroscópica

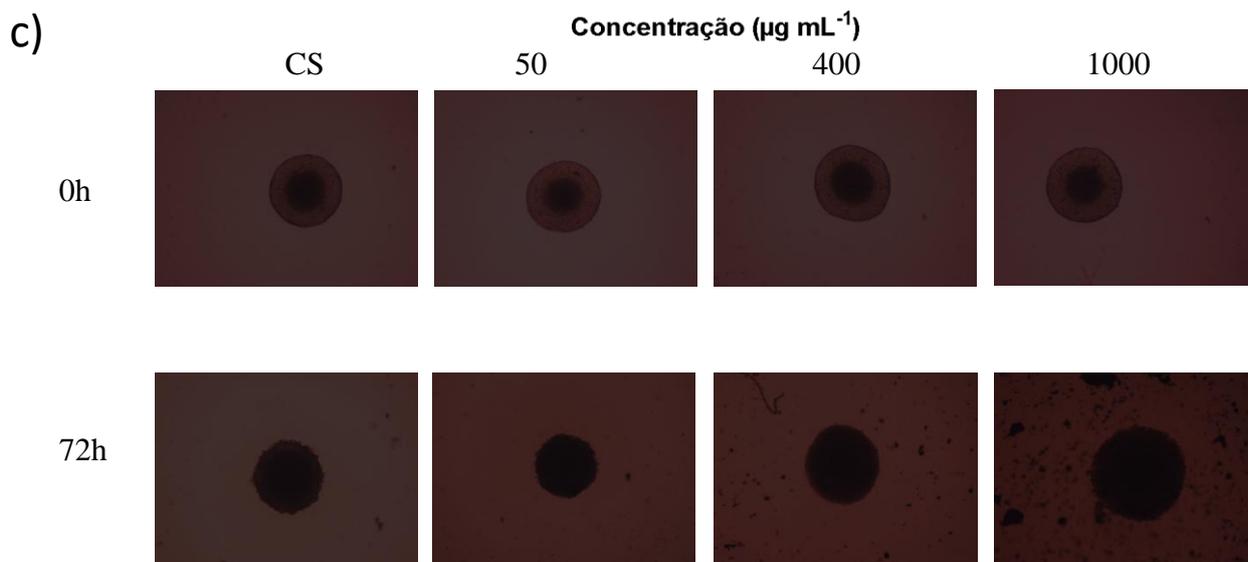
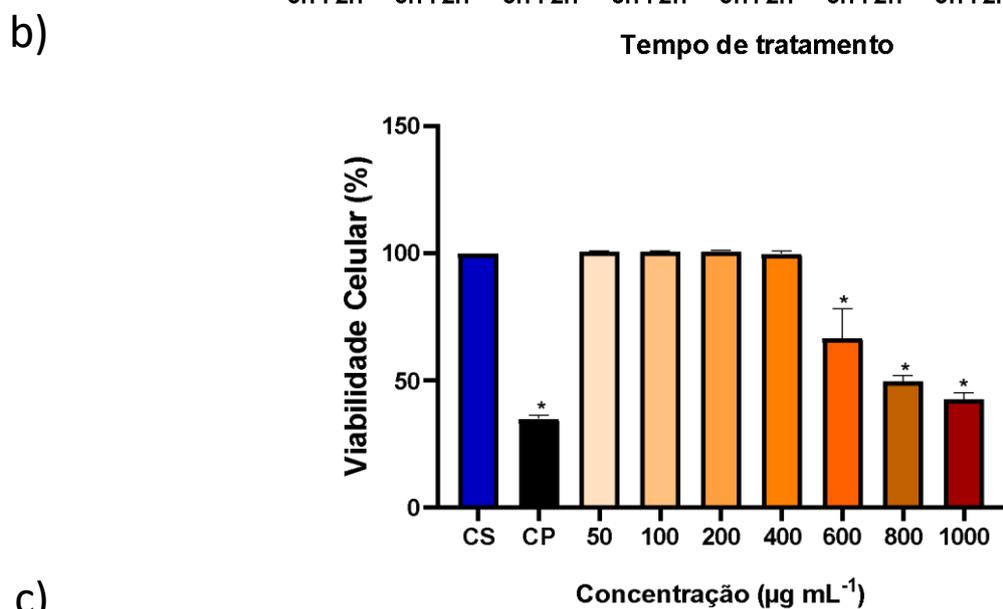
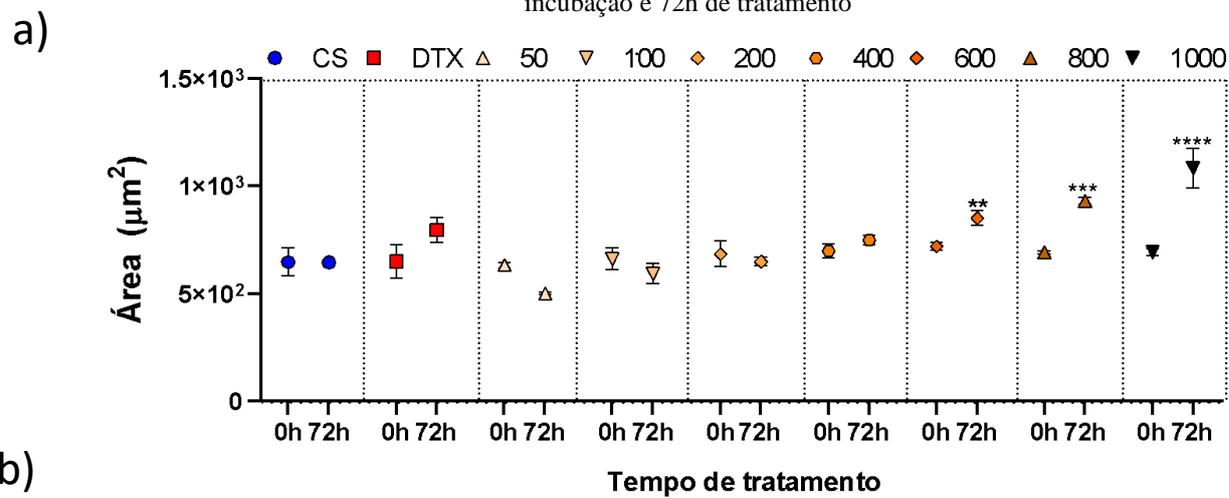
Os resultados obtidos pelo ensaio de redução de resazurina cultura 3D após 72h de tratamento dos esferóides com EFSD e VAMF-1 estão apresentados na **Figura 28 e Figura 29**, respectivamente. O ensaio para o EFSD mostrou uma diminuição da viabilidade celular dos esferoides da linhagem celular MCF-7, tratados com concentrações  $\geq 600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo calculado um CI50 de  $573,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , correspondendo a um valor 5,73 vezes maior com o mesmo tempo de tratamento, quando comparado ao ensaio de viabilidade celular com MTT.

Essa diferença nos resultados pode ser explicada pelas características distintas dos ensaios 2D e 3D. Nos ensaios 2D, as células estão dispostas em uma camada monoestratificada, permitindo uma distribuição uniforme do extrato. Em contraste, nos esferoides tridimensionais, as células formam uma estrutura mais compacta, o que pode dificultar a penetração do extrato, especialmente nas camadas mais internas dos esferoides. Isso resulta em uma menor concentração do composto nessas regiões, reduzindo a eficácia do tratamento.

Além disso, os esferoides mimetizam melhor as condições de um tumor *in vivo*, apresentando regiões com baixa oxigenação (hipóxia) e células com metabolismo alterado, o que pode conferir maior resistência ao tratamento. As células nas camadas mais internas dos esferoides, em particular, podem ser mais resistentes devido a esses fatores. O modelo tridimensional, portanto, representa um ambiente mais desafiador para os compostos, refletindo a complexidade dos tumores reais e a necessidade de uma concentração maior do extrato para exercer um efeito eficaz.

Na análise do crescimento esferoidal, foi observado que nas concentrações de 50 a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  ocorreu uma diminuição na área dos esferoides, refletida tanto nas medidas quantitativas quanto nas fotomicrografias correspondentes. Esse efeito sugere uma inibição direta da proliferação celular nas concentrações mais baixas do tratamento. Entretanto, em concentrações acima de  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ , houve um aparente aumento no tamanho dos esferoides. Esse aumento, porém, não é indicativo de proliferação celular ativa, mas sim da expansão da zona necrótica central, decorrente de uma supressão severa da viabilidade celular. À medida que as células entram em apoptose ou necrose, a zona de proliferação na periferia dos esferoides se retrai, enquanto a zona necrótica se expande, levando ao desprendimento das células mortas. Esse processo pode causar um aspecto desorganizado e, visualmente, dar a impressão de aumento do volume total dos esferoides, mesmo com a perda da integridade celular e o colapso de sua arquitetura interna.

Figura 28 - a) Áreas compreendidas pelos esferoides nos tempos 0h e 72h. b) Resultado de viabilidade celular do ensaio de resazurina após tratamento com EFSD. c) Imagens representativas de de EMTs após 2 dias de incubação e 72h de tratamento



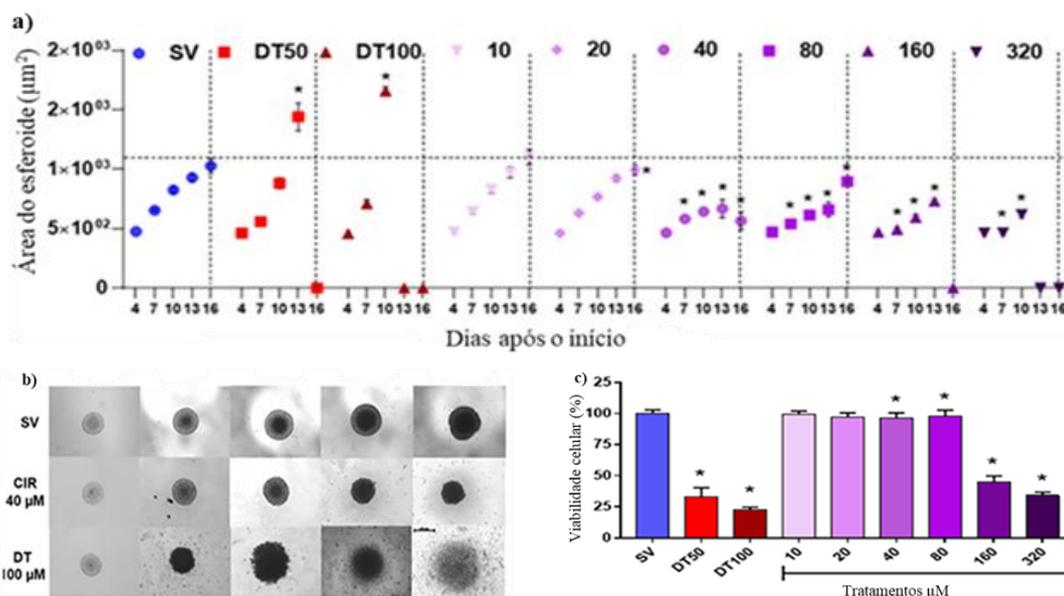
Fonte: O autor (2025).

Os dados obtidos para o VAMF-1 revelam que o tratamento com este composto, em concentrações variando de 10 a 320  $\mu\text{M}$ , induz um efeito citotóxico nas células MCF-7, como evidenciado pela diminuição do volume e da integridade dos esferoides (**Figura 29a**). Essa alteração no crescimento dos esferoides é significativa quando comparada ao grupo controle solvente (CS) e ao controle positivo (docetaxel), sugerindo que o VAMF-1 pode exercer um efeito inibitório na proliferação celular. Embora os mecanismos subjacentes a esse efeito ainda precisem ser elucidados, esses dados indicam que o VAMF-1 tem o potencial de interferir no crescimento tumoral.

As imagens representativas de morfologia e estrutura dos esferoides (**Figura 29b**), coletadas ao longo do tratamento, revelam uma resposta diferencial das células MCF-7 às diferentes concentrações de VAMF-1. Essas observações destacam a importância de modelos tridimensionais (3D) na avaliação do comportamento tumoral, pois permitem a visualização de alterações estruturais que não seriam evidentes em modelos 2D. Os esferoides tratados com VAMF-1 apresentaram modificações morfológicas significativas, o que sugere que, além de induzir a morte celular, o composto pode afetar também o microambiente tumoral, impactando a organização e a dinâmica celular do tumor.

Além disso, a análise de viabilidade celular, realizada por meio do ensaio de resazurina, confirmou que o VAMF-1 reduz a viabilidade das células MCF-7, refletindo seu potencial antitumoral. Esses resultados estão em consonância com estudos anteriores, que indicam que compostos naturais, como a cirsimarina, possuem atividades antitumorais, sendo capazes de oferecer alternativas ou complementar as terapias convencionais de quimioterapia (SERPELONI et al., 2022). Em conjunto, os dados sugerem que o VAMF-1 pode ser um agente promissor para o tratamento de câncer, com capacidade de modular tanto a viabilidade celular quanto a arquitetura tumoral.

Figura 29 - (a) Volume (área) de células tumorais de mama MCF-7 cultivadas como esferoides 3D e tratadas com VAMF-1 (10 a 320  $\mu\text{M}$ ), solvente (SV; 0,25% DMSO) e controles positivos (docetaxel, DT 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) avaliados por 16 dias. (b) Imagens representativas da morfologia, estrutura e crescimento dos esferoides MCF-7 foram obtidas a cada 3 dias por 16 dias após o tratamento com SV (painel superior), CIR 40  $\mu\text{M}$  (painel central) ou DT 100  $\mu\text{M}$  (painel inferior). (c) A viabilidade celular após 16 dias foi medida pelo ensaio de resazurina



Fonte: O autor (2025).

A resistência aumentada das células em transição epitelial-mesenquimal (EMT) à citotoxicidade do extrato hidroetanólico pode ser explicada por vários fatores relacionados à complexa estrutura tridimensional dos esferoides. Em primeiro lugar, a distribuição heterogênea do tratamento, assim como a difusão limitada de gases e nutrientes, resulta em diferentes microambientes dentro das camadas dos esferoides. As camadas externas, mais expostas, recebem uma maior concentração de compostos bioativos, enquanto as camadas internas, devido à barreira física criada pelas células mais periféricas, enfrentam uma menor exposição (GUNTI et al., 2021).

Além disso, o aumento das interações entre células, e a matriz extracelular, fortalece a coesão estrutural dos esferoides, dificultando ainda mais a penetração de substâncias citotóxicas. Essas interações criam uma barreira física que limita a difusão eficaz dos compostos até as camadas mais profundas, onde as células em EMT tendem a se localizar. Esse microambiente mais protegido, associado ao fenótipo mais resistente das células mesenquimais, contribui para uma menor sensibilidade ao tratamento nas zonas internas do esferoide, promovendo assim a sobrevivência celular e a evasão à morte induzida por citotóxicos (JENSEN; TENG, 2020; LEE et al., 2021)

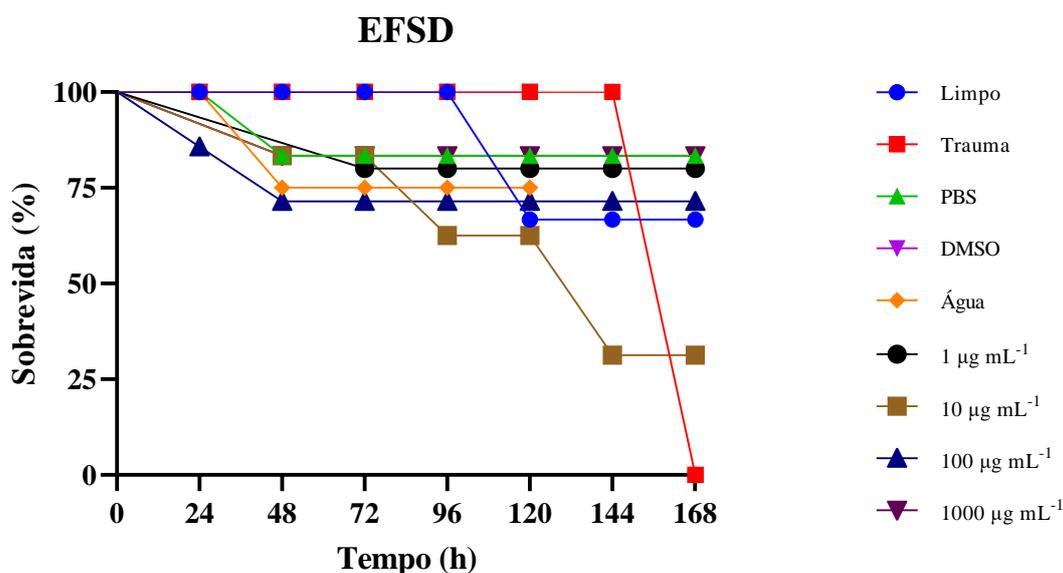
### 5.5 Estudo de toxicidade *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*

As larvas de *T. molitor* destacam-se como um modelo inovador de invertebrado para a avaliação de parâmetros de citotoxicidade, oferecendo uma alternativa ao uso de vertebrados em testes preliminares. A partir das concentrações testadas, foi possível avaliar a citotoxicidade do EFSD em cada concentração.

Nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a letalidade foi expressiva, com 6 e 8 mortes, respectivamente. Em contrapartida, na concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , apenas 2 larvas morreram. Esse resultado sugere uma resposta não linear à concentração do composto, possivelmente relacionada ao fenômeno de hormese, em que exposições a doses mais baixas provocam maior estresse celular, resultando em danos e respostas tóxicas mais acentuadas (Ranieri et al., 2017). Por outro lado, concentrações mais elevadas, como 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , podem induzir a ativação de mecanismos de defesa e detoxificação, atenuando os efeitos adversos.

Ao comparar o EFSD com os controles, pode-se concluir que as mortes das larvas são atribuíveis à toxicidade da amostra injetada em diferentes concentrações. No grupo controle trauma, registrou-se apenas uma morte nas últimas horas (em 168 h), o que sugere que larvas não morreram em função do estímulo gerado pela agulha da seringa. Em relação ao DMSO, foram registradas duas mortes após 144 horas e três mortes após 168 horas, o que pode ser atribuído ao fato de o DMSO ser um solvente de baixa toxicidade. (SPOCHACZ et al., 2018).

Figura 30 - Avaliação da toxicidade aguda do EFSD em larvas de *Tenebrio molitor*



Fonte: O autor (2025).

Além disso, é importante ressaltar que o ensaio com *Tenebrio molitor* é um modelo utilizado para avaliar a toxicidade e a segurança de compostos bioativos, já que as larvas compartilham características fisiológicas com organismos superiores. Dessa forma, os resultados obtidos podem fornecer insights iniciais sobre o potencial do extrato em diferentes modelos biológicos, ajudando a entender seus efeitos de forma mais ampla e auxiliando no desenvolvimento de futuras pesquisas sobre a segurança e eficácia do extrato de *S. dulcis*.

## 6 Conclusão

O presente estudo caracterizou quimicamente o extrato hidroetanólico das partes aéreas de *Scoparia dulcis* e avaliou seu efeito citotóxico em células tumorais. A análise por LC-MS revelou a presença de flavonoides e outros metabólitos bioativos, e a purificação do extrato permitiu o isolamento de compostos específicos, incluindo a cirsimarina e a cirsimaritina.

Os ensaios de viabilidade celular demonstraram que o extrato e seus compostos isolados apresentaram atividade citotóxica seletiva contra a linhagem de câncer de mama MCF-7, enquanto as células de câncer de bexiga T24 mostraram maior resistência ao tratamento. Além disso, a avaliação antioxidante pelo método DPPH confirmou a capacidade do extrato de neutralizar radicais livres, sugerindo um potencial terapêutico adicional.

Embora os resultados indiquem um efeito promissor de *Scoparia dulcis* no combate ao câncer, estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade observada, bem como para validar a eficácia dos compostos em modelos *in vivo*. Esses achados reforçam a importância da biodiversidade brasileira como fonte de novos candidatos a fármacos para o tratamento do câncer.

## REFERÊNCIAS

- AFNAN KV et al. Formulation and evaluation of herbal nanosuspension of *Scoparia dulcis*. **World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences**, v. 13, n. 1, p. 339–343, 30 jan. 2023.
- AGHAKHANI, F.; KHARAZIAN, N.; LORI GOOINI, Z. Flavonoid Constituents of *Phlomis* (Lamiaceae) Species Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 180–195, 5 mar. 2018.
- AHMADI, N.; SHAFEE, H.; MOUDI, E. Prediction of recurrence risk in patients with non-muscle invasive bladder cancer. **Asian Journal of Urology**, n. xxxx, 2024.
- AL-ABIDE, N. M. A morphological and anatomical comparative Study of the Reproductive parts of the genus *Veronica* L. (Plantaginaceae) in northern Iraq. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1294, n. 6, 2019.
- AN, F. et al. Effects of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells. **Oncology Letters**, v. 10, n. 4, p. 2627–2633, 2015.
- ANDERSON, J. A. et al. Invasive poorly differentiated adenocarcinoma of the bladder following augmentation cystoplasty: a multi-institutional clinicopathological study. **Pathology**, v. 53, n. 2, p. 214–219, fev. 2021.
- ANTONI, S. et al. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. **European Urology**, v. 71, n. 1, p. 96–108, 2017.
- BABINCOVÁ, M.; SCHRONEROVÁ, K.; SOURIVONG, P. Antiulcer activity of water extract of *Scoparia dulcis*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7–8, p. 587–588, dez. 2008.
- BASSETT, J. C. et al. Prevalence and Correlates of Successful Smoking Cessation in Bladder Cancer Survivors. **Urology**, v. 153, p. 236–243, 2021.
- BEN YAKOUB, A. R. et al. Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 206–213, ago. 2018.
- BENÏNE, C. et al. A systematic review on *Hammada scoparia* medicinal plant: Phytochemicals, traditional uses and biological activities. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 10, n. 1, p. 137–146, 26 mar. 2023.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

CAO, K. et al. Effective Components and Molecular Mechanism of Biejiaruangan Capsule Against Liver Fibrosis: High-resolution Mass Spectrometry, Network Pharmacological Analysis and Experimental Verification. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 28, 14 out. 2024.

CHOI, H. J. et al. Vitexin, an HIF-1 $\alpha$  inhibitor, has anti-metastatic potential in PC12 cells. **Molecules and Cells**, v. 22, n. 3, p. 291–299, 2006.

CIFRIC, S. et al. DAMPening Tumor Immune Escape: The Role of Endoplasmic Reticulum Chaperones in Immunogenic Chemotherapy. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 00, n. 00, p. 1–14, 2024.

COULIBALY, A. Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 12, p. 1576–1582, 2011.

CSUK, R.; AL-HARRASI, A. Editorial for the special issue on frankincense. **Phytochemistry**, v. 173, n. February, 2020.

DHUNGEL, L. et al. Synergistic Effects of Temozolomide and Doxorubicin in the Treatment of Glioblastoma Multiforme: Enhancing Efficacy through Combination Therapy. **Molecules**, v. 29, n. 4, 2024.

DONG, L. et al. A new labdane diterpenoid from *Scoparia dulcis* improving pancreatic function against islets cell apoptotic by Bax/Bcl-2/Caspase-3 pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 322, p. 117571, mar. 2024.

DUAN, H. et al. Identification of phytochemicals and antioxidant activity of *Premna microphylla* Turcz. stem through UPLC-LTQ-Orbitrap-MS. **Food Chemistry**, v. 373, n. PB, p. 131482, 2022.

EPSTEIN SHOCHET, G. et al. First trimester human placental factors induce breast cancer cell autophagy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 149, n. 3, p. 645–654, 2015.

EVANS, D. G. R. et al. Breast cancer risk stratification in women of screening age: Incremental effects of adding mammographic density, polygenic risk, and a gene panel. **Genetics in Medicine**, v. 24, n. 7, p. 1485–1494, 2022.

FENG, S.; SHEN, X. Preparation of submicron ion-exchange fibers and application in copper ions removal from aqueous solutions. **E-Polymers**, p. 2024, 2010.

FERLAY, J. et al. (ed.). **Cancer today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2018.

FONSECA, L. H. M. Combining molecular and geographical data to infer the phylogeny of Lamiales and its dispersal patterns in and out of the tropics. **Molecular**

**Phylogenetics and Evolution**, v. 164, n. August, p. 107287, 2021.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

GOUVEIA, S. C.; CASTILHO, P. C. Artemisia annua L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. **Industrial Crops & Products**, v. 45, p. 170–181, 2013.

GRAFFEO, R. et al. Moderate penetrance genes complicate genetic testing for breast cancer diagnosis: ATM, CHEK2, BARD1 and RAD51D. **Breast**, v. 65, n. April, p. 32–40, 2022.

GUNTI, S. et al. Organoid and spheroid tumor models: Techniques and applications. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 1–18, 2021.

HASSAN, M. M. et al. Chemobrain: Insight the possible mechanisms of action induced by chemotherapeutic agents. v. 8, n. 1, p. 59–75, 2023.

HE, L. et al. Rapid identification and quantitative analysis of the chemical constituents in *Scutellaria indica* L. by UHPLC–QTOF–MS and UHPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 125–139, jan. 2016a.

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

HÖPKE, J.; MUCINA, L.; ALBACH, D. C. Phylogenetic and morphometric analysis of *Plantago* section *Coronopus* (Plantaginaceae). **TAXON**, v. 68, n. 2, p. 315–339, 12 abr. 2019.

IKANOVIC, T. et al. In Silico Analysis of Scopoletin Interaction with Potential SARS-CoV-2 Target. In: [s.l: s.n.]. p. 897–903.

INCA. DADOS E NÚMEROS DO CÂNCER DE MAMA. p. 0–33, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Câncer de mama**. 04 de junho de 2022a. Disponível em <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>> Acesso em: 28 fev. 2024

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022b

JANDRI, Z. et al. Authentication of Indian citrus fruit / fruit juices by untargeted and targeted metabolomics. v. 72, 2017.

JENSEN, C.; TENG, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. March, p. 1–15, 2020.

JEONG, K. M. et al. Identification of Major Flavone C -Glycosides and Using Deep Eutectic Solvents. 2017.

JEZIERZAŃSKI, M. et al. Temozolomide (TMZ) in the Treatment of Glioblastoma Multiforme—A Literature Review and Clinical Outcomes. **Current Oncology**, v. 31, n. 7, p. 3994–4002, 2024.

JIA, S. et al. Characterization of the complete chloroplast genome of the medicinal herb *Veronica polita* Fr. 1819 (Lamiales: Plantaginaceae). **Mitochondrial DNA Part B: Resources**, v. 7, n. 6, p. 1078–1080, 2022.

JIANG, Z. et al. A review on the phytochemistry and pharmacology of the herb: *Scoparia dulcis* L. For the potential treatment of metabolic syndrome. **RSC Advances**, v. 11, n. 50, p. 31235–31259, 2021.

JONES, R. J. et al. Systemic anticancer therapy for urothelial carcinoma: UK oncologists' perspective. **British Journal of Cancer**, v. 130, n. 6, p. 897–907, 2024.

KAMEL, E. M. et al. Molecular modeling and DFT studies on the antioxidant activity of *Centaurea scoparia* flavonoids and molecular dynamics simulation of their interaction with  $\beta$ -lactoglobulin. **RSC Advances**, v. 13, n. 18, p. 12361–12374, 2023.

KITA, Y. et al. Real-world sequential treatment patterns and clinical outcomes among patients with advanced urothelial carcinoma in Japan. **International Journal of Urology**, v. 31, n. 5, p. 552–559, maio 2024.

KOCH, R. A. et al. A time-resolved clonogenic assay for improved cell survival and RBE measurements. **Clinical and Translational Radiation Oncology**, v. 42, n. July, p. 100662, 2023.

KONG, R. S.; HENRY, H. A. L. Interactions of plant growth responses to spring freezing and summer drought: a multispecies comparison. **American Journal of Botany**, v. 106, n. 4, p. 531–539, 2019.

KUERBAN, G. et al. Chemical Composition of *Artemisia Scoparia* and Their Bioactivities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 5, 18 maio 2024.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, p. 1–12, 2007.

LEE, C. Y. et al. Apoptosis triggered by vitexin in U937 human leukemia cells via a mitochondrial signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 28, n. 5, p. 1883–1888, 2012.

LEE, M. W. et al. Current methods in translational cancer research. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 40, n. 1, p. 7–30, 2021.

LEE, N. et al. Urine exosomes as biomarkers in bladder cancer diagnosis and prognosis:

From functional roles to clinical significance. **Frontiers in Oncology**, v. 12, n. September, p. 1–8, 2022.

LIU, D.; WANG, S.; WANG, J. The effect of CT high-resolution imaging diagnosis based on deep residual network on the pathology of bladder cancer classification and staging. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 215, p. 106635, 2022.

LIU, J. et al. Intravesical chemotherapy synergize with an immune adjuvant by a thermo-sensitive hydrogel system for bladder cancer. **Bioactive Materials**, v. 31, n. June 2023, p. 315–332, 2024.

MOHARRAM, F. et al. New apigenin glycoside, polyphenolic constituents, anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Gaillardia grandiflora* and *Gaillardia pulchella* aerial parts. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 50, p. 244, 2017.

MURUGAN, G. et al. Elucidating the inhibitory mechanism of yeast  $\alpha$ -glucosidase by phytocompounds from *Scoparia dulcis* through in vitro and in silico approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 6, p. 2574–2586, 2023.

NIKITIN, E. et al. Five Different *Artemisia* L. Species Ethanol Extracts' Phytochemical Composition and Their Antimicrobial and Nematocide Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14372, 21 set. 2023.

OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. **Medicine (United States)**, v. 103, n. 3, p. E36905, 2024.

OZAROWSKI, M. et al. Comparison of bioactive compounds content in leaf extracts of *Passiflora incarnata*, *P. caerulea* and *P. alata* and in vitro cytotoxic potential on leukemia cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 2, p. 179–191, 2018.

PAMUNUWA, G.; KARUNARATNE, D. N.; WAISUNDARA, V. Y. Antidiabetic Properties, Bioactive Constituents, and Other Therapeutic Effects of *Scoparia dulcis*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

PARI, L.; LATHA, M. Antihyperlipidemic Effect of *Scoparia dulcis* (Sweet Broomweed) in Streptozotocin Diabetic Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 1, p. 102–107, mar. 2006.

POWLES, T. et al. Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up ☆. **Annals of Oncology**, v. 33, n. 3, p. 244–258, 2022.

PROTSKA, V. STUDY OF THE AMINO ACIDS COMPOSITION OF *KOCHIA SCOPARIA* (L.) SCHRAD. **Fitoterapia**, n. 3, p. 123–126, 2023.

PURGATORIO, R. et al. A Critical Appraisal of the Protective Activity of Polyphenolic Antioxidants against Iatrogenic Effects of Anticancer Chemotherapeutics #. **Antioxidants**, v.

13, n. 1, 2024.

QI, Y. et al. Optimization of Extraction and Purification of Polysaccharides from *Veronicastrum axillare*, and Evaluation of Their Biological Activities. **Chemistry and Biodiversity**, v. 18, n. 3, p. 2024, 2021.

RAHHAL, B. M. et al. Phytochemical Screening, Antioxidative, Antiobesity, Antidiabetic and Antimicrobial Investigations of *Artemisia scoparia* Grown in Palestine. **Processes**, v. 10, n. 10, p. 2050, 11 out. 2022.

RESENDE, L. A. DE et al. CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE ESPÉCIES ARBÓREAS EM DIFERENTES MODELOS DE PLANTIO NA RECUPERAÇÃO DE ÁREA DEGRADADA POR DISPOSIÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS1. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 147–157, fev. 2015.

RIZEQ, B. et al. The power of phytochemicals combination in cancer chemoprevention. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 15, p. 4521–4533, 2020.

SARKAR, A. et al. Phytochemical, botanical and Ethnopharmacological study of *Scoparia dulcis* Linn. (Scrophulariaceae): A concise review. **The Pharma Innovation**, v. 9, n. 7, p. 30–35, 2020.

SERPELONI, J. M. et al. Flavone cirsimarin impairs cell proliferation, migration, and invasion in MCF-7 cells grown in 2D and 3D models. **Toxicology in Vitro**, v. 83, n. November 2021, 2022.

SILVEIRA, A. C. DA et al. **Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível.** , 2018.

SREEJA, P. S. et al. *Sphenodesme involucreta* var. *paniculata* (C.B. Clarke) Munir.: Chemical characterization, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of methanol extract of leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 71–80, out. 2018.

SRINIVAS, K. et al. Biolistic transformation of *Scoparia dulcis* L. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 22, n. 1, p. 61–68, 20 jan. 2016.

TANG, S. L.; GAO, Y. L.; HU, W. Z. Scutellarin inhibits the metastasis and cisplatin resistance in glioma cells. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 587–598, 2019.

VANCE, K. M. et al. *Artemisia santolinifolia* enhances glutamatergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract. **Neuroscience Letters**, v. 582, p. 115–119, out. 2014.

WALZL, A. et al. The resazurin reduction assay can distinguish cytotoxic from cytostatic compounds in spheroid screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v.

19, n. 7, p. 1047–1059, 2014.

**WETHERWAX, M.** *Plantaginaceae*. In: JEPSON FLORA PROJECT (Ed.). *Jepson eFlora*. Revisão 8, 2020. Disponível em: [https://ucjeps.berkeley.edu/eflora/eflora\\_display.php?tid=220](https://ucjeps.berkeley.edu/eflora/eflora_display.php?tid=220). Acesso em: 22 jan. 2025.

**WORLD FLORA ONLINE.** *World Flora Online*. 2024. Disponível em: <https://www.worldfloraonline.org>. Acesso em: 10 jan. 2025.

WU, W.-H. et al. Benzoxazinoids from *Scoparia dulcis* (sweet broomweed) with antiproliferative activity against the DU-145 human prostate cancer cell line. **Phytochemistry**, v. 83, p. 110–115, 2012.

XIANJUN, F. et al. Momordin Ic induces G0/1 phase arrest and apoptosis in colon cancer cells by suppressing SENP1/c-MYC signaling pathway. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 146, n. 4, p. 249–258, ago. 2021.

XIAO, Y. et al. Progress and application of intelligent nanomedicine in urinary system tumors. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, p. 100964, 2024.

XIE, R. et al. NONO Inhibits Lymphatic Metastasis of Bladder Cancer via Alternative Splicing of SETMAR. **Molecular Therapy**, v. 29, n. 1, p. 291–307, 2021.

XIE, Y. Q. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Streblus indicus*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, n. September, 2023.

YANG, D. et al. Vicenin-2 inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cell line. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 12, p. 1303–1310, maio 2018.

YANG, S.-H. et al. The Novel p53-Dependent Metastatic and Apoptotic Pathway Induced by Vitexin in Human Oral Cancer OC2 Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1154–1161, 13 ago. 2013.

YAO, H. et al. Screening and quantitative analysis of antioxidants in the fruits of *Livistona chinensis* R. Br using HPLC-DAD–ESI/MS coupled with pre-column DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2802–2807, dez. 2012.

YIN, L. et al. Flavonoids analysis and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of crude and purified extracts from *Veronicastrum latifolium*. **Industrial Crops and Products**, v. 137, n. June, p. 652–661, 2019.

ZHANG, W. et al. Sesquiterpenes and Steroids from an Endophytic *Eutypella scoparia*. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 6, p. 1715–1724, 25 jun. 2021.

ZIELIŃSKA-PISKLAK, M. A. et al. Activity-guided isolation, identification and

quantification of biologically active isomeric compounds from folk medicinal plant *Desmodium adscendens* using high performance liquid chromatography with diode array detector, mass spectrometry and multidiment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 54–63, jan. 2015.

ZUBAIR, H. et al. Cancer chemoprevention by phytochemicals: Nature's healing touch. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 1–24, 2017.