

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

KAROLINY SILVA NAGATA

Estudo *in sílico* e *in vitro* da atividade antiproliferativa da hinokinina em célula tumoral de câncer de mama subtipo luminal

Bragança Paulista

2026

KAROLINY SILVA NAGATA – RA:202429618

Estudo *in sílico* e *in vitro* da atividade antiproliferativa da hinokinina em célula tumoral de câncer de mama subtipo luminal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, para obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Giovanna Barbarini Longato

Bragança Paulista

2026

WP 870 Nagata, Karoliny Silva
N141e Estudo *in silico* e *in vitro* da atividade antiproliferativa da hinokinina em célula tumoral de câncer de mama subtipo luminal / Karoliny Silva Nagata. -- Bragança Paulista, 2026
47 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Giovanna Barbarini Longato

1. Câncer de mama. 2. Produto natural. 3. Receptores de estrógeno. 4. Hinokininas. 5. Apoptose. I. Longato, Giovanna Barbarini. II. Título.



Educando
para a paz

NAGATA, Karoliny Silva. "Estudo *in silico* e *in vitro* da atividade antiproliferativa da hinokinina em célula tumoral de câncer de mama subtipo luminal". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 26 de fevereiro de 2026 pela Banca examinadora constituída pelos(as) professores(as):

Prof(a). Dr(a). Giovanna Barbarini Longato
Orientador(a) e Presidente
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Lucas Miguel de Carvalho
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Tales Alexandre Costa e Silva
Universidade Federal do ABC

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a DEUS. Sem a fé, eu não estaria aqui; é ela que me sustentou e me sustenta em todos os momentos e trajetórias, guiando-me e amparando-me. Aos meus pais, pelo dom do nascimento e por permitirem que eu esteja aqui, em constante aprendizado.

Aos meus familiares maternos e paternos, pelo amor, carinho e atenção que sempre me dedicaram.

À minha orientadora, Giovanna, pelo apoio, compreensão e aconselhamento assertivo, que tanto contribuíram na minha trajetória acadêmica.

Agradeço ao Dr. Edgard Antônio Ferreira, químico e professor da Universidade Mackenzie pela contribuição material e parceria junto ao laboratório de produtos naturais da Universidade São Francisco.

Agradeço a Prefeitura de Bragança Paulista e ao programa de bolsa COAPES, pela oportunidade e pelo auxílio concedido durante meu mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

À secretária do programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Andrea, pela disponibilidade e orientações.

Aos meus pacientes, que me acolhem com carinho e torcem pelo meu sucesso profissional.

Aos meus colegas de laboratório, que compartilham seus conhecimentos práticos e teóricos e me apoiaram nos momentos difíceis. Agradeço, em especial, à Dina, pela paciência e compreensão; desejo muito sucesso em sua jornada como pesquisadora.

Agradeço, enfim, a todos que colaboraram de forma positiva para o alcance deste grande objetivo para a minha realização profissional e pessoal.

Declaro que ferramentas de inteligência artificial foram utilizadas exclusivamente para apoio linguístico e revisão gramatical, sob supervisão e edição integral da autora.

*"Nada na vida deve ser temido,
apenas compreendido.
Agora é a hora de compreender mais,
para que possamos temer menos."
Marie Curie*

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum no mundo e sua variante luminal representa cerca de 70% dos casos. Caracterizado pela expressão de receptores hormonais, o subtipo luminal possui melhor prognóstico comparado a outras variantes, embora apresente desafios terapêuticos significativos. Considerando que 60% dos quimioterápicos advêm dos produtos naturais, este estudo propôs investigar a atividade antiproliferativa da hinokinina, uma lignana dibenzilbutirolactônica isolada da planta aquática *Hydrocotyle leucocephala* (acariçoba da miúda ou erva capitão), de forma isolada e em associação ao quimioterápico docetaxel, utilizado na clínica para o tratamento deste subtipo de câncer de mama. Esta lignana apresenta propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral, porém a literatura carece de dados acerca de sua atividade citotóxica em cultura tridimensional de câncer de mama subtipo luminal, bem como de sua ação em associação a quimioterápicos. Com o objetivo de caracterizar suas propriedades físico-químicas, foram inicialmente realizadas análises *in silico*, as quais demonstraram afinidade da hinokinina pelos receptores de estrogênio alfa e beta, além de evidenciar que a molécula está em conformidade com os critérios de Lipinski, sugerindo potencial para uso como fármaco oral. A hinokinina apresentou perfil favorável de *druglikeness*, atendendo às regras de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge, com pontuação de biodisponibilidade de 0,55, capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, ausência de interação como substrato da P-glicoproteína (P-gp) e potencial inibitório sobre as principais isoformas do citocromo P450. O ensaio de citotoxicidade apontou que, na linhagem não tumoral HaCaT, a associação da hinokinina com o docetaxel promoveu aumento do IC₅₀ do docetaxel de 1,8 para 3,36 µM, indicando que a hinokinina reduziu a citotoxicidade do docetaxel e que a combinação não apresentou efeito citotóxico significativo em células não tumorais. Ensaio *in vitro* realizados em cultivo tridimensional de células MCF-7 mostraram que o tratamento com hinokinina (25 µM) promoveu redução significativa da viabilidade celular (56%), sendo superior ao Docetaxel (42%). No ensaio de formação de colônias, a hinokinina na concentração de 25 µM combinada ao Docetaxel diminuiu acentuadamente a capacidade proliferativa celular, sendo observada uma redução de 70% no número de colônias. Complementarmente, a análise de morte celular por citometria de fluxo indicou que o tratamento combinado reduziu a viabilidade celular em mais de 30% e promoveu aumento de células em estágio inicial de apoptose (>20%), sugerindo efeito sinérgico entre o composto e o quimioterápico. A pesquisa buscou elucidar os mecanismos de ação da hinokinina, incluindo seu efeito antiestrogênico e seu papel no ciclo celular. Os resultados obtidos até o momento apontam a hinokinina como uma candidata promissora para o tratamento coadjuvante do câncer de mama luminal, especialmente em associação com fármaco docetaxel já utilizado na prática clínica.

Palavras-chave: Câncer de mama. Receptores de Estrógeno. Produto Natural. Hinokinina. Apoptose.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common malignancy worldwide, and its luminal variant accounts for approximately 70% of cases. Characterized by the expression of hormone receptors, the luminal subtype carries a better prognosis compared to other variants, although it presents significant therapeutic challenges. Considering that 60% of chemotherapeutic agents are derived from natural products, this study investigated the antiproliferative activity of hinokinin, a dibenzylbutyrolactone lignan isolated from the aquatic plant *Hydrocotyle leucocephala* (commonly known as *acariçoba da miúda* or *erva capitão*). The compound was evaluated both as a monotherapy and in association with docetaxel, a chemotherapeutic agent clinically used to treat this breast cancer subtype. Although this lignan exhibits anti-inflammatory, antimicrobial, and antitumor properties, the literature lacks data regarding its cytotoxic activity in three-dimensional (3D) luminal breast cancer cultures, as well as its action in combination with chemotherapeutics. To characterize its physicochemical properties, *in silico* analyses were initially performed, demonstrating hinokinin's affinity for estrogen receptors alpha and beta. Furthermore, the molecule complies with Lipinski's criteria, suggesting potential for use as an oral drug. Hinokinin displayed a favorable druglikeness profile—meeting the rules of Lipinski, Ghose, Veber, Egan, and Muegge—with a bioavailability score of 0.55, the ability to cross the blood-brain barrier, absence of interaction as a P-glycoprotein (P-gp) substrate, and inhibitory potential regarding the main cytochrome P450 isoforms. Cytotoxicity assays on the non-tumor cell line HaCaT showed that the association of hinokinin with docetaxel increased the docetaxel IC₅₀ from 1.8 to 3.36 μM , indicating that hinokinin reduced the cytotoxicity of docetaxel and that the combination did not present a significant cytotoxic effect on non-tumor cells. *In vitro* assays performed in 3D MCF-7 cell cultures showed that treatment with hinokinin 25 μM promoted a significant reduction in cell viability (56%), proving superior to docetaxel alone (42%). In the colony formation assay, hinokinin at a concentration of 25 μM combined with docetaxel markedly decreased cell proliferative capacity, with a 70% reduction in the number of colonies observed. Complementarily, cell death analysis by flow cytometry indicated that the combined treatment reduced cell viability by over 30% and promoted an increase in cells in the early stage of apoptosis (>20%), suggesting a synergistic effect between the compound and the chemotherapeutic agent. The research sought to elucidate the mechanisms of action of hinokinin, including its anti-estrogenic effect and its role in the cell cycle. The results obtained thus far point to hinokinin as a promising candidate for the adjuvant treatment of luminal breast cancer, especially in association with the drug docetaxel already used in clinical practice.

Keywords: *Breast Cancer. Estrogen Receptors. Natural Product. Hinokinin. Apoptosis.*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

AcOEt- Acetato de etila

ATP- Adenosina trifosfato

CCDA -cromatografia em camada delgada analítica

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

CO₂- Dióxido de carbono.

CYP3A4 / CYP3A5- Isoenzimas do sistema Citocromo P450 responsáveis pelo metabolismo de fármacos

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido desoxirribonucleico.

DP – Desvio Padrão

EDTA 0,02% - Ácido etilenodiamino tetracético.

ENL- Enterolactona, lignana produzida pela microbiota intestinal a partir de precursores dietéticos.

ER α / ER β : Receptores de estrógeno tipo alfa e tipo beta.

ER+ - Receptor de Estrogênio Positivo.

Fase G2 / Fase M- Etapas específicas do ciclo celular (intervalo pós-síntese de DNA e mitose).

HaCaT- Linhagem celular de queratinócitos humanos não tumorais

HER2- Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)

IC₅₀ – Concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% da viabilidade celular

INCA- Instituto Nacional do Câncer

MAT- Matairesinol, lignana precursora da enterolactona

MCF-7 - linhagem celular de câncer de mama subtipo luminal, receptor hormonal positivo.

MDA-MB-231-câncer de mama triplo-negativo.

MeOH:H₂O (1:9)- Metanol.

MTT- ensaio colorimétrico para medir atividade metabólica celular.

OMS- Organização Mundial da Saúde

P-gp- P-glicoproteína, transportador de efluxo de membrana associado à resistência a múltiplos fármacos

PDB- *Protein Data Bank*, banco de dados internacional de estruturas tridimensionais de proteínas e ácidos nucleicos

PSA - *Polar surface área* - área de superfície polar - parâmetro utilizado na avaliação de permeabilidade celular de fármacos.

RMN- Ressonância Magnética Nuclear.

ROS- Espécies reativas de oxigênio.

RPMI- Meio de cultura celular.

SECO- Secoisolariciresinol, tipo de lignana vegetal

SFB- Soro fetal bovino.

SISGEN- Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.

2D / 3D- Modelo de cultura celular em monocamada (bidimensional); Modelo de cultura celular em esferoides (tridimensional).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de Câncer mais incidentes estimados para o ano de 2026 por sexo, exceto pele não melanoma.....	14
FIGURA 2. Local de coleta da espécie <i>Hydrocotyle leucocephala</i> Fonte: imagem cedida por Prof. Dr. Edgard Antônio Ferreira.....	18
FIGURA 3. Fotomicrografia do esferoide demonstrando as três zonas tridimensionais formadas.....	19
FIGURA 4. A) Estrutura molecular química da hinokinina; B) Folhas da macrófita aquática <i>Hydrocotyle leucocephala</i>	22
FIGURA 5. Desenho experimental de ensaios <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> do estudo.....	25
FIGURA 6. Docagem molecular em receptor de estrógeno.....	29
FIGURA 7. Percentual de viabilidade celular das linhagens MCF-7 (A e C) e HaCaT (B e D) tratadas com hinokinina (A e B) e com Docetaxel isolado (B e D) e em associação com Hinokinina (25 µM ou 50 µM), avaliada pelo ensaio de MTT.....	33
FIGURA 8. Fotomicrografia dos esferoides nos tempos 0 e 48 horas após tratamento com o controle negativo (DMSO), composto hinokinina a 20 µM e Docetaxel a 12,5 nM.....	34
FIGURA 9. Percentual de células viáveis após 48 horas de tratamento.....	35
FIGURA 10. Fotografias das colônias de células MCF-7 formadas a partir da coloração com cristal violeta.....	36
FIGURA 11. Número de colônias formadas após 21 dias de tratamento.....	37
FIGURA 12. Percentual de células viáveis, em apoptose nos diferentes estágios (inicial/tardio) e de debris celulares marcados após 48 horas de tratamento com hinokinina na concentração de 25 µM de forma isolada e associada ao quimioterápico Docetaxel (12,5 µM). DMSO: controle negativo.....	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Subtipos do câncer de mama.....	15
TABELA 2. Valores de energia de ligação, resíduos de interação entre a Hinokinina e os receptores de estrógeno α (ER α) e β (ER β), bem como as respectivas distâncias de ligação, obtidos por ensaio de docking molecular <i>in silico</i>	30
TABELA 3. Resultado da predição <i>in silico</i> sobre os parâmetros farmacológicos determinados por Lipinski para a biodisponibilidade oral de moléculas candidatas a fármaco.....	31
TABELA 4. Perfil de druglikeness da molécula hinokinina.....	32
TABELA 5. Valores de IC50 obtidos para as amostras nas linhagens MCF7 e HaCaT.....	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA	14
1.2 TRATAMENTO	16
1.3 PRODUTOS NATURAIS	16
1.4 HINOKININA	17

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AQUISIÇÃO DA MOLECULA HINOKININA	20
3.2 ENSAIO IN SÍLICO (DOCKING MOLECULAR)	22
3.3 ENSAIO IN-SILICO PARA INVESTIGAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	23
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL	24
3.5 CULTIVO CELULAR	25
3.6 CITOTOXICIDADE IN VITRO	25
3.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	26
3.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	27
3.9 ENSAIO DE MORTE CELULAR/APOPTOSE	28
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28

4. RESULTADOS

4.1 ENSAIO IN SÍLICO (DOCKING MOLECULAR)	29
4.2 ENSAIO IN-SILICO PARA INVESTIGAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS	30
4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	32
4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	34

4.5 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	35
4.6 ENSAIO DE MORTE CELULAR/APOPTOSE	37
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1.INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama representa o segundo tipo de neoplasia maligna mais prevalente no mundo, totalizando aproximadamente 2,3 milhões de novos casos em 2022. Trata-se de uma das principais causas de mortalidade feminina, com maior impacto em países de baixa renda, onde o acesso a diagnósticos precoce e terapêuticos é limitado (WHO, 2025).

No contexto brasileiro, estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) projetam a ocorrência de cerca de 781 mil novos casos de câncer por ano no triênio 2026–2028 (Figura 1). Entre as mulheres, o câncer de mama é o mais incidente, quando desconsiderado o cancer de pele não melanoma, com uma estimativa de 78.610 novos casos. (INCA, 2026).

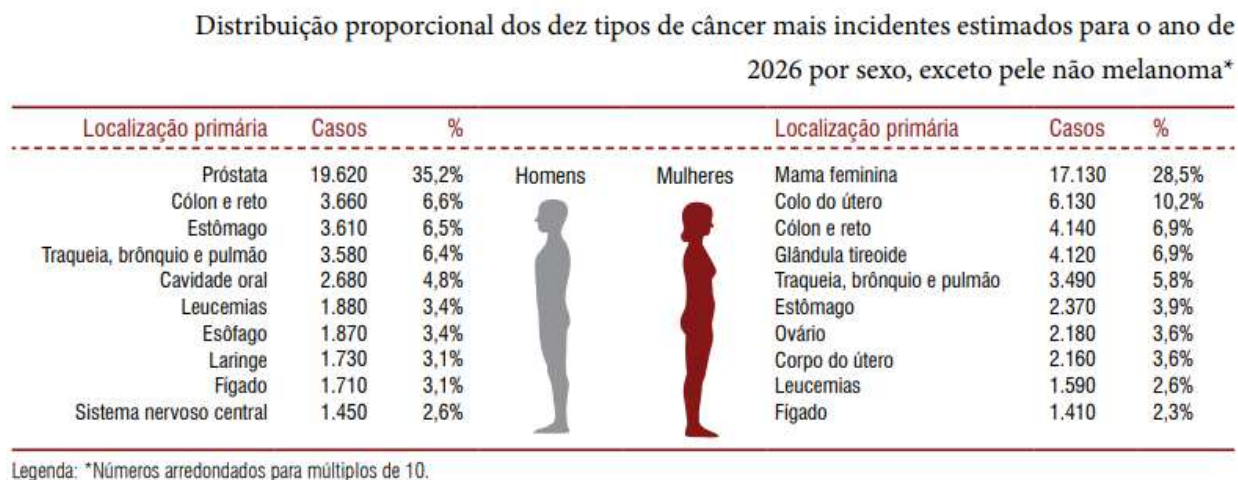


FIGURA 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de Câncer mais incidentes estimados para o ano de 2026 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea que pode ser categorizada com base na presença de determinados marcadores moleculares expressos pelas células tumorais, especialmente receptores hormonais e proteínas específicas. Essa classificação é essencial para guiar o diagnóstico, prognóstico e a escolha do tratamento mais adequado para cada paciente, sendo dividida em três subtipos principais: luminal (A e B), triplo-negativo e HER2-positivo (Tabela 1).

O subtipo HER2-positivo destaca-se pela superexpressão da proteína conhecida como

receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês Human Epidermal Growth Factor Receptor 2). A presença elevada dessa proteína na superfície das células cancerígenas está diretamente associada a uma maior velocidade de multiplicação celular e a um comportamento mais agressivo do tumor. Entretanto, esse perfil agressivo é contrabalançado pela sensibilidade a tratamentos específicos que têm como alvo essa via de sinalização. Um exemplo é o uso do trastuzumabe, um anticorpo monoclonal que age inibindo seletivamente a atividade do HER2, contribuindo para o controle do crescimento tumoral e a melhora do prognóstico dos pacientes (BIANCHINI & GIANNI, 2014). Essas terapias-alvo têm se mostrado eficazes em reduzir as taxas de progressão da doença e aumentar a sobrevida, representando um avanço significativo no manejo do câncer de mama HER2-positivo.

O subtipo triplo-negativo é definido pela ausência de expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2. Esse perfil molecular está relacionado a elevada agressividade tumoral, maior taxa de recorrência e pior prognóstico. A ausência de alvos terapêuticos específicos restringe as opções de tratamento, tornando a quimioterapia a principal abordagem disponível (LI et al., 2022).

Por sua vez, o subtipo luminal caracteriza-se pela expressão de receptores hormonais (receptor de estrogênio e/ou receptor de progesterona) e ausência de superexpressão de HER2, sendo o subtipo mais prevalente e correspondendo a aproximadamente 70% de todos os casos de câncer de mama (SUN et al., 2017). Em geral, o câncer de mama luminal está associado a melhor prognóstico em comparação aos subtipos HER2-positivo e triplo-negativo. Contudo, a evolução clínica e a resposta terapêutica variam de forma significativa, dependendo de fatores como grau histológico, perfil genético, carga mutacional e sensibilidade à terapia endócrina (CARVALHO et al., 2025)

TABELA 1. Subtipos do câncer de mama.

SUBTIPOS	PREVALÊNCIA	Ki-67	RECEPTOR HORMONAL	HER2
LUMINAL A	60%	<14%	+	HER2
LUMINAL B	10 a 20%	>14%	+	-
HER2+	15 a 20%	-	Independente de Receptor	Superexpressão
TRIPLO NEGATIVO	20%	-		

1.2 Tratamento

As opções terapêuticas para o câncer de mama variam conforme o tamanho do tumor e o quadro clínico do paciente. Os tratamentos mais utilizados incluem quimioterapia (adjuvante e neoadjuvante), terapia endócrina, radioterapia e cirurgia, que pode envolver mastectomia ou quadrantectomia, com o objetivo de ressecar o tumor ou a mama, dependendo do estágio da doença (WANG & WU, 2023).

No subtipo luminal, a técnica terapêutica mais empregada é a terapia hormonal, que bloqueia os efeitos do estrogênio nas células tumorais. Os agentes quimioterápicos utilizados nesse contexto dividem-se em três categorias principais: bloqueadores dos receptores de estrogênio, como tamoxifeno, toremifeno e fulvestranto, que atuam diretamente nos receptores hormonais, impedindo o crescimento tumoral; inibidores de aromatase, como anastrozol, letrozol e exemestano, responsáveis por reduzir a síntese de estrogênio e controlar o tumor (KIM & LUKONG, 2025) e terapias combinadas a bloqueadores hormonais, indicadas em casos de metástase, como abemaciclib, palbociclib, ribociclib, everolimus e docetaxel, visando potencializar o efeito antitumoral e inibir a progressão da doença (TONG et al., 2024).

Os agentes quimioterápicos interferem na migração e replicação das células cancerígenas, além de afetar a progressão do ciclo celular e ativar mecanismos de morte celular programada, como a apoptose (SUN et al., 2021). Entretanto, os efeitos adversos associados a essas terapias representam um entrave significativo ao tratamento, podendo incluir ondas de calor, corrimento vaginal, fadiga extrema, náuseas, alterações de humor, disfunção sexual e complicações mais graves a longo prazo, como doenças cardíacas, catarata e resistência ao tratamento hormonal (RADEMAKER et al., 2025). Esses desafios evidenciam a necessidade de pesquisas contínuas para identificar biomarcadores que prevejam a resposta terapêutica e orientar estratégias personalizadas.

1.3 Produtos naturais

Diante da alta incidência do câncer de mama e dos efeitos adversos dos tratamentos convencionais, cresce o interesse por extratos e compostos oriundos de fontes naturais, como coadjuvantes no combate à doença. Estudos de Newman e Cragg destacam o potencial anticancerígeno destes produtos, que podem inibir o crescimento tumoral e induzir apoptose em células neoplásicas, além de também contribuir para o mecanismo de reversão da resistência as terapias hormonais em tumores do subtipo luminal, desenvolvendo uma maior gama de opções

terapêuticas para o uso clínico (CRAGG & NEWMAN, 2005; NEWMAN & CRAGG 2020).

Na literatura há diversos estudos que mostram que as lignanas têm um importante papel protetor contra o câncer de mama. Esses compostos são metabolizados pela microbiota intestinal em enterolactona e enterodiol, conhecidos como lignanas mamíferas, que apresentam atividade de fitoestrogênios. Por possuírem estrutura química semelhante ao estrogênio, conseguem interagir com os receptores de estrogênio, modulando sua atividade e competindo com o hormônio endógeno, o que pode reduzir estímulos proliferativos em tecidos sensíveis a hormônios e também apresenta um efeito modulador hormonal exibindo propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, capazes de reduzir danos ao DNA, controlar o estresse oxidativo e interferir em vias de sinalização associadas à proliferação celular, apoptose e angiogênese tumoral. Estudos epidemiológicos indicam que um maior consumo de lignanas está associado a menor risco de desenvolver câncer de mama, principalmente em mulheres na pós-menopausa e em tumores receptores de estrogênio positivos. Em pacientes já diagnosticadas, há indícios de que o consumo regular de lignanas possa contribuir para um melhor prognóstico, reduzindo taxas de recorrência e influenciando favoravelmente marcadores tumorais. Esses efeitos combinados sugerem que a inclusão de fontes ricas em lignanas na dieta pode ser uma estratégia complementar promissora tanto na prevenção quanto no manejo do câncer de mama (DE SILVA; ALCORN, 2019; LIU et al., 2021).

1.4 Hinokinina

Neste contexto, nossa pesquisa visou investigar a atividade antiproliferativa de novos candidatos a fármacos derivados de produtos naturais, com destaque para a hinokinina — uma lignana de diterpenolactona originalmente isolada da espécie arbórea japonesa *Chamaecyparis obtusa* (cipreste hinoki), da família Cupressaceae (MARCOTULLIO et al., 2014). O óleo essencial extraído da madeira é rico em cadineno, com aroma amadeirado e herbáceo, e foi estudado inicialmente por Yoshiki e Ishiguro em 1933 (YOSHIKI, ISHIGURO, 1933).

Além da fonte original, a hinokinina pode ser obtida a partir da síntese parcial da cubenina (semente de *Piper cubeba*) e da macrófita aquática *Hydrocotyle leucocephala* também conhecida como acariçoba miúda (Figura 2), planta com ampla distribuição no Brasil e utilizada na medicina popular para tratamentos dermatológicos e reumáticos (FLORENTINO et al., 2013). Esta espécie também possui valor econômico, sendo usada como planta ornamental para aquários e em práticas tradicionais na Colômbia como diurética, anti-helmíntica e antidiarreica (RAMOS et al., 2006).



FIGURA 2. Local de coleta da espécie *Hydrocotyle leucocephala* Fonte: imagem cedida por Prof. Dr. Edgard Antônio Ferreira

Estudos recentes evidenciam as propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais da hinokinina, bem como seus efeitos neuroprotetores e ausência de genotoxicidade, fortalecendo seu potencial como candidato a fármaco em terapias oncológicas (MEDOLA et al., 2007; SILVA et al., 2007; ESPERANDIM et al., 2013; LIMA et al., 2016; ARRUDA et al., 2018; LONE et al., 2025). Estudos conduzidos por Cunha et al. (2016) demonstraram que a hinokinina apresentou efeito citotóxico em linhagens de adenocarcinoma mamário do subtipo luminal (MCF-7), com concentração inibitória significativa de $13,8 \mu\text{M}$ no modelo de cultivo celular em monocamada. É importante ressaltar que a Hinokinina demonstrou seletividade citotóxica, uma vez que não apresentou efeitos tóxicos sobre células mamárias não tumorais (MCF-10A).

Considerando o potencial farmacológico da hinokinina e sua seletividade para células tumorais do subtipo luminal, este estudo objetiva investigar sua atividade antiproliferativa em modelos tridimensionais de cultivo celular, os quais reproduzem de maneira mais fiel o microambiente tumoral *in vivo*. Diferentemente dos modelos bidimensionais, os modelos tridimensionais formam esferoides que apresentam três zonas distintas: uma zona proliferativa periférica, onde as células possuem acesso adequado a oxigênio e nutrientes; uma zona intermediária, caracterizada por células em estado de quiescência devido a gradientes reduzidos de oxigênio e nutrientes; e uma zona central hipóxica e necrosada, resultante da limitação do fornecimento desses elementos essenciais (Figura 3). Essa organização espacial reproduz as condições fisiopatológicas do tumor, permitindo uma avaliação mais realista da resposta celular

a agentes terapêuticos (DINI et al., 2016).

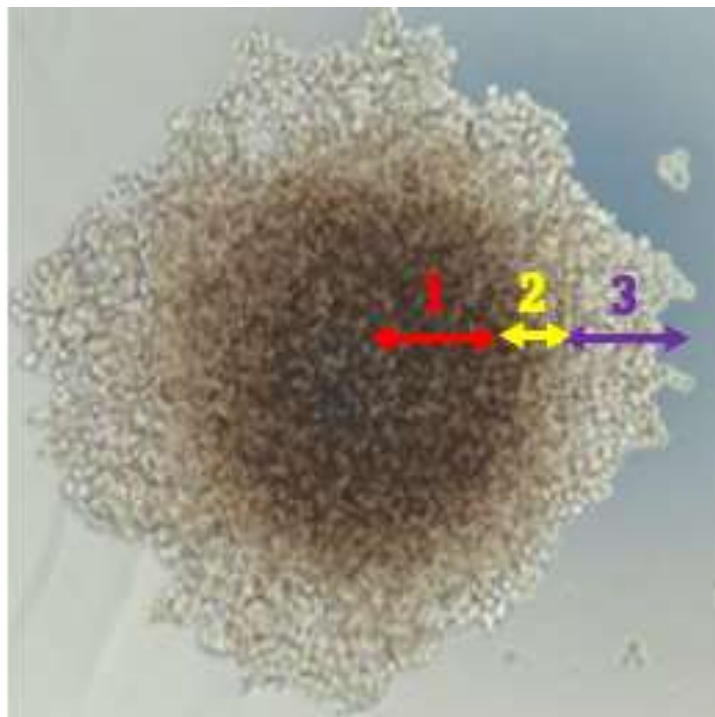


FIGURA 3. Fotomicrografia do esferoide demonstrando as três zonas tridimensionais formadas: 1. Zona necrótica; 2. Zona quiescente e 3. Zona proliferativa. Fonte: Próprio autor

Pretendeu-se, também, avaliar a ação sinérgica da hinokinina quando associada ao quimioterápico docetaxel, com o intuito de atenuar efeitos adversos e potencializar a eficácia antitumoral. O docetaxel exerce seu efeito citotóxico ao se ligar com alta afinidade às tubulinas das células tumorais, bloqueando a mitose e, conseqüentemente, o crescimento neoplásico. Complementarmente, análises *in silico* foram conduzidas para predizer potenciais interações da hinokinina com os receptores de estrogênio, bem como para caracterizar suas propriedades físico-químicas, informações cruciais para o desenvolvimento e otimização farmacêutica do composto.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antiproliferativa da hinokinina, de forma isolada e em associação ao quimioterápico docetaxel, em célula tumoral de câncer de mama subtipo luminal MCF-7.

2.2 Objetivos específicos

Predizer a interação da hinokinina com os receptores de estrógeno;

Predizer os parâmetros físico-químicos desta molécula;

Avaliar o efeito antiproliferativo da hinokinina em linhagem celular tumoral de mama subtipo luminal;

Investigar a ação da hinokinina em associação ao quimioterápico Docetaxel;

Investigar a ação da molécula no mecanismo de morte celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aquisição da molécula hinokinina

A hinokinina (Figura 4a) foi isolada das folhas da espécie vegetal *Hydrocotyle leucocephala* Cham. & Schltl. (Figura 4b) e cedida pelo Prof. Dr. Edgard Antonio Ferreira, da Universidade Presbiteriana Mackenzie, conforme o procedimento descrito a seguir.

A espécie foi obtida a partir de um produtor de plantas ornamentais localizado na cidade de Suzano/SP em abril de 2016. A espécie foi identificada pelas Dra. Oriana A. Favero e Dra. Fátima O. S. Buturi e recebeu o código de registro A80D78F no sistema SISGEN. Uma exsiccata foi depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo com código (E.A. Ferreira - 003). As folhas foram secas em estufa com ventilação a 40 °C por 24 horas. Em seguida, foram submetidas ao processo de maceração com metanol (MeOH) (Synth, São Paulo, Brasil) para obtenção do extrato metanólico, cujo solvente foi removido por destilação rotatória sob pressão reduzida, resultando no extrato seco. Este extrato foi então ressuspendido em uma solução de MeOH:H₂O (1:9) e submetido a extração líquido-líquido em ordem crescente de polaridade, iniciando com acetato de etila (AcOEt) e posteriormente metanol, originando os extratos secos após a remoção dos respectivos solventes.

A partir da análise dos extratos por RMN de ¹H, foi possível identificar, no extrato em AcOEt, sinais na região correspondente a hidrogênios de anel aromático (δ 6,50–8,00 ppm), além de sinais próximos a δ 5,90 ppm, sugerindo a presença de um grupo metilenodioxila. Dessa forma, essa fração foi selecionada para os procedimentos de fracionamento cromatográfico, iniciando com colunas cromatográficas de sílica gel GF254 (Merck, Alemanha), acompanhadas por monitoramento por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), e finalizando com purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semipreparativa. A determinação estrutural da hinokinina foi baseada nos dados obtidos pelas análises de RMN de ¹H e ¹³C, além do espectro de massas por ionização com elétrons.

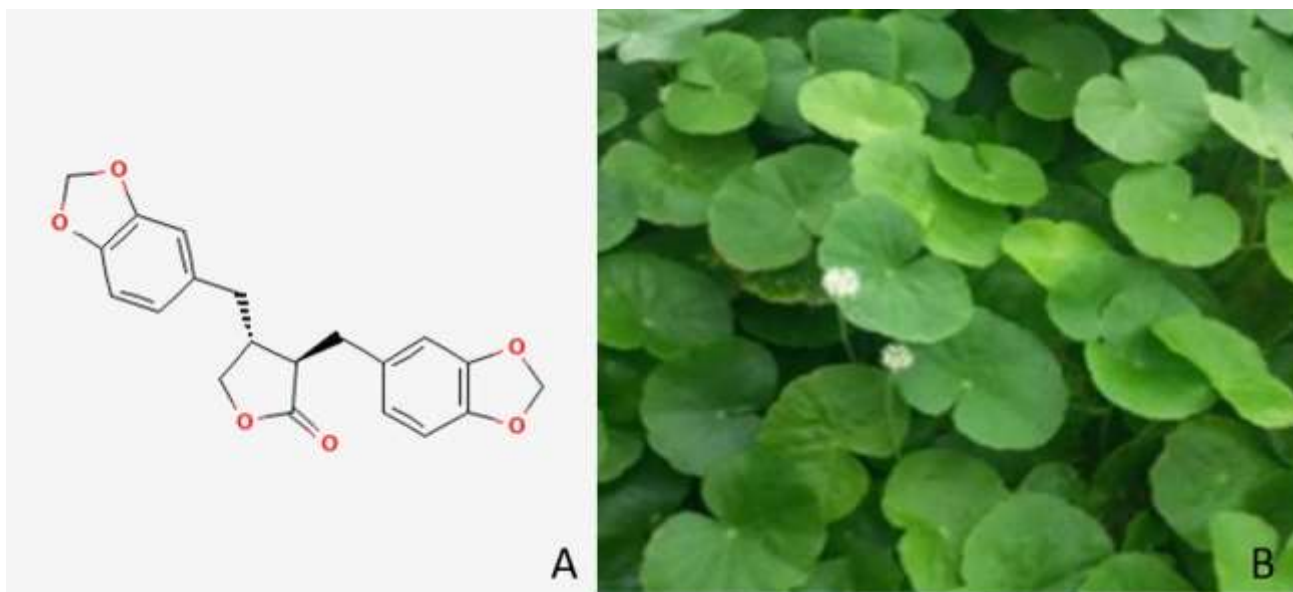


FIGURA 4. A) Estrutura molecular química da hinokinina. Fonte: Pubchem; B) Folhas da macrófita aquática *Hydrocotyle leucocephala* Fonte: imagem cedida pelo prof. Dr. Edgard Antonio Ferreira

3.2 Ensaio *in silico* (docking molecular)

Este ensaio foi utilizado para avaliar, através de ferramenta computacional, a capacidade da lignana hinokinina em se ligar nos receptores de estrógeno alfa (ER α) e beta (ER β).

O estradiol é um endógeno padrão (controle positivo), permitindo assim comparar a afinidade e a estabilidade das interações da hinokinina com os sítios ativos desses receptores em relação ao mesmo, visto que a linhagem celular utilizada neste estudo é a MCF-7, sendo esta caracterizada pela superexpressão de receptores de estrógeno, responsável pelo crescimento tumoral altamente dependente do estímulo estrogênico. Assim, o docking buscou prever se a hinokinina possui potencial para interagir com esses mesmos alvos moleculares, possivelmente competindo com o estradiol ou modulando sua via de sinalização.

O ensaio *in silico* foi realizado em parceria com a Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani, do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade São Francisco, conforme descrito por Mass et al (2025).

O desenho da molécula foi realizado através do programa OPENBABEL, enquanto a seleção das proteínas foi feita pelo Protein Data Bank (PDB). A análise do docking deu-se pela ferramenta SwissDock, baseado no software EADock DSS (disponível em <http://www.swissdock.ch/>). A ligação foi considerada estável quando os valores de ligação de energia livre foram menores que -7 kcal/mol.

3.3 Ensaio *in silico* para investigação dos parâmetros físico-químicos da molécula

A utilização de ferramentas computacionais na etapa inicial do desenvolvimento de fármacos é de suma importância, pois permite a triagem de moléculas com maior potencial terapêutico, otimizando o tempo e os recursos laboratoriais, além de reduzir a necessidade de modelos animais na fase de triagem (WANG; WU, 2023). Neste estudo, a análise *in silico* é crucial para validar se a hinokinina, além de sua atividade biológica observada *in vitro*, possui características químicas que permitiriam sua futura aplicação como um quimioterápico viável para administração oral.

A predição dos parâmetros físico-químicos e do perfil de *druglikeness* foi realizada com base na estrutura molecular da hinokinina utilizando a plataforma SwissADME. Esta ferramenta é amplamente reconhecida na literatura atual por permitir uma triagem virtual robusta, integrando modelos matemáticos que preveem a farmacocinética e a drugabilidade de novos compostos (DAINA et al., 2017). Os resultados foram comparados com a 'Regra dos Cinco' de Lipinski, que define propriedades moleculares essenciais para o potencial de fármacos orais, como peso molecular, lipofilicidade e capacidade de formar pontes de hidrogênio (LIPINSKI et al., 2001). Complementarmente, a análise de biodisponibilidade e as interações com enzimas metabólicas foram fundamentadas em estudos recentes que validam o uso de métodos computacionais para acelerar a descoberta de quimioterápicos de origem natural (WANG; WU, 2023; TONG et al., 2024).

Para ampliar o rigor da análise e garantir a robustez dos dados preditivos, foram aplicados filtros complementares: Ghose, que avalia o volume molar e a refração; Veber, que correlaciona a flexibilidade molecular (número de ligações rotativas) e a área de superfície polar (TPSA) com a permeabilidade celular; e os modelos de Egan e Muegge, fundamentais para prever a absorção intestinal e a adequação farmacológica estrutural. A integração desses múltiplos filtros permite uma ampla avaliação da hinokinina, relacionando sua estrutura química com a capacidade de transpor barreiras biológicas e alcançar o sítio tumoral em concentrações eficazes.

3.4 Desenho experimental

O estudo guiou por base duas principais etapas, sendo elas estudo *in silico* e *in vitro*; Para o estudo *in silico* realizado a predição farmacológica da molécula Hinokinina, após seguido com etapa biológica experimental, *in vitro*, usadas nesse caso células de Câncer de mama MCF-7.

Inicialmente, a hinokinina foi submetida a análise de Docking Molecular para investigar sua afinidade de ligação aos receptores de estrogênio, sendo estes alvos cruciais na progressão de tumores mamários. Paralelamente, determinou-se o perfil de *druglikeness* do composto, aplicando-se os parâmetros da Regra de Lipinski e outros indicadores farmacocinéticos essenciais. Esse conjunto de dados permitiu a avaliação prévia do potencial farmacológico da molécula, fundamentando assim a transição para os ensaios biológicos.

Para os ensaios *in vitro*, optou-se pelo sistema de cultivo tridimensional (3D) da linhagem MCF-7, buscando-se uma representação mais fidedigna se comparada ao princípio da patologia em meio humano.

A determinação da citotoxicidade da hinokinina isolada foi realizada por meio de uma curva dose-resposta, com concentrações de 10, 20 e 40 μM , selecionadas a partir de dados prévios da literatura. A análise estatística desses ensaios permitiu definir a Concentração Inibitória Mínima, ou seja IC₅₀ em 25 μM .

Foram realizados ensaios de associação entre a hinokinina e o quimioterápico Docetaxel;

Com base na literatura prévia fixado dose de Docetaxel em 12,5 μM , enquanto a hinokinina foi testada em duas variações baseadas no valor de seu IC₅₀ previamente estabelecido.

Por fim, os efeitos decorrentes dessa associação foram mensurados através de biomarcadores de viabilidade celular, capacidade de formação de colônias e caracterização do perfil de morte celular/apoptose.

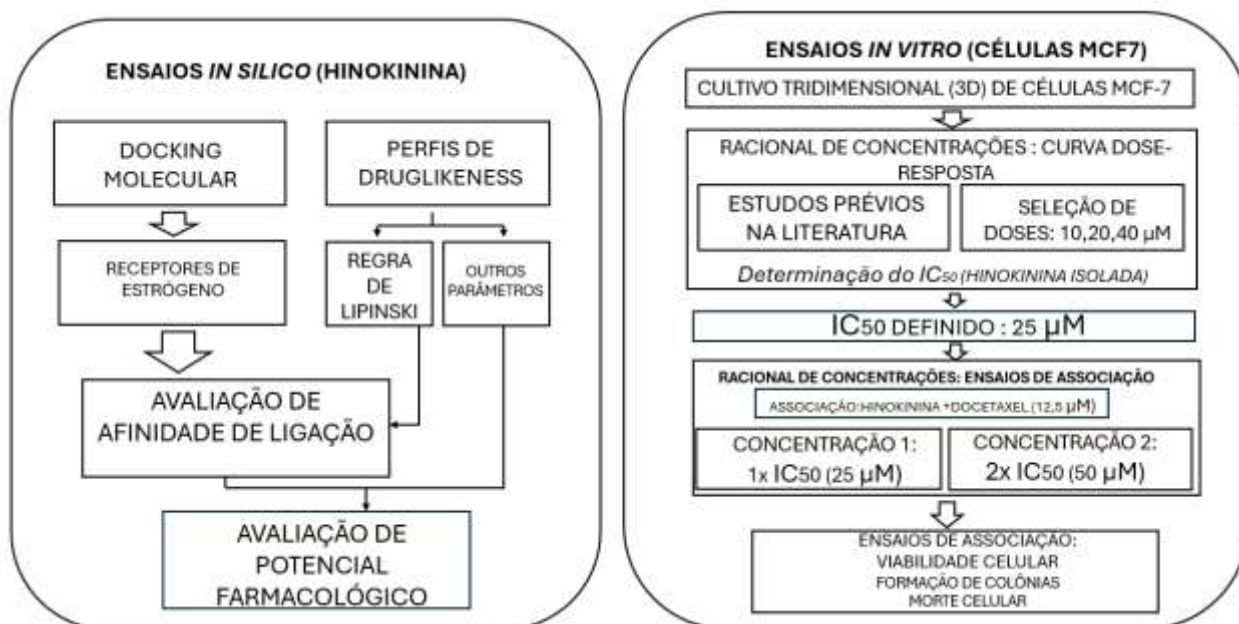


FIGURA 5. Desenho experimental de ensaios *in silico* e *in vitro* do estudo. Fonte: Próprio autor gerada pelo Gemini.

3.5 Cultivo celular

Para expandir a quantidade de células da linhagem MCF7, estas foram cultivadas em frascos de 75cm² (T75, Corning, EUA) em meio de cultura RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific), EUA contendo 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (100 unidades/mL / 100 $\mu\text{g/mL}$ Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA), e um volume de 1×10^6 cels/mL foi congelado em criotubos (Corning, EUA) a -80°C. As células foram descongeladas quando tornou-se necessário renová-las ou para obter passagens adequadas para os experimentos (4-9ª passagem). A suspensão foi transferida para frascos de manutenção de 25 cm² (T25) e incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

3.6 Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do ensaio colorimétrico de MTT, o qual se baseia na atividade enzimática mitocondrial das células viáveis. Células da linhagem não tumoral (HaCat) e tumoral (MCF7) foram utilizadas para a determinação da viabilidade celular quando associado ao quimioterápico Docetaxel.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 100 μ L de suspensão celular por poço, e incubadas por 24 horas a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após o período de adesão, as amostras foram tratadas com diferentes concentrações de Hinokinina (25–50 μ M; 100 μ L/poço), preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1 g/mL, em triplicata. Como controle positivo, foi empregada uma curva de concentração do quimioterápico Docetaxel (0,38–24,7 μ M; 100 μ L/poço), também em triplicata.

Vale ressaltar que nos ensaios utilizou-se DMSO à 1% como meio de controle. A escolha desta concentração fundamenta-se na necessidade de garantir a estabilidade e solubilidade dos compostos lipofílicos no meio de cultura, sem comprometer a integridade celular. A utilização do controle de DMSO a 1% é essencial para isolar qualquer efeito basal do solvente, uma vez que estudos recentes demonstram que a linhagem MCF-7 apresenta uma sensibilidade dose-dependente superior a outras linhagens tumorais, podendo apresentar redução de viabilidade em concentrações a partir de 1% (SUHARYANI; JAYA, 2023).

Dessa forma, os resultados de citotoxicidade obtidos para os tratamentos foram normalizados em relação ao controle de DMSO, assegurando que a atividade antiproliferativa observada seja atribuída exclusivamente aos compostos testados.

As placas foram novamente incubadas por 48 horas nas mesmas condições. Em seguida, adicionou-se a solução de MTT, e as células foram incubadas por 4 horas para formação dos cristais de formazan. O meio de cultura foi então removido e o formazan solubilizado, procedendo-se à leitura da absorbância em espectrofotômetro, a fim de quantificar a viabilidade celular em cada poço.

Os valores de absorbância foram utilizados para a construção de curvas de concentração-resposta, relacionando a porcentagem de crescimento celular com as concentrações das amostras testadas. A partir das curvas obtidas, realizou-se análise de regressão linear por meio de software estatístico, permitindo o cálculo do valor de IC₅₀, definido como a concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular.

3.7 Ensaio da viabilidade celular em modelo tridimensional de cultivo celular

Esse ensaio foi empregado para avaliar a viabilidade celular, em modelo 3D, baseando-se na quantificação de ATP presente, que é proporcional à quantidade de células viáveis presentes. As concentrações de hinokinina utilizadas nos ensaios foram baseadas no estudo anteriormente conduzido por CHANG et al. (2000).

Para tanto as células foram desagregadas com enzima tripsina 0,25% com EDTA 0,02% (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA) e contadas na densidade necessária para cada poço de 96 compartimentos receber 10 mil células. Em seguida, foram adicionadas as nanopartículas (GREINER®) (1 µl- 10.000 células) magnéticas. Logo após, as células foram centrifugadas e homogeneizadas três vezes, sendo assim incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

As células foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos de poliestireno, de fundo plano (Corning, EUA), incubadas com o ímã para formação de esferoide e mantidas em estufa por 48 horas. Após esse período o drive magnético (GREINER®) foi removido e as células foram tratadas com dimetilsulfóxido DMSO (Synth, Brasil) e concentrações de hinokinina (1,6-100 µM) por 72 horas e obtidas fotografias a cada tempo de tratamento.

Após o tratamento foram adicionados 50 µL de Cell Titer Glo® (Promega, EUA) a cada poço para análise de viabilidade celular por quantificação de ATP, de acordo com recomendações do fabricante e a leitura da luminescência foi feita em leitor de microplacas Glomax (Promega, EUA). Foram obtidos gráficos da curva de viabilidade celular pela concentração da amostra, que permitiu calcular o IC₅₀ (concentração mínima necessária para inibir 50% da viabilidade celular). Após a obtenção do IC₅₀ da hinokinina na MCF7, este mesmo ensaio foi realizado com essa molécula em associação ao quimioterápico docetaxel, em concentração previamente estabelecida por outros ensaios do nosso grupo de pesquisa.

3.8 Ensaio de formação de colônias

Esse ensaio foi utilizado para avaliar a capacidade do composto em inibir a replicação das linhagens e a capacidade de formar colônias. Para tanto, 5000 células MCF7 foram semeadas em 1 mL de meio de cultura RPMI + 5%SFB + 1%PS (Gibco, Thermo Fisher Scientific) em cada poço da placa de 6 compartimentos de poliestireno, de fundo plano (Corning, EUA) e acondicionadas em estufa por 24 horas. Após esse período foram adicionadas aos poços 500 µL da hinokinina e de controle DMSO (Synth, São Paulo, Brasil), bem como em associação com quimioterápico Docetaxel, diluídos em meio, que foram trocados a cada 3 dias durante um período de 21 dias. Após esses 21 dias as colônias foram lavadas com PBS, fixadas e coradas com solução de formaldeído a 10% e 0,05% de cristal violeta (Synth, São Paulo, Brasil) por 15 minutos. O corante foi removido e as colônias lavadas com água. Os poços foram fotografados e as imagens foram analisadas no software Image J (<https://imagej.net/ij>) para a quantificação das colônias.

3.9 Ensaio de morte celular/apoptose

As células tumorais foram inoculadas em placas de 6 compartimentos de poliestireno, de fundo plano (Corning, EUA) numa densidade de inoculação entre 1×10^5 e 1×10^6 cel/mL em meio RPMI + 5% de SFB e 1% de PS. O tratamento foi realizado em duplicata, em tempos e concentrações da amostra pré-determinados no teste de viabilidade celular. Após o tratamento foram transferidos 100 μ L de amostra a uma placa de 96 compartimentos com fundo em U (round bottom) e adicionados 100 μ L de Guava Nexin Reagent (Sotelab, Brasil), que discrimina a apoptose precoce de apoptose tardia e/ou necroptose, durante 20 min no escuro e então a placa foi analisada em citômetro. Valores de Excitação(Ex)/Emissão(Em): : 7-AAD (488 / 647 nm), FITC (494/ 520 nm). Este mesmo ensaio foi realizado com essa molécula em associação ao quimioterápico docetaxel.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) de dois experimentos independentes conduzidos em duplicata. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 5. T-teste e ANOVA seguido de teste post hoc de Tukey ou Bonferroni foram aplicados e valores de p menores que 0,05 considerados significativos. Para o ensaio de atividade antiproliferativa, a regressão não- linear das curvas foi obtida utilizando a porcentagem média de crescimento e calculada com o software Origin (OriginLab).

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio in silico (docking molecular)

O ensaio de docking molecular foi conduzido com o objetivo de prever as possíveis interações da hinokinina [(-)-Hinokinin, Cubebinolide, (3R,4R)-3,4-Bis(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)dihydrofuran-2(3H)-one, CAS 26543-89] com os receptores de estrógeno α (ER α , PDB: 1A52) e β (ER β , PDB: 5TOA). Os resultados indicaram que a molécula apresentou afinidade por ambos os receptores, destacando-se a interação mais estável com o ER α . Nesse receptor, a hinokinina ocupou o mesmo sítio de ligação do estradiol (DB00783), interagindo especificamente com o resíduo Leu220 (CD1), com distância de 3,140 Å, enquanto o estradiol apresentou distância de 2,654 Å para o mesmo resíduo (Figura 6, Tabela 2).

No caso do ER β , observou-se interação relevante entre o átomo O3 da Hinokinina e o resíduo Arg386, com distância de 3,188 Å (Tabela 2), evidenciando um contato molecular significativo e sugerindo também afinidade de ligação com esse subtipo de receptor. Esses achados sugerem que a hinokinina possui potencial para competir ou mimetizar a ação do estradiol no ER α , podendo atuar como agonista ou antagonista, a depender do contexto biológico.

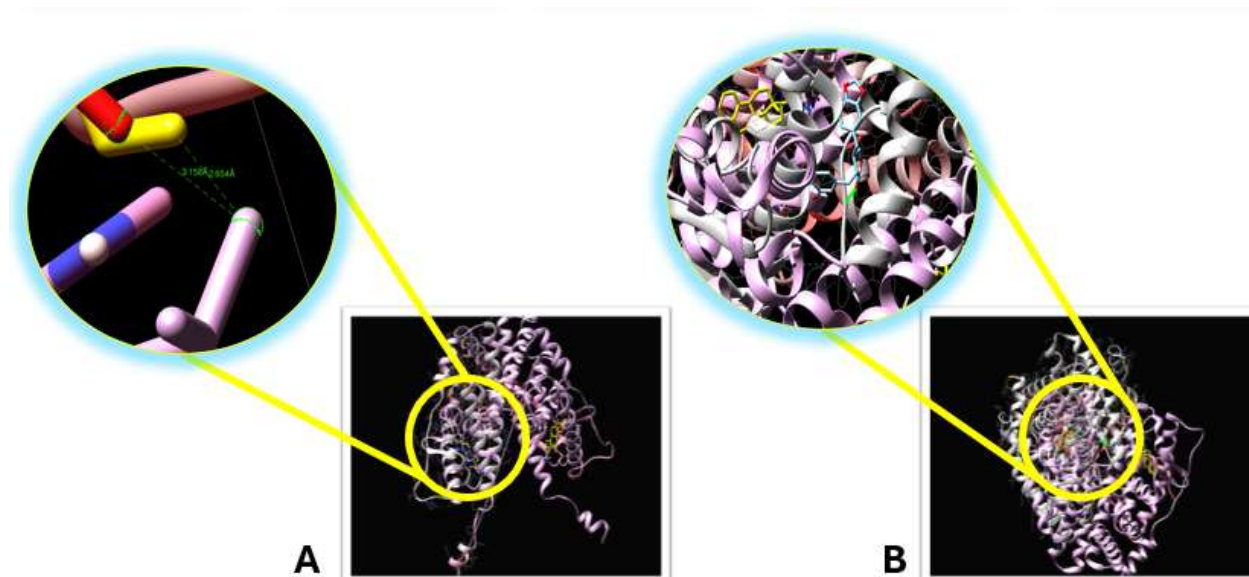


FIGURA 6. Docagem molecular em receptor de estrógeno. Ligação da hinokinina (azul) no receptor alfa no mesmo sítio de ligação que o estradiol (rosa) (A). Ligação da hinokinina (azul) no receptor de estrógeno beta (B).

TABELA 2. Valores de energia de ligação, resíduos de interação entre a Hinokinina e os receptores de estrógeno α (ER α) e β (ER β), bem como as respectivas distâncias de ligação, obtidos por ensaio de docking molecular *in silico*.

RECEPTOR	CÓDIGO PDB	ENERGIA DE LIGAÇÃO	INTERAÇÃO ENTRE LIGANTE E RECEPTOR	DISTÂNCIA
RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA	A153	-8,95	LIG 1 03 - THR42 OG2	3.140 A°
			LIG 1 01 - LEU220*	3.158 A°
			LIG 1 02 - LEU460	3.333 A°
RECEPTOR DE ESTRÓGENO BETA	5TOA	-8,17	LIG 1 O – MET 150	2.654 A°
			LIG 1 03 – ARG 386	3.188 A°
			LIG 1 026 – GLU 389	3.298 A°

* Hinokinina interagiu com o mesmo resíduo que o estradiol, Leu220.

4.2 Ensaio *in-silico* para investigação dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos

A caracterização *in silico* da hinokinina revelou um conjunto de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas da molécula compatíveis com o desenvolvimento de fármacos.

A escolha de avaliação da hinokinina como candidata a fármaco de absorção via oral foi fundamentada com base em estudos prévios *in vivo* (SOUZA et al., 2012; SILVA et al., 2005), que demonstraram a eficácia desta lignana na redução de parasitas, bem como processos inflamatórios em modelos murinos após administração por gavagem.

Visto isso, este estudo inicialmente baseou-se na regra de Lipinski que estabelece que, para um composto ter boa biodisponibilidade oral, ele deve atender a pelo menos 3 dos 4 critérios físico-químicos detalhados na Tabela 3. De acordo com os resultados apresentados à direita na Tabela 2, a hinokinina atende todos os 5 parâmetros, predizendo que ela consegue atravessar membranas celulares por difusão passiva, tem bom equilíbrio entre hidrofobicidade (lipossolubilidade) e hidrossolubilidade, característica essencial para a absorção intestinal.

TABELA 3. Resultado da predição *in silico* sobre os parâmetros farmacológicos determinados por Lipinski para a biodisponibilidade oral de moléculas candidatas a fármacos.

Parâmetros de Lipinski	Hinokinina
Massa molecular ≤ 500	354,35g/mol
Aceptor de hidrogênio ≤ 10	6
Doador de hidrogênio ≤ 5	0
Log p ≤ 5	3.08
PSA ≤ 140	63.22

Além de Lipinski, outros parâmetros que avaliam potencial *druglikeness* de moléculas como Ghose, Veber, Egan e Muegge, também foram investigados para a hinokinina, sem ocorrência de violações, indicando adequada absorção e permeabilidade. A pontuação de biodisponibilidade obtida foi de 0,55, sugerindo potencial para administração por via oral. Em relação à distribuição, a hinokinina apresentou capacidade prevista de atravessar a barreira hematoencefálica e não foi classificada como substrato da P-glicoproteína, o que pode favorecer sua disponibilidade intracelular. Quanto ao metabolismo, observou-se potencial inibitório da hinokinina sobre isoformas relevantes do citocromo P450, especificamente CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4, indicando possível influência sobre vias metabólicas hepáticas (tabela 4).

TABELA 4. Perfil de druglikeness da molécula hinokinina.

CATEGORIA	PARÂMETROS	RESULTADOS
Druglikeness	Regra de Lipinski	Atende; 0 Violações
	Filtro de Ghose	Atende
	Critérios de Veber	Atende
	Filtro de Egan	Atende
	Regra de Muegge	Atende
	Pontuação de Biodisponibilidade	0,55
Permeabilidade ao SNC	Atravessa a Barreira Hematoencefálica	Sim
	Substrato de P-gp	Não
Citocromo P450 (CYP)	Inibidor CYP1A2	Sim
	Inibidor CYP2C19	Sim
	Inibidor CYP2C9	Sim
	Inibidor CYP2D6	Sim
	Inibidor CYP3A4	Sim

Os parâmetros incluem as regras de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge, além da pontuação de biodisponibilidade. Também são indicadas a permeabilidade ao sistema nervoso central e a possível inibição das principais enzimas metabólicas da família CYP.

4.3 Ensaio de citotoxicidade em linhagem não tumoral (hacat) e tumoral (mcf-7)

Pelo método colorimétrico de MTT, foi possível avaliar a atividade citotóxica da hinokinina, de forma isolada e em associação do docetaxel, em linhagem não tumoral de queratinócitos (HaCaT) e em linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7).

De forma isolada, a hinokinina não apresentou citotoxicidade para as linhagens (Figura 7 A e B). Porém, é interessante notar que quando associada ao docetaxel, potencializou o efeito do quimioterápico na linhagem de adenocarcinoma de mama luminal MCF-7 (Figura 7 C), sem elevar a toxicidade do mesmo na linhagem não tumoral de queratinócitos HaCaT (Figura 7 D).

Observou-se que, quando associado à hinokinina a 25 μM , houve redução do IC_{50} do docetaxel de 18,65 μM para 0,3 μM , enquanto a hinokinina a 50 μM reduziu esse valor para 0,08 μM na linhagem MCF7 (Tabela 5). Já na linhagem celular HaCaT, a análise da curva de concentração-resposta demonstrou que, na presença de hinokinina a 25 μM , ocorreu redução da citotoxicidade do docetaxel, evidenciada pelo aumento do IC_{50} de 1,8 μM para 3,36 μM . O IC_{50} na associação com hinokinina a 50 μM , também foi maior que o encontrado para o quimioterápico isolado, porém inferior em comparação à concentração de 25 μM . Esse resultado indica que a hinokinina pode exercer um efeito modulador sobre a ação citotóxica do quimioterápico, possivelmente conferindo um perfil de proteção às células não tumorais. Tais achados sugerem que a hinokinina pode atuar como um agente adjuvante sem potencializar a toxicidade sobre

células normais.

TABELA 5. Valores de IC50 obtidos para as amostras nas linhagens MCF7 e HaCaT.

IC50 (μM)	MCF7	HaCaT
Docetaxel	18,65	1,80
Docetaxel + 25 μM Hinokinina	0,30	3,36
Docetaxel + 50 μM Hinokinina	0,08	2,13
Hinokinina	>50,0	>50,0

IC50: concentração mínima necessária para inibir 50% da viabilidade celular

MCF7: adenocarcinoma de mama subtipo luminal

HaCaT: queratinócitos humanos

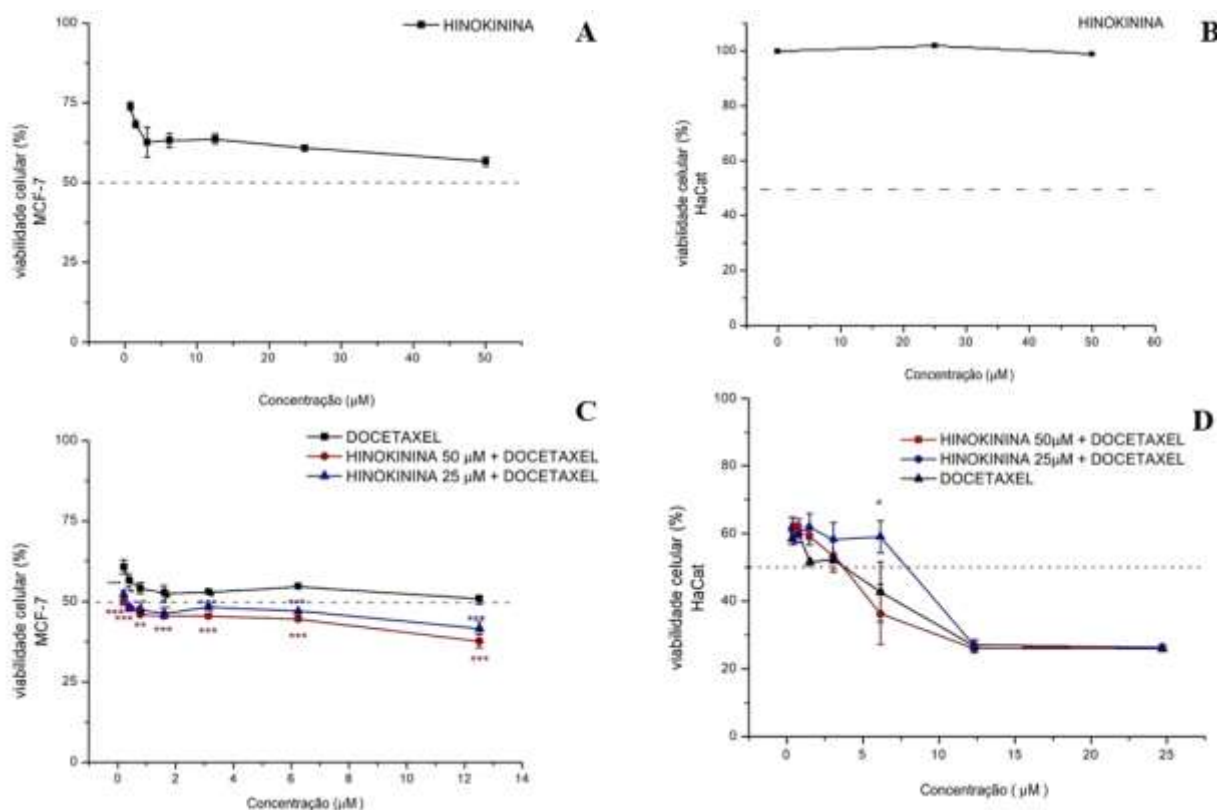


FIGURA 7. Percentual de viabilidade celular das linhagens MCF-7 (A e C) e HaCaT (B e D) tratadas com hinokinina (A e B) e com Docetaxel isolado (B e D) e em associação com Hinokinina (25 μM ou 50 μM), avaliada pelo ensaio de MTT. Valores expressos como média \pm desvio-padrão (n = 3). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 em relação ao Docetaxel.

4.4 Ensaio da viabilidade celular em modelo tridimensional de cultivo celular

A atividade citotóxica da hinokinina foi avaliada na linhagem celular MCF-7, representativa do subtipo luminal de carcinoma de mama, utilizando-se o ensaio de formação de esferoides tridimensionais (Figura 8). Esse modelo experimental é amplamente reconhecido por mimetizar de forma mais fidedigna ao microambiente tumoral *in vivo*, permitindo uma melhor resposta celular a agentes antineoplásicos. Foram testadas três concentrações do composto (10, 20 e 40 μM), sendo observada atividade citotóxica significativa a 20 μM , com redução de aproximadamente 56% da viabilidade celular (Figura 9). O valor de IC50 foi calculado em 25 μM para a hinokinina e 12,5 μM para o docetaxel.

Após 48 horas de exposição, análises morfométricas dos esferoides tratados revelaram alterações estruturais importantes, incluindo diminuição da zona necrótica, maior compactação celular e redução expressiva da região proliferativa (Figura 8), tanto nos grupos tratados com hinokinina quanto naqueles expostos ao docetaxel, em relação ao controle negativo (DMSO). Esses achados sugerem que a hinokinina interfere de maneira significativa na organização e dinâmica de crescimento dos esferoides tumorais, corroborando seu potencial como candidato a agente antitumoral.

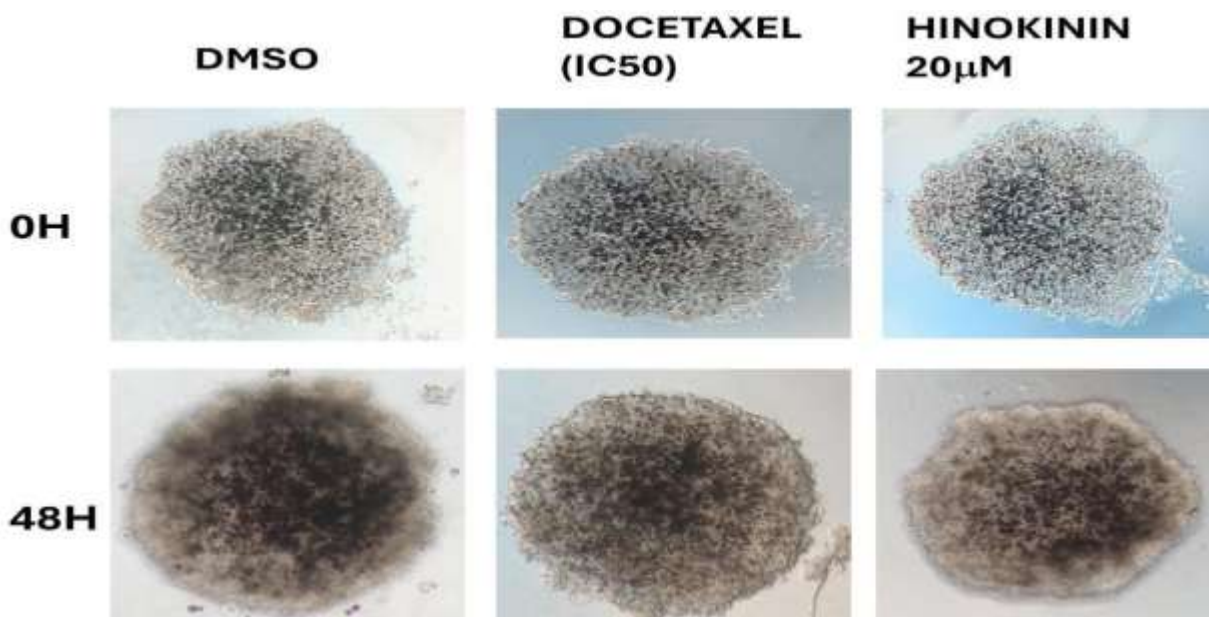


FIGURA 8. Fotomicrografia dos esferoides nos tempos 0 e 48 horas após tratamento com o controle negativo (DMSO), hinokinina a 20 μM e Docetaxel a 12,5 μM .

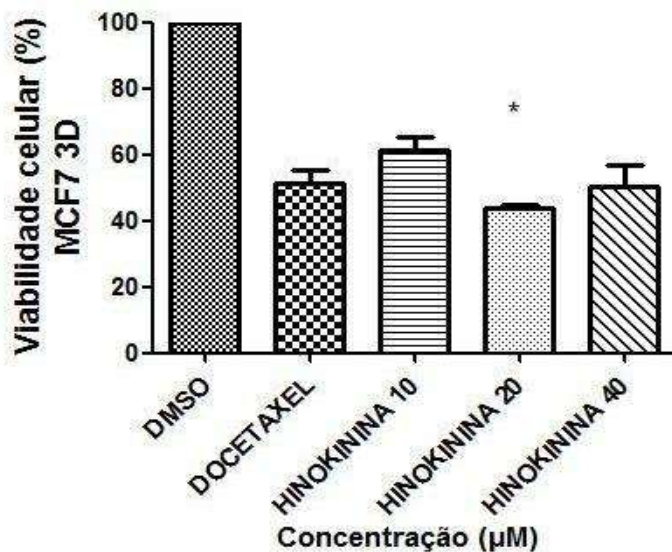


FIGURA 9. Percentual de células viáveis após 48 horas de tratamento. Hinokinina foi testada nas concentrações 10 µM, 20 µM e 40 µM e controle positivo docetaxel a 12,5 µM. Controle negativo: DMSO. ANOVA One Way seguido de Teste de Tukey, * $p < 0.0$

4.5 Ensaio de formação de colônias

A partir deste ensaio avaliou-se a capacidade replicativa das células MCF-7 sob tratamento com hinokinina isoladamente e em associação com o quimioterápico Docetaxel. O grupo controle (DMSO) apresentou o maior número de colônias formadas, com média de 232 colônias. O tratamento com Docetaxel isolado (12,5 µM) resultou em uma redução de 25,4% do número de colônias e, de forma semelhante, a hinokinina na concentração de 25 µM também reduziu a formação de colônias em 26,9%, valor próximo ao do grupo tratado com Docetaxel, conforme observado na Figura 10.

O tratamento com Docetaxel associado à hinokinina nas concentrações de 12,5; 25 e 50 µM apresentou reduções de 63,6%, 70% e 57,1% no número de colônias formadas quando comparadas ao grupo controle, indicando um efeito antireplicativo promissor da associação. Esse efeito foi mais acentuado na concentração de 25 µM do que na de 50 µM, corroborando com os resultados obtidos através do ensaio de replicação celular, conforme observado na Figura 11.

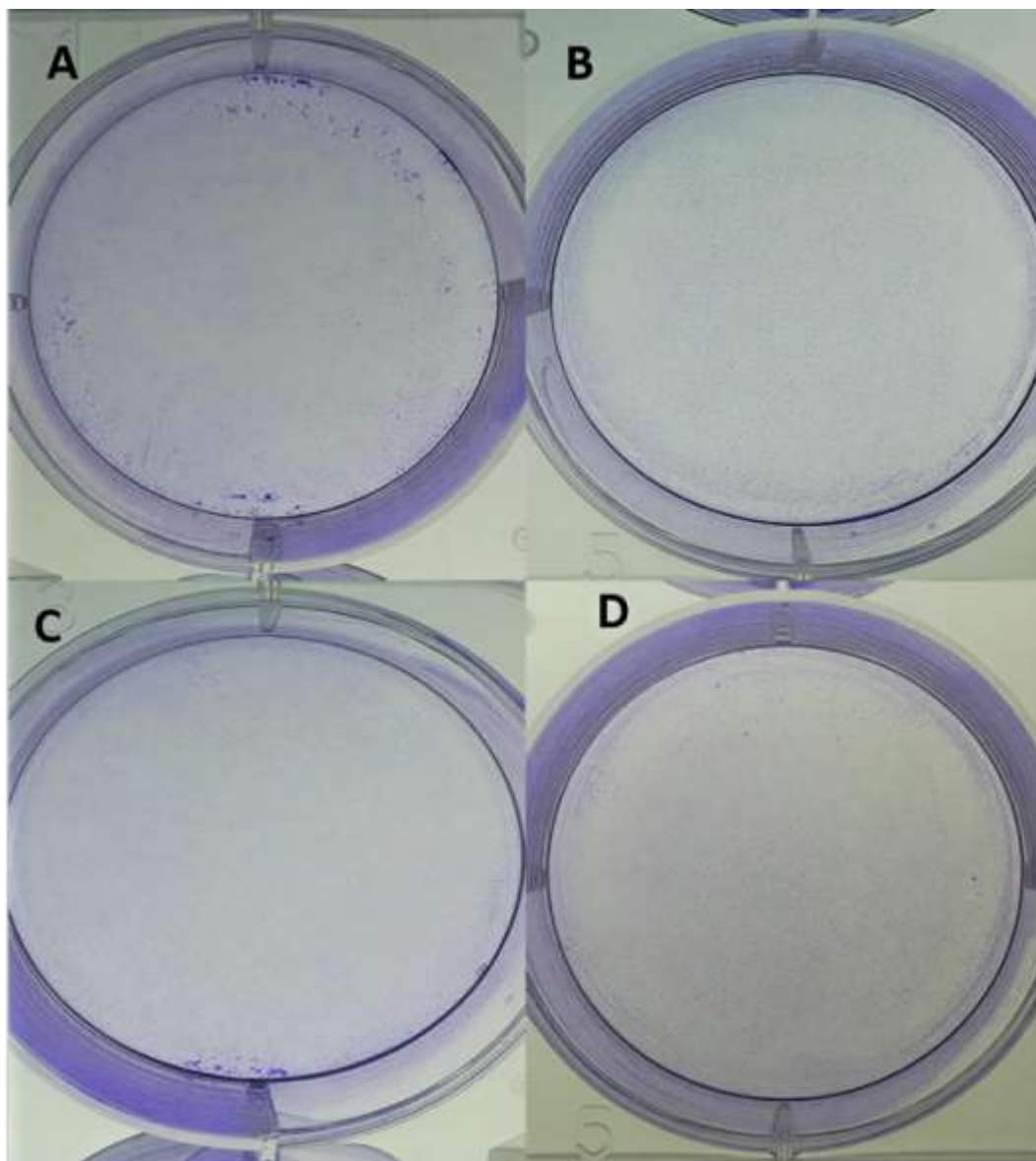


Figura 10: Fotografias das colônias de células MCF-7 formadas a partir da coloração com cristal violeta. (A) Controle negativo tratado com DMSO; (B) Tratamento com Docetaxel a 12,5 μM ; (C) Hinokinina a 25 μM ; (D) Associação de Hinokinina (25 μM) com Docetaxel. A redução na formação de colônias indica o efeito citotóxico dos tratamentos sobre a replicação celular.

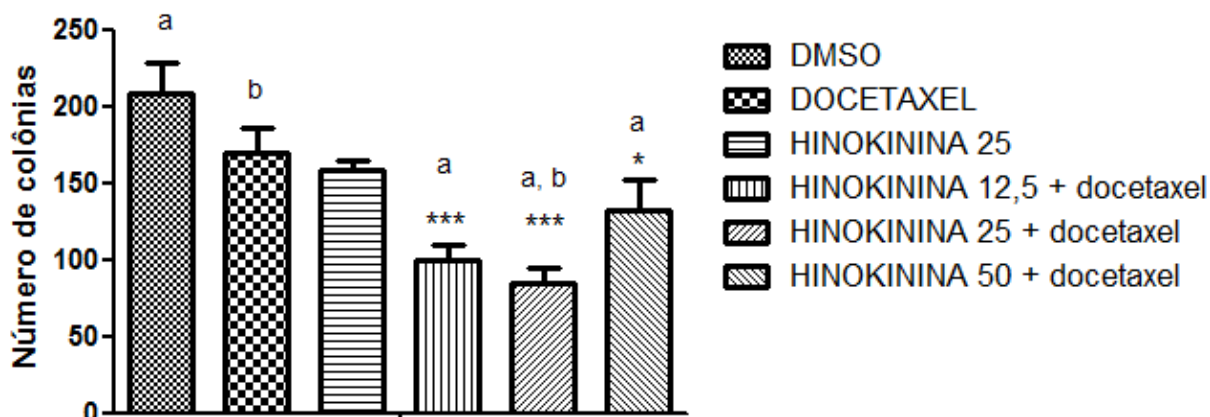


FIGURA 11. Número de colônias formadas após 21 dias de tratamento. O tratamento foi realizado a cada três dias com hinokinina nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M de forma isolada e em associação ao quimioterápico Docetaxel (12,5 μ M). ANOVA One Way seguida de Teste de Tukey. * p <0.05.

4.6 Ensaio de morte celular/apoptose

A análise do perfil apoptótico das células MCF-7 tratadas com hinokinina (25 μ M), Docetaxel (12,5 μ M) e a combinação de ambos foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit Guava Nexin Reagent. Os dados obtidos revelaram alterações significativas na viabilidade celular e na indução de morte por apoptose em diferentes estágios.

O grupo controle (DMSO) apresentou maior percentual de células viáveis, com valores superiores a 90%, seguido pelos grupos tratados com Docetaxel (média de 85%) e hinokinina (média de 80%). A combinação de hinokinina 25 μ M com Docetaxel 12,5 μ M promoveu a maior redução da viabilidade celular, com percentual de células viáveis inferior a 70%.

Com relação à apoptose em estágio inicial, observou-se um discreto aumento nos grupos tratados isoladamente com hinokinina e Docetaxel (valores entre 10% e 15%), em comparação ao controle (<5%). No entanto, o tratamento combinado resultou em um aumento acentuado das células em apoptose inicial, ultrapassando 20%, conforme observado na Figura 12.

Para apoptose em estágio tardio, todos os grupos apresentaram valores reduzidos (em torno de 5% ou menos), sem diferenças expressivas entre si. A porcentagem de debris celulares permaneceu baixa e semelhante entre os tratamentos, indicando que a maioria das células passou por morte programada, e não necrose acentuada.

Esses dados sugerem que a hinokinina, especialmente quando combinada ao Docetaxel,

potencializa a indução de apoptose, com destaque para o aumento do estágio inicial apoptótico, refletindo um possível efeito sinérgico entre os compostos.

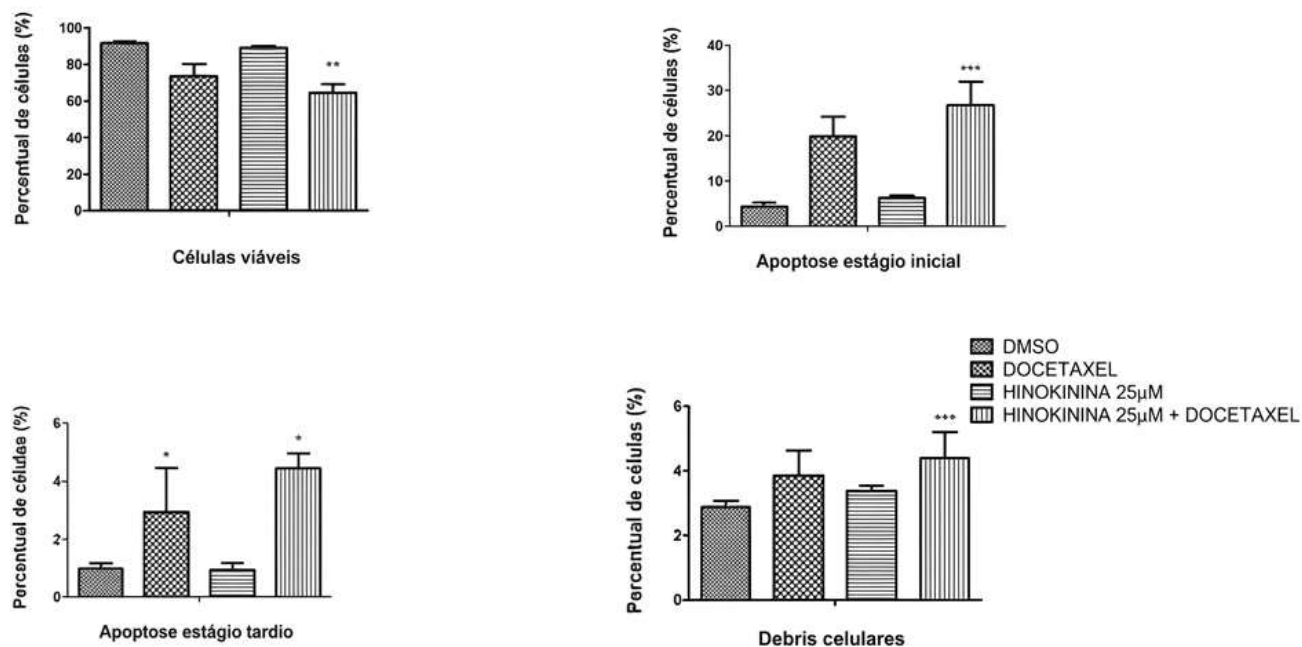


FIGURA 12: Percentual de células viáveis, em apoptose nos diferentes estágios (inicial/tardio) e de debris celulares marcados após 48 horas de tratamento com hinokina na concentração de 25 µM de forma isolada e associada ao quimioterápico Docetaxel (12,5 µM). DMSO: controle negativo Teste Anova Two Way, ***p<0.001.

5. DISCUSSÃO

O câncer de mama feminino do tipo luminal é o mais prevalente na população e está subdividido em dois subtipos, A e B. Diversas abordagens terapêuticas são utilizadas para esse tipo de câncer, como tratamento neoadjuvante, adjuvante ou intervenção cirúrgica com a finalidade de remoção completa do tumor, assegurando margens livres (GAO et al., 2018). É amplamente reconhecido que diversos medicamentos empregados no tratamento do câncer têm origem em substâncias naturais extraídas de plantas. Um exemplo notável é o Docetaxel, derivado da espécie vegetal *Taxus baccata*, que ilustra o valioso papel da biodiversidade no desenvolvimento de fármacos (Kingston, 2009). Esse quimioterápico atua especificamente na fase G2/M do ciclo celular, inibindo a formação de microtúbulos, o que compromete a divisão celular e leva à apoptose (Yared & Tkaczuk, 2012). Essa estratégia é essencial no combate a diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama luminal, no qual a eficácia do Docetaxel se mostra particularmente relevante (Jones et al., 2005).

Além do Docetaxel, outras substâncias de origem vegetal também desempenham papéis fundamentais na oncologia. Pesquisas voltadas as plantas e suas propriedades bioativas permanece um campo promissor, com potencial para descoberta de novos agentes terapêuticos capazes de melhorar a eficácia dos tratamentos e mitigar os efeitos adversos. Ainda que os quimioterápicos utilizados na clínica sejam eficazes, seus efeitos adversos podem comprometer significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, a incorporação de compostos naturais, como a hinokinina, nos protocolos terapêuticos oncológicos exemplifica a importância da bioprospecção e da pesquisa científica na busca por alternativas mais eficazes e seguras (Jang et al., 2022; Orio et al., 2023).

Metabólitos de origem vegetal presentes em sementes, grãos, frutas e vegetais, as lignanas são convertidas pela microbiota intestinal em enterodiol (END) e enterolactona (ENL), compostos estruturalmente semelhantes ao 17β -estradiol, conferindo-lhes capacidade de modular seletivamente os receptores de estrogênio (Basu & Maier, 2018). O estrogênio, além de desempenhar papel fisiológico essencial no desenvolvimento das características sexuais femininas, atua como importante fator de crescimento em neoplasias mamárias receptoras de estrogênio; sua superexpressão em células tumorais favorece tanto a proliferação celular quanto a resistência às terapias convencionais (JANG et al., 2022).

Os estudos de *docking* molecular realizados demonstraram que a lignana hinokinina, assim como as demais lignanas apresentadas na literatura, apresenta afinidade semelhante pelos receptores de estrogênio alfa e beta, indicando seu possível efeito modulador sobre a atividade

estrogênica. A constatação de que a hinokinina ocupa o mesmo sítio de ligação que o estradiol no receptor alfa sugere um possível efeito antagonista, inibindo a proliferação celular mediada por esse receptor. Esse achado é especialmente relevante em neoplasias caracterizadas pela superexpressão do receptor ER alfa, frequentemente associada à progressão tumoral. Por outro lado, a boa interação da hinokinina com o receptor beta levanta a hipótese de indução de parada celular e promoção de apoptose, visto que o ER beta desempenha papel conhecido na supressão da proliferação celular. Essa possível dualidade de ação confere à hinokinina um perfil terapêutico promissor, o qual poderá ser explorado em patologias relacionadas à regulação hormonal estrogênica. Ensaios adicionais, como o E-screen, devem ser conduzidos para avaliar a competitividade entre hinokinina e estradiol (Chen, 2020).

Considerando o potencial de uso clínico da Hinokinina, realizou-se a análise de suas propriedades farmacocinéticas *in silico*, com base nos critérios estabelecidos por Lipinski, os quais compreendem cinco parâmetros relacionados à druglikeness, fundamentais para a caracterização de uma molécula como candidata a fármaco oral. Através de ferramentas computacionais apropriadas, observou-se que a Hinokinina satisfaz os cinco critérios estabelecidos por Lipinski, evidenciando um equilíbrio favorável entre lipossolubilidade e hidrossolubilidade. Além disso, a análise *in silico* indicou que a molécula apresenta elevada absorção intestinal e alta permeabilidade à barreira hematoencefálica, característica que pode ampliar sua distribuição sistêmica e possibilitar efeitos no sistema nervoso central, mas que também demanda cautela quanto a potenciais efeitos adversos centrais. O modelo preditivo também apontou capacidade de interação com enzimas da família do citocromo P450, especialmente relevante do ponto de vista farmacocinético, uma vez que o docetaxel é predominantemente metabolizado pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP3A5, o que o faz atuar no seu papel de toxicidade. Assim, a interação da molécula com essas enzimas pode resultar em modulação do metabolismo do docetaxel, alterando sua biodisponibilidade, meia-vida e potencial terapêutico. Embora isso potencialize a eficácia anticancerígena, também exige um monitoramento cuidadoso dos perfis de toxicidade em potenciais aplicações clínicas. Já pelo fato de a molécula não atuar como substrato da P-glicoproteína (P-gp) sugere menor efluxo celular, o que pode favorecer maior concentração intracelular e contribuir para efeitos sinérgicos quando associada ao docetaxel, reforçando seu perfil farmacocinético promissor como candidato a fármaco de administração oral (POWELL et al., 2021).

A investigação da atividade antiproliferativa da Hinokinina em modelo tridimensional (3D) representa um avanço em relação aos ensaios convencionais em monocamada (2D). Os

resultados obtidos demonstraram que a aplicação da hinokinina na concentração de 20 μM provocou redução da zona necrótica, aumento da zona quiescente e diminuição e compactação da zona proliferativa dos esferoides. Tais achados indicam efeito citotóxico relevante da hinokinina sobre células MCF7, evidenciando sua capacidade de inibir a proliferação celular em ambiente que simula mais fielmente as condições in vivo.

A formação de esferoides constitui uma abordagem inovadora e eficaz para investigar o comportamento tumoral tridimensional, permitindo melhor compreensão das interações celulares e com a matriz extracelular, além de replicar características como a hipóxia, comum em tumores sólidos. A redução da hipóxia nesse modelo pode limitar a proliferação celular, promovendo o aumento da zona quiescente, estado desejável em terapias oncológicas, uma vez que reflete a interrupção do crescimento tumoral. Ademais, a compactação da zona proliferativa reforça a evidência de redução na capacidade de divisão celular. Dessa forma, o uso de esferoides se mostra relevante tanto para o estudo da biologia tumoral quanto para a avaliação de tratamentos que visem à indução da quiescência ou apoptose. Tal abordagem pode contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e para a personalização do tratamento oncológico (Kunz; Ibrahim, 2003).

Os dados obtidos por meio do ensaio CellTiter-Glo, que avalia a viabilidade celular pela quantificação de ATP via luminescência, indicam redução significativa da viabilidade celular após tratamento com hinokinina, com queda de 56%. Este efeito citotóxico foi superior ao observado com o Docetaxel, cuja redução foi de 42%. Esses resultados sugerem que a substância investigada apresenta potencial citotóxico relevante, possivelmente superior ao de fármacos já utilizados clinicamente. Contudo, é necessário considerar outros aspectos, como a especificidade da substância, seu mecanismo de ação e os efeitos adversos que podem estar associados. A análise da viabilidade celular deve ser complementada por ensaios adicionais que investiguem processos como apoptose e senescência, visando melhor compreensão da toxicidade observada.

Estudos recentes têm demonstrado o potencial efeito citotóxico do docetaxel quando associado a lignanas como as enteractonas(ENL) e o secoisolariciresinal (SECO) em células do cancer de mama. Em células HER2+ (SKBR3), a associação reduziu o IC50 do docetaxel de 0,75 nM para 0,17 nM na presença de 50 μM de ENL, e para 0,19 nM com 50 μM de SECO, representando um aumento de aproximadamente 4 vezes na sensibilidade celular ao fármaco. De forma ainda mais expressiva, em células triplo-negativas (MDA-MB-231), a combinação com 50 μM de ENL reduziu o IC50 de 1,0 nM para 0,1 nM, ou seja, uma sensibilização 10 vezes maior ao docetaxel. Esses resultados indicam que a coadministração de lignanas pode permitir o uso

de doses menores de docetaxel em linhagens de câncer de mama (Di et al., 2018). Nosso trabalho corrobora esses achados, uma vez que a avaliação da atividade citotóxica da associação entre Hinokinina e Docetaxel na linhagem tumoral MCF-7 demonstrou um efeito sinérgico significativo. Observou-se que a coadministração de Hinokinina a 25 μM reduziu o IC_{50} do Docetaxel de 18,65 μM para 0,3 μM . De forma ainda mais expressiva, a Hinokinina a 50 μM promoveu a diminuição desse valor para 0,08 μM , evidenciando um aumento substancial na sensibilidade das células ao Docetaxel.

Complementando esses achados, o ensaio de formação de colônias demonstrou que a hinokinina, especialmente em associação ao Docetaxel, apresenta significativa capacidade de inibição da replicação celular em longo prazo. Observou-se redução progressiva no número de colônias formadas, com destaque para a combinação de hinokinina a 25 μM com Docetaxel, que reduziu 70% do número de colônias, indicando um efeito antireplicativo das células tumorais.

Adicionalmente, a análise por citometria de fluxo confirmou que o tratamento com hinokinina promoveu aumento da apoptose, particularmente em estágio inicial, com destaque para o tratamento combinado com Docetaxel, que reduziu significativamente a viabilidade celular para valores inferiores a 70% e aumentou a proporção de células em estágio inicial de apoptose para mais de 20%. Esse perfil apoptótico evidencia que, além do efeito antiproliferativo, a hinokinina também induz morte celular programada, reforçando seu potencial como agente antitumoral e coadjuvante na terapia antineoplásica. Comparativamente, a literatura traz que lignanas como secoisolariciresinol (SECO), matairesinol (MAT), arctigenina e seus derivados exercem efeitos antitumorais em células MCF-7 por meio da redução da expressão de ciclinas, como a ciclina D1, e de CDKs, além do aumento de inibidores do ciclo celular (p21, p27). Elas também promovem apoptose por meio do aumento da razão Bax/Bcl-2, liberação de citocromo c e ativação de caspases. Em modelos MCF-7 transfectados com aromatase (MCF-7aro), observou-se ainda a inibição desta enzima, reduzindo a síntese de estradiol e a estimulação proliferativa dependente de ER. Assim, as lignanas modulam o equilíbrio $\text{ER}\beta/\text{ER}\alpha$ e impactam múltiplas vias relacionadas ao ciclo celular, apoptose e metabolismo do estrogênio, sustentando seu potencial quimiopreventivo e terapêutico no câncer de mama hormônio-dependente (Basu & Maier, 2018).

De acordo com o estudo realizado por Hassanin et al. (2024), a Hinokinina exerce sua ação principalmente ao interferir na organização e funcionamento dos microtúbulos, estruturas essenciais para o processo de divisão celular. Essa interferência provoca um bloqueio no ciclo celular, especificamente na transição da fase G2 para a fase M, momento crítico para a correta duplicação e segregação do material genético. Como consequência desse impedimento, ocorre

a ativação da via intrínseca da apoptose, um mecanismo programado de morte celular. Tal ativação é evidenciada pela indução das caspases, enzimas-chave que coordenam a destruição ordenada da célula, além da liberação de sinais que promovem a apoptose. Paralelamente, observa-se um aumento significativo na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), moléculas capazes de causar danos adicionais ao material celular, amplificando os efeitos citotóxicos da Hinokinina. Outro aspecto importante descrito no estudo é a capacidade do composto em diminuir a mobilidade das células tumorais, o que sugere um potencial papel na contenção da migração celular e, conseqüentemente, na prevenção da formação de metástases. Esses achados destacam a relevância da hinokinina como um candidato promissor para ser utilizado como agente complementar em tratamentos direcionados ao câncer de mama, visando tanto a indução da morte das células malignas quanto a inibição da sua disseminação pelo organismo.

6. CONCLUSÃO

As análises *in silico* permitem inferir que a hinokinina é uma molécula candidata a fármaco oral e tem afinidade pelo receptor de estrogênio alfa e possivelmente pode competir pelo mesmo sítio de ligação do estradiol, cuja ativação desse receptor é amplamente associada à proliferação celular. Simultaneamente, foi observada uma interação favorável com o receptor beta, cuja ativação está vinculada à inibição da multiplicação celular, sugerindo, assim, um mecanismo de ação multifatorial. Sua atuação combinada como antagonista e agonista seletivo dos receptores estrogênicos indica um potencial modulador da resposta celular tumoral, o que pode representar um avanço significativo na abordagem terapêutica da doença.

Além disso, a Hinokinina apresentou um notável potencial citotóxico seletivo frente a células tumorais do câncer de mama do tipo luminal, evidenciado por uma expressiva redução na viabilidade celular. Os ensaios funcionais realizados demonstraram sua capacidade de inibir a formação de colônias e induzir apoptose, particularmente quando associada ao Docetaxel, reforçando a possibilidade de uso combinado para potencialização do efeito terapêutico. No entanto, torna-se imprescindível a realização de estudos experimentais adicionais, com aprofundamento dos mecanismos moleculares envolvidos e validação *in vitro* e *in vivo*, a fim de verificar sua eficácia, segurança e aplicabilidade clínica.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, C.; EUGÊNIO, D. S.; MOREIRA, M. R. et al. Biotransformation of (-)-cubebin by *Aspergillus* spp. into (-)-hinokinin and (-)-parabenzlactone, and their evaluation against oral pathogenic bacteria. **Natural Product Research**, v. 32, n. 23, p. 2803-2816, 2018..
- BASU, P.; MAIER, C. Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1648–1666, nov. 2018.
- BIANCHINI, G.; GIANNI, L. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. **The Lancet Oncology**, 15 (2): 58-68, 2014.
- CARVALHO, E. et al. Molecular Subtypes and Mechanisms of Breast Cancer: Precision Medicine Approaches for Targeted Therapies. **Cancers**, v. 17, n. 7, p. 1102, 25 mar. 2025
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anticancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-29, 2005.
- CUNHA, N.; TEIXEIRA, G. MARTINS, T.; SOUZA, A.; OLIVEIRA, P.; SÍMARO, G.; REZENDE, K.; GONÇALVES, N.; SOUZA, D.; TAVARES, D.. (-)-Hinokinin Induces G2/M Arrest and Contributes to the Antiproliferative Effects of Doxorubicin in Breast Cancer Cells. **Planta Medica**, v. 82, n. 06, p. 530-538, 22 mar. 2016.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. *SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules*. *Scientific Reports*, v. 7, 42717, 2017.
- DE SILVA, S. F.; ALCORN, J. Flaxseed Lignans as Important Dietary Polyphenols for Cancer Prevention and Treatment: Chemistry, Pharmacokinetics, and Molecular Targets. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 68, 5 maio 2019.
- DI, Yunyun; DE SILVA, Franklyn; KROL, Edward S.; ALCORN, Jane. *Flaxseed lignans enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents against breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR3*. **Nutrition and Cancer**, [S.l.], v. 70, n. 4, p. 1-10, 2018.
- DINI S, BINDER BJ, FISCHER SC, Mattheyer C, SCHMITZ A, STELZER EHK, BEAN NG, Green EF. 2016 Identifying the necrotic zone boundary in tumour spheroids with pair-correlation functions. *J. R. Soc. Interface* 13, 123, 2016.
- ESPERANDIM VR, da SILVA FERREIRA D, REZENDE KC, CUNHA WR, SARAIVA J, BASTOS JK, SILVA ML, de ALBUQUERQUE S. Evaluation of the in vivo therapeutic properties of (-)-cubebin and (-)-hinokinin against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology** 133: 442–446, 2013.
- FLORENTINO, I. F., NASCIMENTO, M. V. M., GALDINO, P. M., BRITO, A. F. D., ROCHA, F. F. D., TONUSSI, C. R., LIMA, T. C. M. D., PAULA, J. R. D., COSTA, E. A. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae (acariçoba) in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, 987-997, 2013.
- GAO, J. J; SANDRA M. S. “Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review.” **The oncologist** 23,5: 556-565, 2018.
- HASSANIN et al. Combining In Vitro, In Vivo, and Network Pharmacology Assays to Identify Targets and Molecular Mechanisms of Spirulina-Derived Biomolecules against Breast Cancer. **Marine Drugs**, v. 22, n. 7, p. 328–328, 22 jul. 2024.
- INCA. **Estimativa 2026**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt->

br/assuntos/noticias/2026/inca-estima-781-mil-novos-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-entre-2026-e-2028>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2026.

JANG, W. Y.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y.. Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Menopausal, and Anti-Cancer Effects of Lignans and Their Metabolites. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15482, 7 dez. 2022.

JONES, S. E., ERBAN, J., Overmoyer, B., BUDD, G. T., HUTCHINS, L. F., LOWER, E. E., & NATALE, R. (2005). Randomized phase III study of docetaxel compared with paclitaxel in metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 23(24), 5542–5551.

KIM, N.; LUKONG, K. E. Treating ER-positive breast cancer: a review of the current FDA-approved SERMs and SERDs and their mechanisms of action. **Oncology reviews**, v. 19, p. 1564642, out. 2025.

KINGSTON, D. G. I. (2009). Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, 72(3), 507–516.

LI, Y. et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, 29 ago. 2022.

LIU, Z. et al. Lignans intake and enterolactone concentration and prognosis of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 9, p. 2787–2796, 2021.

LIPINSKI, Christopher A.; LOMBARDO, FRANCO; DOMINY, Beryl W.; FEENEY, Paul J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00129-0.

LONE, B. A. et al. Hinokinin, a lignan from *Piper cubeba* fruits induces apoptosis via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction in MCF-7 breast cancer cells. **Natural Product Research**, p. 1–9, 13 jun. 2025.

MASS, Eduardo B.; LIMA, Carolina A. de; D'OCA, Marcelo G. M.; SCIANI, Juliana M.; LONGATO, Giovanna B.; RUSSOWSKY, Dennis. Synthesis, selective cytotoxic activity against human breast cancer MCF7 cell line and molecular docking of some chalcone-dihydropyrimidone hybrids. **Drugs and drug candidates**, v. 1, n. 1, p. 2, 2025.

MEDOLA JF, CINTRA VP, SILVA EPP, ROYO VA, SILVA R, SARAIVA J, ALBUQUERQUE S, BASTOS JK, SILVA MLA, TAVARES DC. (-)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology** 45: 638–642, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as a source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

POWELL, N. R. et al. Life-Threatening Docetaxel Toxicity in a Patient With Reduced-Function CYP3A Variants: A Case Report. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 809527, 2021.

RADEMAKER, L. M. et al. Side-effects in Women Treated with Adjuvant Endocrine Therapy for Breast Cancer. **The Breast**, v. 80, p. 104416–104416, 11 fev. 2025.

RAMOS, F., TAKAISHI, Y., KAWAZOE, K., OSORIO, C., DUQUE, C., ACUÑA, R., FUJIMOTO, Y., SATO, M., OKAMOTO, M., OSHIKAWA, T., AHMED, S. U. Immunosuppressive diacetylenes, ceramides and cerebrosides from *Hydrocotyle leucocephala*. **Phytochemistry**, v. 67, 1143-1150, 2006.

SILVA, M. L.; COÍMBRA, H. S.; PEREIRA, A. C.; ALMEIDA, V. A.; LIMA, T. C.; COSTA, E. S.; VINHÓLIS, A. H.; ROYO, V. A.; SILVA, R.; FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; FURTADO, N. A.;

- MARTINS, C. H.; CARVALHO, T. C.; BASTOS, J. K. Evaluation of Piper cubeba extract, (-)-cubebin and its semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 420–422, 2007.
- SUHARYANI, S.; JAYA, B. P. D. Assessment of the Cytotoxic Effects of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on MCF-7 and HeLa Cell Line. *Jurnal Media Kesehatan*, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2023.
- SUN, Y. S.; ZHAO, Z.; YANG, Z. N.; XU, F.; LU, H. J.; ZHU, Z. Y.; SHI, W. L.; JIANG, J.; YAO, P. P.; ZHU, H. P. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, v. 13, n. 11, p. 1387-1397, 2017.
- SUN, Y. et al. The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, p. 6923, 28 jun. 2021.
- TONG, F. et al. Comparative efficacy and safety of CDK4/6 inhibitors combined with endocrine therapies for HR+/HER2-breast cancer: Systematic review and network meta-analysis. **Heliyon**, v. 10, n. 11, p. e31583, 21 maio 2024.
- WANG, J.; WU, S.-G. Breast cancer: An overview of current therapeutic strategies, challenge, and perspectives. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, v. 15, n. 15, p. 721–730, out. 2023.
- WANG, Y.; PAN, K.; Li, J.; CHEN, Q. A função e o mecanismo da ferroptose no câncer. **Apoptosis** 25, 786–798, 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast cancer. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Acesso em: 12 nov. 2024.
- YARED, J. A., & TKAKZUK, K. H. R. (2012). Update on taxane development: new analogs and new formulations. **Drug Design, Development and Therapy**, 6, 371–384.
- YOSHIKI, Y., ISHIGURO, T. Crystalline constituents of hinoki oil. **Yakugaku Zasshi**, 53:73-151, 1933.