



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE SÃO PAULO

## Relatório Final Científico

**Estudo da Liberação Controlada de Óleos Essenciais sobre a Viabilidade Celular da  
Linhagem Tumoral de Melanoma Murino (B16F10) *in vitro***

**Processo FAPESP:** 2019/17253-5

**Período de Vigência:** 01/11/2019 a 23/12/2020

**Aluna:** Gabrielly de Paula Silva Ivanof

**Orientadora:** Profa. Dra. Elaine Conceição de Oliveira

-Dezembro 2020-

## 1. RESUMO DO PROJETO

A pele não é apenas uma barreira física entre o meio externo e os ambientes internos, mas tem a função de proteção ativa contra o *stress* causado por lesões, por infecções microbianas, radiação ultravioleta (UV) e toxinas presentes no meio ambiente. Por muito tempo, a pele foi reconhecida apenas como uma cobertura para os tecidos e órgãos internos, no entanto há uma complexa imunidade e tecidos linfóides associados à pele, sendo capazes de responder a diferentes agressões (MATEJUK, 2018; TSEPKOLENKO *et. al.*, 2019).

O câncer é uma doença causada por mutações genéticas que conferem às diferentes células do organismo algumas características que as diferem do tecido sadio. Estas células apresentam capacidade ilimitada de proliferação, deixam de responder a fatores que inibem o crescimento, não sofrem morte celular programada (apoptose), têm capacidade de invadir outros tecidos (metástases) e produzem novos vasos sanguíneos (angiogênese) (HANAHAN & WEINBERG, 2011; LO & FISHER, 2014).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia de pele oriunda de mutações genéticas que ocorrem nos melanócitos, se originam embriologicamente da crista neural, sendo normalmente presentes entre as células da camada basal da epiderme, porém, pode ser encontrado em outros locais do corpo. Todavia, como esta neoplasia está suscetível a sucessivas alterações no material genético durante seu desenvolvimento, como consequência tem como característica principal o alto potencial metastático, tornando assim, um câncer extremamente agressivo (SONDA, 2011; WAINSTEIN; BERLFORT, 2004).

Diante disso, as condutas terapêuticas utilizadas para tratar este tipo específico de câncer têm por finalidade eliminar ou conter a disseminação da massa tumoral através de diferentes técnicas como a cirurgia, que consiste na retirada do tumor com o objetivo de impedir a progressão tumoral; quimioterapia, que através da infusão de drogas quimioterápicas tem por finalidade destruir células tumorais em crescimento ou diminuir o seu potencial de diferenciação; radioterapia, que tem como base radiação ionizante aplicada diretamente sobre a massa tumoral, essa energia impede o crescimento do tumor pela destruição de células no local; a imunoterapia, que aborda a manipulação do sistema imunológico permitindo com que potencialize seus mecanismos efetores antitumorais; e as terapias direcionadas, que através de fármacos bloqueiam o crescimento ou disseminação da neoplasia (ALMEIDA; LOPES, 2016; TOLEDO, 2012; WAINSTEIN; BERLFORT, 2004; LOPES, 2018). No entanto, por mais que estes tratamentos tenham o intuito de atenuar ou eliminar o melanoma, o paciente acaba

sofrendo muito e, além disso, estas terapias não demonstram, em muitos casos, resultados tão promissores em longo prazo.

Assim, novas abordagens terapêuticas estão sendo estudadas com o intuito de fornecer novos possíveis tratamentos contra este tipo de câncer. Uma dessas abordagens se direciona ao uso de óleos essenciais (OEs), os quais são compreendidos como compostos químicos voláteis provenientes dos metabólitos secundários das plantas, sendo encontrados em diversas partes das mesmas. OEs apresentam diversas propriedades biológicas como ação larvicida, ação analgésica e anti-inflamatória, fungicida e atividade antitumoral. Devido a sua estrutura química, estas substâncias são caracteristicamente voláteis, o que dificulta observar os seus efeitos de forma mais prolongada.

O grupo de Imunologia de Tumores da Faculdade de Tecnologia de Sorocaba tem-se dedicado nos últimos anos a conhecer e estudar novas alternativas de tratamento de tumores, um deles é o uso de óleos essenciais no tratamento do melanoma. Já foram realizados estudos em que se obtiveram no final, dois trabalhos de graduação, nos quais foram possíveis de se demonstrar que os óleos essenciais *Lavandula angustifolia*, *Citrus limon* e *Melaleuca* apresentaram seu efeito antitumoral sobre a viabilidade de linhagens tumorais *in vitro*.

Diante do exposto, a finalidade deste trabalho foi avaliar a possibilidade de utilização da placa hidrocolóide, a qual é um curativo que auxilia no processo de cicatrização tanto de escaras quanto de feridas, como sendo um possível veículo de liberação controlada dos compostos voláteis dos OEs de maneira gradativa e prolongada. O intuito deste curativo será a aplicação pré-cirúrgica sobre a massa tumoral, permitindo a redução do tumor e a promoção de uma melhor remoção cirúrgica; quanto ao pós-cirúrgico, este mesmo curativo tem como objetivo eliminar células tumorais residuais contidas no ferimento, para que não ocorra assim uma provável recidiva no local da excisão cirúrgica.

## 2. OBJETIVO GERAL DO PROJETO

Avaliar o efeito volátil dos OEs de erva cidreira, lavanda, limão e *Melaleuca* adsorvidos a placa hidrocolóide sobre a linhagem celular de melanoma murino B16F10 *in vitro*.

### 2.1 Objetivos Específicos do Projeto

- Avaliar a sorção e liberação dos OEs em placas hidrocolóide de diferentes espessuras;
- Avaliar as propriedades mecânicas da placa hidrocolóide contendo os OEs através de ensaios de caracterização do material;

Efeitos *in vitro*

- Avaliar o efeito volátil dos OEs adsorvidos a placa hidrocolóide sobre a linhagem celular de melanoma murino B16F10 e a linhagem de fibroblasto L929 (células não tumorais) *in vitro*;
- Avaliar a viabilidade celular pelo ensaio de MTT e alterações morfológicas nas células por microscopia;
- Avaliar o tipo de morte celular (necrose ou apoptose);
- Avaliar a capacidade de migração celular;
- Avaliar quantitativamente a expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo (MHC-1 e PDL-1);
- Analisar as proteínas de sinalização intracelular total e fosforiladas (AKT, ERK1/2 e mTOR) pelo método de Western Blot;
- Avaliar pelo método de soft-ágar se ocorrerá o crescimento independente de ancoragem da linhagem celular melanoma murino B16F10 *in vitro*.

### 3. O QUE FOI REALIZADO NO PERÍODO

Durante o período de isolamento a Faculdade de Tecnologia de Sorocaba permaneceu fechada e não tivemos qualquer acesso ao laboratório de pesquisa até o final do mês de outubro. A revisão de literatura foi feita, porém não tínhamos resultados para o último relatório. Obtivemos autorização para retornar ao laboratório com o objetivo de cumprirmos o que fosse possível para o relatório final. Iniciamos com a limpeza e esterilização dos materiais e equipamentos, a permanência no laboratório era de um ou dois alunos respeitando o distanciamento social. Fizemos um plano para dar continuidade a alguns ensaios, porém as instituições onde seriam realizados, o uso dos equipamentos estava restrito ao enfrentamento do COVID-19.

Sendo assim, os avanços obtidos na parte prática e apresentada neste relatório ocorreram parte em novembro e em dezembro. Listamos abaixo o que foi possível realizar no período devido ao distanciamento social:

- Revisão de literatura sobre os assuntos que envolvem o projeto;
- Reapresentação de resultados anteriores juntamente com os novos, para contextualização e discussão;
- Avaliar através do ensaio *in vitro* de viabilidade celular pela técnica colorimétrica MTT da propriedade antitumoral e do efeito volátil dos óleos essenciais (erva cidreira, lavanda, limão e *Melaleuca*) sorvidos na placa hidrocólóide sobre as linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) e de fibroblasto murino (L929);
- Avaliação da sorção dos óleos essenciais (erva cidreira, lavanda, limão e *Melaleuca*) em placas hidrocólóides de duas espessuras diferentes, sendo uma nomeada como fina (1,06 mm) e a outra denominada como grossa (1,92 mm);
- Efeito da volatilidade dos OEs (erva cidreira, lavanda, limão e *Melaleuca*) sorvidos na placa hidrocólóide *in vitro*: viabilidade celular pela técnica colorimétrica MTT das linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) e de fibroblasto murino (L929);
- Avaliar através de ensaios de caracterização de material (ensaios de FTIR, tração e avaliação de superfície) as propriedades mecânicas da placa hidrocólóide sorvida com os óleos essenciais de erva cidreira, lavanda, limão e *Melaleuca*;
- Avaliação da liberação controlada dos óleos essenciais (erva cidreira, lavanda, limão e *Melaleuca*) isolados e posteriormente sorvidos na placa hidrocólóide;
- Participação e apresentação de trabalho no Simpósio de Iniciação Científica da Fatec São Paulo (SICT 2020) em novembro de 2020;

- Realização de curso extracurricular de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Elaboração do trabalho monográfico como requisito para a formação do Curso de Tecnologia em Sistemas Biomédicos, o trabalho apresentado recebeu nota 9,7 (média de dois avaliadores).

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Pele

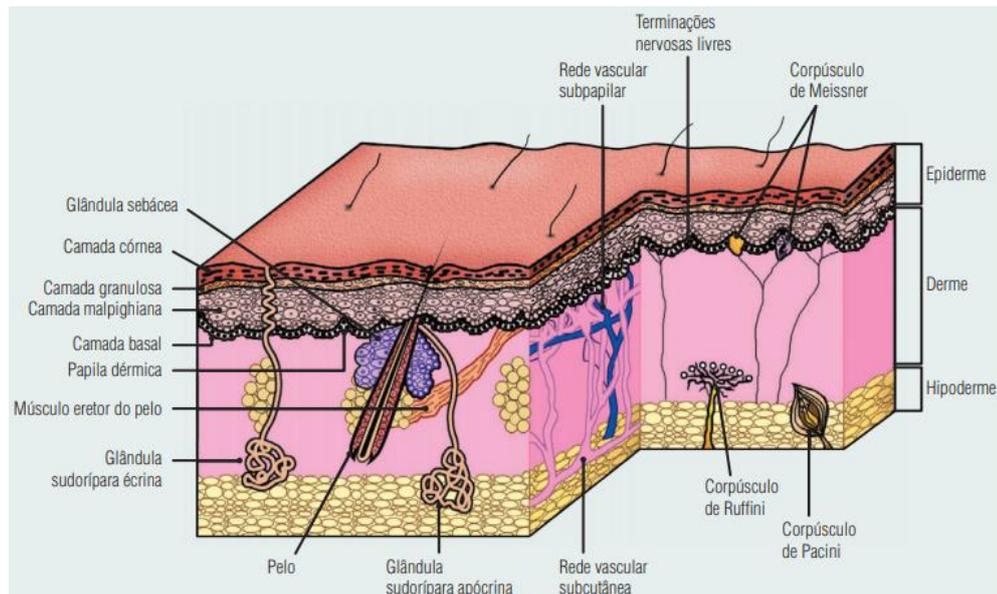
O corpo humano é formado por um conjunto de sistemas que trabalham de maneira a garantir o funcionamento adequado do organismo, permitindo certificar a constante manutenção do equilíbrio interno. Esses sistemas, por sua vez, são constituídos por uma diversidade de órgãos, os quais são formados pelo agrupamento de diferentes tecidos e células (DANTAS *et. al.*, 2009; MONTANARI, 2016).

A pele, ou *cútis*, é um órgão que recobre a superfície do corpo, dispondo de uma composição complexa e estrutura própria, a qual se caracteriza por apresentar diversos tipos de tecidos, tipos celulares e estruturas especializadas, distribuídos em camadas interdependentes (CESTARI, 2012). Ela é considerada o maior órgão humano e o maior sistema de órgãos expostos ao meio ambiente, em virtude de que sua extensão corresponde a uma área de dois metros quadrados e representa aproximadamente 15% do peso corporal (CESTARI, 2012; MEDONÇA; RODRIGUES, 2011).

A pele apresenta diversas funções essenciais para a vida e, dentre elas, pode-se destacar a contribuição com a manutenção da homeotermia, como barreira imunológica, responsável pela percepção sensorial pela disposição de fibras nervosas sensitivas em toda a sua extensão, a proteção contra agressões exógenas (como químicas, físicas ou biológicas) e contra a perda de água e de proteínas para o meio externo, entre outras funções. Este órgão é formado por tecidos de origem embriológica ectodérmica e mesodérmica, composto histologicamente por três camadas, sendo elas: epiderme, derme e hipoderme (CESTARI, 2012; MENDONÇA; RODRIGUES, 2011; Ministério da Saúde, 2002).

A figura 1 ilustra a estrutura do maior órgão do corpo humano.

Figura 1 – Estrutura da pele.



Fonte: RIVITTI, 2014.

A epiderme, representa a camada superficial de origem ectodérmica, composta por um tecido epitelial avascular estratificado e queratinizado, o qual possui na superfície células justapostas umas às outras cobertas por queratina. Essa camada superficial é subdividida em cinco camadas, as quais são: camada basal (ou estrato germinativo), camada espinhosa (ou estrato de Malpighi), camada granulosa, camada lúcida e camada córnea (CESTARI, 2012; MENDONÇA; RODRIGUES, 2011; BERNARDO *et. al.*, 2019).

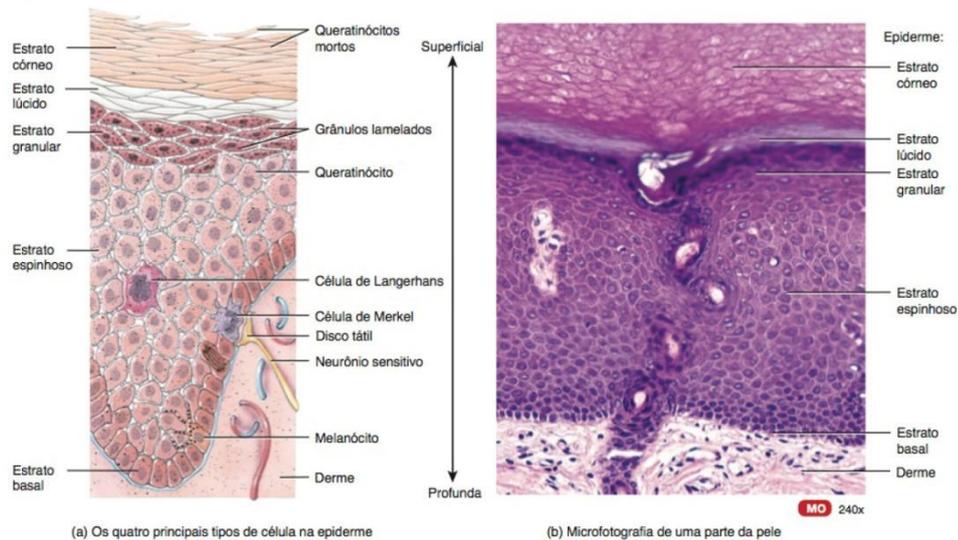
- Camada córnea – é a porção superficial da pele, constituída por células queratinizadas mortas empilhadas. Esta camada é a principal barreira contra agentes externos, além de estar envolvida na regulação da perda de água para o meio externo (CESTARI, 2012; BARBOSA, 2011; BERNARDO *et. al.*, 2019).
- Camada lúcida – é a zona em que se localiza as células achatadas, sem núcleo, com aspecto homogêneo e translúcido. Está presente em sua constituição a eleidina, que consiste em uma substância gelatinosa que impede a entrada e saída de água e que, posteriormente, origina a queratina. Como essa camada é muito fina, normalmente, se encontra na pele com folículos pilosos ausentes, como as palmas e plantas (CESTARI, 2012; BARBOSA, 2011; BERNARDO *et. al.*, 2019).
- Camada granulosa – é a porção composta por células que produzem e armazenam em seu interior grânulos de lipídios e proteínas, os quais ocupam e liberam estes grânulos nos espaços intercelulares, além de terem outros componentes importantes para a morte

programada das células (CESTARI, 2012; BARBOSA, 2011; BERNARDO *et. al.*, 2019).

- Camada espinhosa – é composta por células poliédricas que se tornam achatadas à medida que se aproximam da superfície, estas células estão justapostas por junções intercelulares (CESTARI, 2012; BARBOSA, 2011; BERNARDO *et. al.*, 2019).
- Camada basal – é a última camada, sendo a mais profunda e possui células que se dividem constantemente por mitose. As células que compõem esta última camada da epiderme são os queratinócitos, que desencadeiam reações imunológicas na pele a partir da produção de citocinas; melanócitos, células que contêm pigmentos de melanina com a finalidade protetora contra a radiação ultravioleta; células de Langerhans, que são responsáveis pela ativação do sistema imunológico atuando como macrófagos contra partículas estranhas e microrganismos; células de Merkel, que atuam na proliferação de queratinócitos, bem como atuam na percepção de tato e pressão (CESTARI, 2012; BARBOSA, 2011; BERNARDO *et. al.*, 2019).

A figura 2 apresenta uma ilustração esquemática da subdivisão da camada epiderme.

Figura 2 – Camadas da epiderme. (a) os quatro principais tipos de célula na epiderme; (b) microfotografia de uma parte da pele.



Fonte: TORTORA; NIELSEN, 2013.

Entre a epiderme e a derme situa-se a zona da membrana basal, a qual adere a epiderme por meio da junção dermo-epidérmica. Deste modo, a derme é a camada intermediária com origem mesodérmica, formada pelo tecido conjuntivo denso frouxo composto de proteínas

fibrosas como colágeno e elastina, e pelos tecidos nervoso e sanguíneo, além dos anexos cutâneos como glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos, os quais se acomodam pela substância amorfa, sendo que esta substância permite a adesão de diversos componentes do meio extracelular (CESTARI, 2012; BARBOSA, 2011; BERNARDO *et. al.*, 2019).

Por fim a última camada e mais profunda da pele é a hipoderme, considerada como um órgão endócrino, é concebida pelas células adiposas, pelo colágeno e pelas estruturas nervosas, vasculares e linfáticas. Tem como funções principais o isolamento térmico, a proteção mecânica, atua como reserva energética, bem como modela o corpo do indivíduo (CESTARI, 2012; BARBOSA, 2011; Ministério da Saúde, 2002; BERNARDO *et. al.*, 2019).

Perante a essas informações acerca desse órgão dinâmico, o mesmo apresenta uma composição complexa de estruturas, como os tecidos e os tipos celulares especializados, que permitem com que esse órgão atue em funções extremamente essenciais para a vida.

No que diz respeito as células eucariontes presentes na composição da *cútis*, estas são organizadas por três estruturas, sendo elas a membrana plasmática, o citoplasma e a carioteca. A membrana plasmática é um envoltório que separa os meios interno e externo da célula e tem como funções o revestimento celular, a proteção e a permeabilidade seletiva. O citoplasma é uma região de intensa atividade metabólica preenchida por uma substância gelatinosa que contém as organelas citoplasmáticas, cada qual tem uma função específica. Por fim, a carioteca é uma membrana que envolve em seu interior o material genético, sendo este de extrema importância para a vida celular, pois transmite informações necessárias para inicializar a síntese de proteínas, o que conseqüentemente, promove a sua replicação. Contudo, algumas células acabam sofrendo algumas alterações genéticas, resultando em uma transmissão de informações incoerentes para as células descendentes, de modo que começam a crescer de maneira descontrolada, formando uma massa de células cancerígenas, que propicia a ocorrência de uma neoplasia (DANTAS *et. al.*, 2009; MONTANARI, 2016).

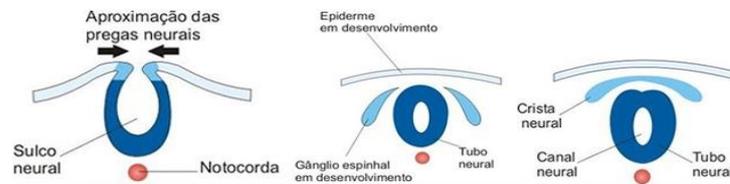
No que tange a neoplasia de pele, esta afeta diretamente as células sadias situadas na *cútis*, como por exemplo, os melanócitos, os quais são responsáveis por garantir a proteção do material genético, armazenado no interior do núcleo, contra as radiações solares.

#### 4.1.1 Melanócitos

Referente as células melanocíticas, estas são embriologicamente derivadas de uma população germinativa de melanoblastos oriundos de células da crista neural, pouco tempo após o fechamento do tubo neural, como está sendo ilustrado na figura 3. Estes melanoblastos são

células despigmentadas, mas que contém um potencial para produzir a melanina, e migram do tronco da crista neural até seu destino na camada basal da epiderme ou folículo piloso (OLIVEIRA; JUNIOR, 2003; BRANQUINHO, 2019; SILVA, 2016).

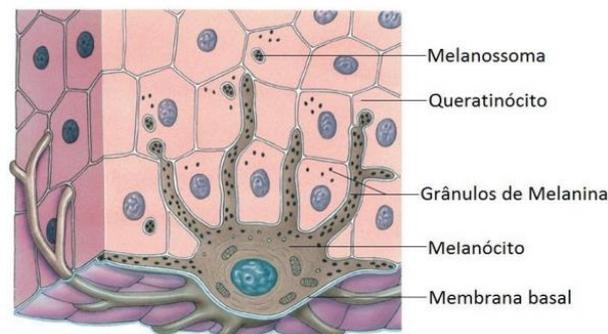
Figura 3 – Formação do tubo neural.



Fonte: FRANCO, c2020.

Citologicamente, os melanócitos possuem um corpo celular cúbico com prolongamentos ramificados em formato dendrítico por entre vários queratinócitos, facilitando a transferência de grânulos de melanina. Isso pode ser observado na figura 4, a qual ilustra um desenho esquemático do melanócito (SILVA, 2016).

Figura 4 – Desenho esquemático do melanócito.



Fonte: SILVA, 2016.

A melanogênese é um processo de síntese da proteína melanina que fornece a pigmentação da pele, o qual ocorre no interior de organelas denominadas de melanossomos das células melanocíticas. Esse processo envolve uma via metabólica complexa onde ocorre diversas reações químicas em que depende da síntese da melanina pelos melanócitos da epiderme, da transferência deste pigmento para os queratinócitos presentes na epiderme e da secreção de fatores pró-melanogênicos por fibroblastos que estão na derme (OLIVEIRA; JUNIOR, 2003; BRANQUINHO, 2019; SILVA, 2016).

A melanina citada no parágrafo anterior, consiste em uma proteína sintetizada a partir da oxidação do aminoácido essencial, tirosina, pelas células denominadas de melanócitos. Esse pigmento tem como finalidade garantir a proteção do material genético contra as radiações solares. Existem uma subdivisão desse pigmento produzido no interior dos melanossomos, os quais são: a eumelanina e a feomelanina. A eumelanina é uma proteína que apresenta uma variação colorimétrica de marrom a negro, enquanto a feomelanina contém uma pigmentação vermelho-amarelo. A mistura de ambos determina a coloração tanto da pele quanto do cabelo (BRANQUINHO, 2019; SILVA, 2016).

O número respectivo de melanócitos em um indivíduo é sempre similar ao de qualquer outro, contudo, a coloração da pele é determinada pela quantidade, tamanho e distribuição dos grânulos de melanina, os quais são fatores geneticamente determinados (SILVA, 2016).

#### 4.2 Neoplasia

As células sadias que compõem os tecidos do corpo humano têm a capacidade de se multiplicar por meio de um processo contínuo que é natural. Um grupo preponderante de células normais cresce, multiplica-se e morre de maneira ordenada, no entanto, nem todas sofrem esse processo, como é o caso dos neurônios que não se dividem de forma rápida e contínua em comparação com as células do tecido epitelial (INCA, 2018).

Todavia, algumas células acabam perdendo o controle de sua divisão celular resultando na formação de células anormais. Essa transformação de células sadias em células malignas pode ser decorrente de modo espontâneo ou induzido por agentes carcinógenos (químicos, físicos ou virais). Essas células começam se dividir de maneira rápida, agressiva e incontrolável, podendo expandir para outras localidades do corpo, acarretando transtornos funcionais. Essa ação desorganizada é acometida por células neoplásicas (INCA, 2018).

A neoplasia comumente conhecida pela palavra câncer, representa um problema de saúde pública mundial, visto que se enquadra na segunda principal causa de morte, sendo apenas ultrapassada pelas enfermidades acometidas no sistema cardiovascular. Todavia, espera-se que o número de mortes relacionadas às neoplasias supere as doenças cardiovasculares nos próximos anos (AIRES; GUEDES, 2018).

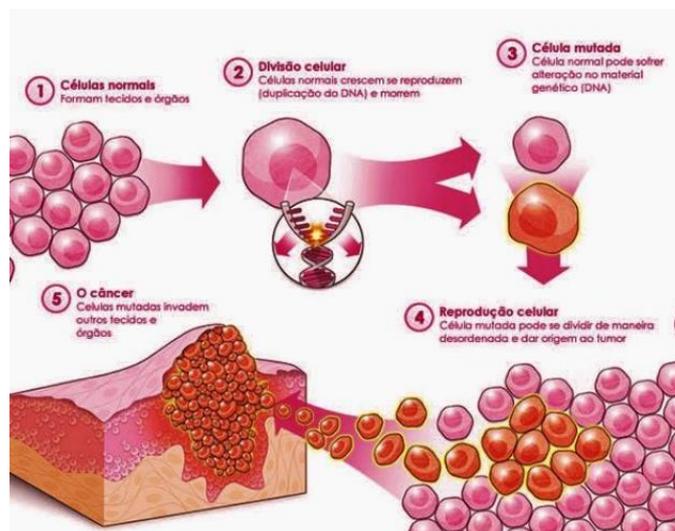
O câncer é um termo genérico que abrange um conjunto de doenças, sendo consequente de falhas no mecanismo que normalmente controlam o crescimento e proliferação das células, desencadeando em células que podem invadir e se expandir para outros órgãos do corpo de não origem, processo denominado como metástase, que afeta qualquer parte do corpo, resultando

portanto, em um desequilíbrio na homeostase corporal (LOPES; CHAMMAS; IYAYASE, 2013; SALEH, 2017).

Apesar das células cancerígenas se originarem de células saudáveis, elas se diferenciam desta por apresentarem mecanismos ineficientes de controle de proliferação celular, instabilidade gênica e cromossômica, desregulação nos mecanismos de apoptose, além de adquirir a capacidade de invasão e crescimento em locais distantes de sua origem (SANTOS, 2010).

A figura 5 ilustra esquematicamente o processo de oncogênese, isto é, a formação de células tumorais.

Figura 5 – Processo da oncogênese.



Fonte: MELO, 2014.

Preponderantemente, os tumores são originados por danos nos genes de uma única célula ou por uma alteração na expressão proteica de uma célula com material genético normal. Normalmente, a célula possui mecanismos de controle do ciclo celular que permitem que durante o processo de processo de replicação evitam com que o material genético alterado seja transmitido para as células filhas assegurando que estas possam ter um material genético idêntico da célula mãe. Contudo, quando uma célula defeituosa escapa desse mecanismo *check up*, ela pode avançar em seu desenvolvimento através de uma proliferação descontrolada, o que consequentemente, resulta em um clone de células tumorais (LIMA, 2010).

Estes tumores por sua vez são constituídos por dois componentes: um tumoral e um estromal. O componente tumoral tem como característica a presença de células tumorais,

enquanto o componente estromal compreende de células não tumorais do próprio tecido, como células do sistema imune, fibroblastos e células endoteliais; da matriz extracelular, a qual é composta por colágeno, elastina, proteoglicanos, fibronectina e entre outros; e de vasos sanguíneos e linfáticos, e nervos (SALEH, 2017).

Estes componentes, em conjunto, formam o microambiente tumoral, o qual envolve interações entre células tumorais e os diferentes componentes do estroma, promovendo a realização de sinalizações necessárias para a ativação de fatores de transcrição, com o intuito de induzir a expressão de genes que promovem a proliferação e migração celular para um novo ambiente tumoral (SALEH, 2017).

Em virtude da massa tumoral, esta possui uma organização extremamente complexa e heterogênea, o que permite ser utilizada como base para o diagnóstico patológico neoplásico. A classificação é baseada de acordo com a localização do tecido primário acometido por esse crescimento e proliferação descontrolados, para que, posteriormente, ocorra a especificação do tumor, benigno ou maligno, e a morfologia do mesmo, como exemplo, o melanoma cutâneo (LOPES; CHAMMAS; IYAYASE, 2013; SALEH, 2017).

#### 4.2.1 Imunologia tumoral

O corpo humano está exposto diariamente a diversos agentes que entram em contato com as diferentes barreiras e estruturas do organismo. Cabe ao sistema imunológico, responsável pela detecção dos tais agentes, produzir uma resposta imunológica para o combate e eliminação dessas substâncias estranhas, tornando-se um importante mecanismo de proteção ao surgimento e progressão de diversas doenças, entre elas a neoplasia (SANTOS, 2015).

Foi observado há mais de cem anos pelos patologistas a presença de células inflamatórias no microambiente tumoral (NECKEL *et. al.*, 2008). Estudos vêm demonstrando uma importância da crescente atuação de células imunológicas e de seus produtos no tecido neoplásico. A infiltração de substâncias e células inflamatórias no interior do tumor interfere no desenvolvimento e na progressão do mesmo, e isso retrata que não somente o câncer constitui um microambiente, mas que ainda estaria inserido em um macroambiente, nesse caso, o organismo, no qual é composto por diferentes células, entre elas, as células imunológicas que irão migrar para o tumor e passar a compor seu estroma, influenciando dessa maneira na sobrevivência e proliferação celular, na angiogênese, no remodelamento tecidual, no metabolismo e na integridade genômica do tumor (NECKEL *et. al.*, 2008; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

A atuação do sistema imunológico sobre as células tumorais pode ser concebida em duas circunstâncias: previamente à existência da célula tumoral e, posteriormente, durante a instalação e progressão tumoral, incorporado ao microambiente tumoral. No que diz respeito ao surgimento de células tumorais em locais caracterizados pela intensa presença de células imunes, as principais explicações para a ocorrência disso são que (NECKEL *et. al.*, 2008; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010):

- Regeneração tecidual contínua situada na resposta inflamatória, leva a uma maior chance de ocorrência de mutação, o que conseqüentemente, induz a uma proliferação dessas células mutadas (NECKEL *et. al.*, 2008; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010);
- Criação de uma microrregião mutagênica a partir da síntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas células imunes recrutadas (NECKEL *et. al.*, 2008; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010);
- E a promoção de angiogênese, presente em processos inflamatórios, é descrita como uma alteração fundamental para o desenvolvimento de tumores (NECKEL *et. al.*, 2008; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Estes mecanismos, relacionados diretamente com à inflamação, contribuem para o surgimento de malignidade nas células mais próximas (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

#### 4.3 Melanoma Cutâneo

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano são diagnosticados 132.000 novos casos de melanoma cutâneo no mundo. No ano de 2018, cerca de um total de 6.260 novos casos de melanoma maligno foram estimados no Brasil com, aproximadamente, 78% dos casos nas regiões Sul e Sudeste. Conquanto que o melanoma não esteja inserido entre os tumores malignos com maior incidência, é considerado o tipo mais agressivo de câncer de pele devido apresentar um elevado potencial de metastático e conseqüente elevada letalidade (Ministério da Saúde, 2019; NIEZGODA *et. al.*, 2015).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia de pele oriunda de mutações genéticas que ocorrem nos melanócitos, que por sua vez, se originam embriologicamente da crista neural, sendo normalmente presentes entre as células da camada basal da epiderme. Pode também ser encontradas em outros locais do corpo devido à migração que ocorre das células da crista neural, tais como pele ou mucosas, nas formas de manchas, pintas ou sinais. Em indivíduos de pele negra, ele é mais comum nas áreas claras, como palmas das mãos e plantas dos pés. Contudo, devido ao fato de neoplasia ser suscetível a sucessivas alterações genéticas durante seu

desenvolvimento, sua característica principal é o alto potencial metastático, tornando assim, um câncer extremamente agressivo (SONDA, 2011; WAINSTEIN; BERLFORT, 2004).

A figura 6 ilustra o melanoma cutâneo extensivo.

Figura 6 – Melanoma cutâneo.



Fonte: Grupo Brasileiro de Melanoma, c2020.

Os fatores de risco que contribuem para auxiliar no processo de desenvolvimento desta neoplasia podem ser tanto genéticos quanto ambientais. Dentre eles a exposição solar consiste em um dos principais fatores de risco, uma vez que à radiação ultravioleta está diretamente associada ao aumento da incidência deste tipo de câncer. Esse assunto vem sendo extensivamente discutido bastante devido à preocupação mundial com o aquecimento global, uma vez que a camada de ozônio vem sendo destruída pelas substâncias químicas produzidas pelo homem, fato responsável pelo aumento da incidência dos raios ultravioleta, e, conseqüentemente, pelo aumento de novos casos no decorrer dos anos. Além disso, outros fatores como o histórico familiar de melanoma, indivíduos com nevo congênito, xeroderma pigmentoso ou nevo displásico apresentam uma predisposição genética ao melanoma, assim como indivíduos imunossuprimidos (MÂNICA; LANG, 2017; RIBEIRO, 2008; VICENTE, 2016; SANTOS, 2017).

A classificação do melanoma é baseada na progressão tumoral, relacionada ao crescimento tumoral, que pode ser de duas formas: radial e vertical. Na fase inicial do câncer, em que ocorre o crescimento radial, não se tem incidências de invasões na derme e nos vasos sanguíneos, diferentemente da fase seguinte, em que ocorre o crescimento vertical, no qual se caracteriza por esta invasão, podendo propiciar a incidência de metástases. Com base neste conceito, os tipos histológicos de melanoma podem ser subdivididos em: melanoma extensivo

superficial, em que é caracterizado por uma fase de crescimento radial; melanoma lentigo maligno, em que apresenta um crescimento radial por longo período antes de invadir propriamente o tecido; melanoma nodular, que tem como característica um crescimento vertical de forma rápida, provocando assim as metástases; e melanoma lentiginoso acral, que tem como característica ser localizado nas palmas das mãos, plantas dos pés e sob as unhas (VICENTE, 2016; RIBEIRO, 2008; MÂNICA; LANG, 2017; SANTOS, 2017).

A figura 7 ilustra os tipos histológicos de melanoma.

Figura 7 – Desenhos esquemáticos ilustrando os tipos histológicos de melanoma cutâneo. (a) e (b) apresentam os quatro tipos histológicos de melanoma.



Fonte: Adaptado de Revista Abrale, 2019; LOTÉRIO, c2005.

Apesar de representar apenas 4 % dos casos de câncer de pele, o melanoma é considerado a forma mais grave devido seu alto potencial de produzir metástases, em que se o indivíduo não for diagnosticado nos estágios iniciais, a taxa de sobrevivência acaba sendo diminuída drasticamente. O órgão mais frequentemente acometido pela disseminação metastática do melanoma é o pulmão. Embora a incidência mundial de melanoma seja baixa, a mesma vem crescendo repentinamente nos últimos anos, o que permitiu a realização de estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* com o objetivo de entender melhor o comportamento biológico dessa neoplasia. No caso dos estudos *in vitro* geralmente se utilizam a linhagem de melanoma murino B16F10, pois é uma linhagem celular bem agressiva e que possui uma grande capacidade de gerar metástase pulmonar (SILVA *et. al.*, 2013; POTEZ *et. al.*, 2018).

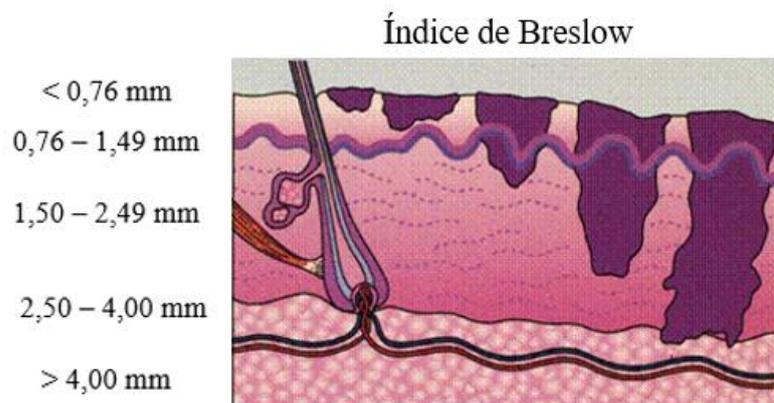
#### 4.4 Prognóstico e Condutas Terapêuticas Contra o Melanoma Cutâneo

A avaliação prognóstica do melanoma se baseia na análise de parâmetros clínicos, como a idade, sexo, diâmetro da lesão, local de acometimento e ulceração, e parâmetros histológicos, como os subtipos, níveis de invasão de Clark, índice de Breslow, situação das margens de segurança, índice de mitoses, fase de progressão tumoral, presença de infiltrado linfocitário, invasão neural, angiolinfática e regressão tumoral (COSTA, 2008).

Dentre estes inúmeros parâmetros citados no parágrafo anterior, o índice de Breslow e níveis de invasão de Clark, são os mais utilizados, hodiernamente, para se prever o risco de desenvolvimento de metástases em melanoma cutâneo (COSTA, 2008).

- Índice de Breslow (estadiamento vertical) – esse índice determina a espessura tumoral do melanoma cutâneo. Pacientes com lesões de espessura  $< 0,75$  mm possuem prognóstico excelente, ao contrário daqueles com lesões de espessura  $> 3$  mm. Esse índice classifica da seguinte maneira: Tis (*in situ*), TI (até 0,75 mm), TII (de 0,75 mm até 1,5 mm), TIII (de 1,5 mm até 3 mm), TIV (de 3 mm até 4 mm) e TV (acima de 4 mm) (PINHEIRO *et. al.*, 2003). A figura 8 mostra um desenho esquemático do sistema de classificação do índice de Breslow.

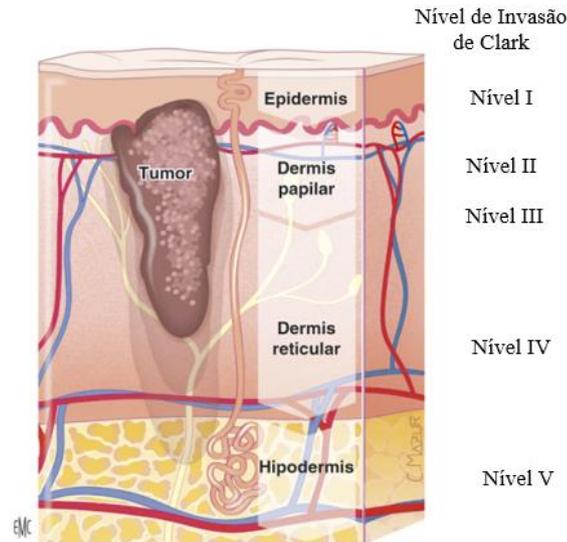
Figura 8 – Classificação da progressão vertical do melanoma cutâneo pelo índice de Breslow.



Fonte: Adaptado de ANGELOTTI, c2020.

- Níveis de invasão de Clark (nível de invasão) – esse nível é dividido em: estágio I, lesões intra-epidérmicas e epitélio anaxial; estágio II, invasão até a derme papilar; estágio III, preenche toda a derme reticular, sem a invadir; estágio IV, invasão da derme reticular; estágio V, invasão da hipoderme (PINHEIRO *et. al.*, 2003). A figura 9 ilustra um desenho esquemático de como é realizado o parâmetro de Clark.

Figura 9 – Classificação o nível de invasão de Clark.

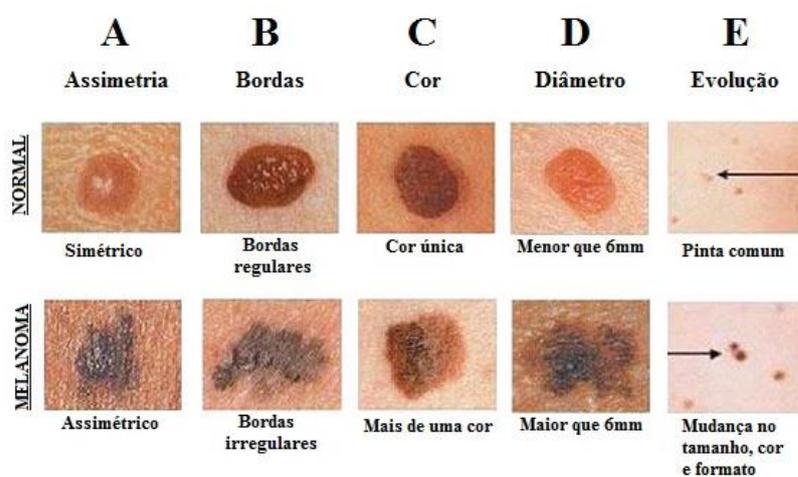


Fonte: Adaptado de PLANA *et. al.*, 2017.

Ademais, como o melanoma se origina a partir da pele, há o aparecimento de uma pinta relativamente escura com bordas irregulares ou se tem o aparecimento de uma lesão pigmentada que sofre algumas alterações em suas características. Diante disso, foi criado o sistema "ABCDE" para a detecção precoce dos melanomas, em que a letra "A" relaciona a assimetria, a letra "B" se refere a bordas, a letra "C" alude a coloração, a letra "D" menciona o diâmetro, e a letra "E" indica evolução (SANTOS, 2017).

A figura 10 ilustra o sistema de reconhecimento do melanoma através das siglas ABCDE.

Figura 10 – Sistema ABCDE do melanoma.



Fonte: Laboratório Biomarker, c2020.

Em relação à conduta terapêutica utilizada para o melanoma, esta dependerá do estágio da neoplasia e sua localização. Diferentes técnicas são utilizadas para tentar eliminar ou conter a disseminação do melanoma: a cirurgia, para a retirada do tumor e avaliação dos linfonodos próximos; a quimioterapia, que tem como base a infusão de drogas citotóxicas; a radioterapia, que tem como base a radiação ionizante; a imunoterapia, que aborda a manipulação do sistema imune permitindo que seus mecanismos efetores antitumorais sejam potencializados; e as terapias direcionadas, também conhecidas como terapias alvo, em que fármacos bloqueiam o crescimento ou disseminação da neoplasia, interferindo em moléculas específicas que estão envolvidas no crescimento, progressão e disseminação do câncer (ALMEIDA; LOPES, 2016; TOLEDO, 2012; WAINSTEIN; BERLFORT, 2004; LOPES, 2018).

A figura 11 ilustra as possíveis opções terapêuticas utilizadas para combater o melanoma cutâneo.

Figura 11 – Condutas terapêuticas utilizadas para o tratamento contra o melanoma cutâneo.



Fonte: Cancro online, c2020.

No entanto, por mais que esses tratamentos e o pós-tratamentos tenham o intuito de atenuar e eliminar o melanoma, existem circunstâncias em que o paciente corre um grande risco de desenvolver recidiva local. Se ele não for devidamente avaliado a taxa de sobrevida acaba sendo diminuída significativamente (ALMEIDA; LOPES, 2016; TOLEDO, 2012; WAINSTEIN; BERLFORT, 2004; LOPES, 2018).

A primeira providência após o melanoma cutâneo ser diagnosticado por meio de uma biópsia e avaliação histopatológica, é a remoção cirúrgica do tumor (FLORES *et. al.*, 2019). É comum o médico aumentar a margem de tecido a ser retirado envolta do melanoma, para garantir que células tumorais não permaneçam no local. Porém, dependendo do tamanho do tumor, esta margem se torna grande demais, podendo comprometer a integridade dos tecidos próximos, pois o tecido tumoral não retirado, mesmo que em pequena quantidade, pode gerar um novo tumor no mesmo local. As implicações deste novo processo podem ser letais, devido

ao processo inflamatório local que propiciará um rápido crescimento, formação de novos vasos sanguíneos e metástase, mesmo sendo descoberto precocemente (THAM *et. al.*, 2015).

Então, novas alternativas de tratamento estão sendo estudadas visando fornecer possíveis terapias contra este tipo de neoplasia antes e após a ressecção cirúrgica (SANTOS, 2017). O uso de plantas medicinais tem sido estudado com finalidade de analisar as propriedades que elas possam oferecer para a intervenção de diferentes tipos de neoplasias.

#### 4.5 Plantas Mediciniais

O uso de plantas com finalidade médica para tratamento e prevenção de enfermidades, é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade, as quais fazem parte da prática da medicina popular.

O estudo das plantas medicinais é exercido pela ciência denominada Fitoterapia, que através da origem no conhecimento e no uso popular, utiliza produtos de procedência vegetal, com finalidade terapêutica, para prevenir, atenuar algum estado patológico (GARLET, 2019). A utilização das plantas medicinais para fins terapêuticos está associada ao conhecimento popular empírico, em que vem sendo reconhecido e incorporado ao conhecimento científico, gradativamente (CARVALHO; CONCEIÇÃO, 2015).

Hodiernamente, muitos fatores têm contribuído para que ocorra o aumento da utilização deste recurso, dentre eles, o difícil acesso da população à assistência médica, os efeitos colaterais consequente do uso crônico de fármacos industrializados, o elevado consumo por produtos naturais, além da tendência ao uso da medicina integrativa e abordagens no que se refere aos conceitos de saúde e bem-estar (Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2019).

As plantas, em sua generalidade, para garantirem a sua sobrevivência produzem compostos químicos provenientes de seu metabolismo, os quais são imprescindíveis para o seu desenvolvimento, sendo estes distinguidos em: metabólitos primário e secundário. O metabólito primário está associado a processos fotossintéticos que originam compostos envolvidos nos processos vitais do vegetal, como lipídios, hidratos de carbono e proteínas. Por sua vez, o metabólito secundário é originado a partir do metabólito primário, sendo próprio para cada espécie de planta, e fornece várias funções como a proteção das plantas contra potenciais pragas ou infecções através da sua ação inseticida, antibacteriana e antifúngica; por meio de seus odores e sabores fortes conseguem afastar animais herbívoros; e permite atrair determinados insetos

para que estes possam retirar da planta o seu pólen e assim facilitar o processo de polinização (MORETTO; BUENO; MORAIS, 2015; FERREIRA, 2014).

#### 4.5.1 Óleos Essenciais

Os compostos oriundos dos metabólitos secundários são denominados de óleos essenciais, representados na figura 12, os quais são encontrados em diversas partes da planta, como nas folhas, nas flores, no caule, nas raízes, nas sementes, entre outras estruturas (MORETTO; BUENO; MORAIS, 2015).

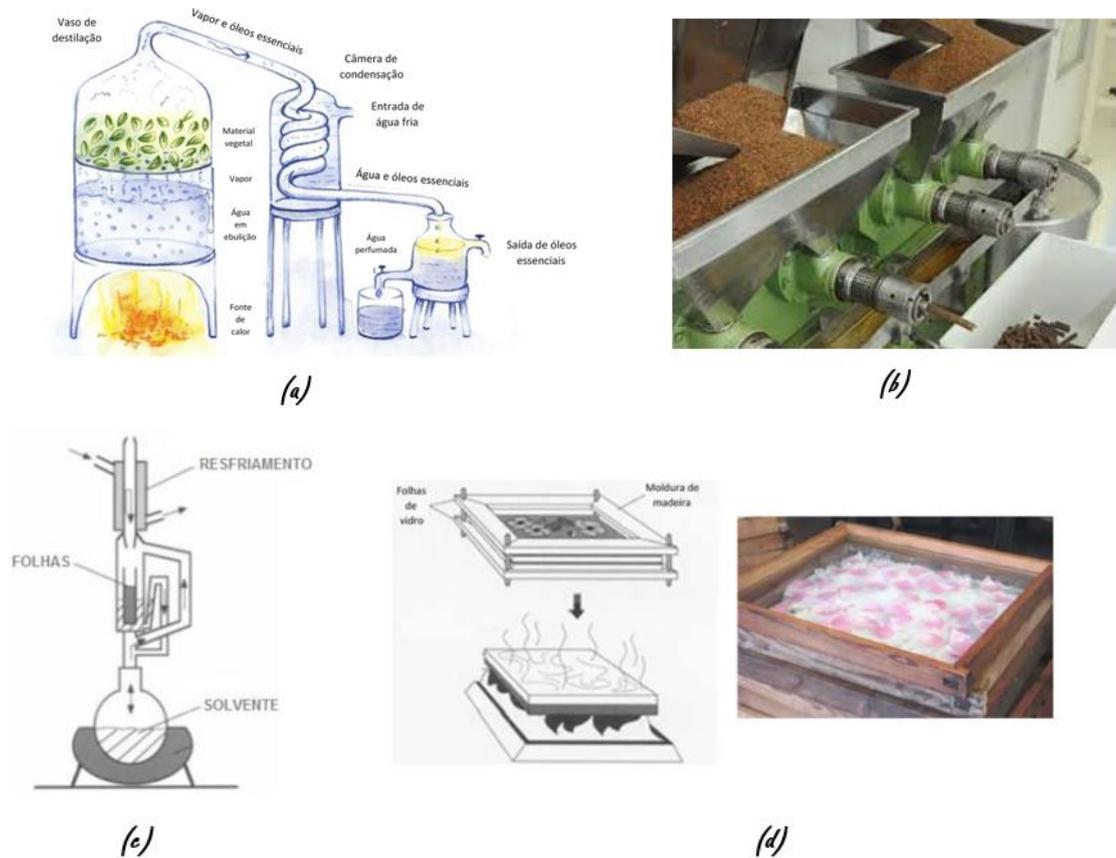
Figura 12 – Óleos essenciais.



Fonte: Amvi Cosméticos Naturais, 2017.

Os óleos essenciais podem ser extraídos através de processos como a destilação fracionada a vapor e a destilação a vapor com vácuo; prensagem a frio; hidrodestilação; enfloração; extrações por solventes e por fluídos supercríticos. Além disso, possuem diversas funções, podendo agir como hormônios, reguladores e catalisadores (MORETTO; BUENO; MORAIS, 2015). A figura 13 ilustra os principais processos de extração de óleos essenciais.

Figura 13 – Processos de extração dos óleos essenciais. (a) destilação a vapor; (b) prensagem a frio; (c) extração por solventes orgânicos; e (d) extração por enfloração.



Fonte: Adaptado de BetaEQ, 2019; FELIZARDO, 2017; Vital Batman, 2020.

A composição química dos OEs é extremamente complexa, sendo constituída de elementos químicos simples, como hidrocarbonetos e oxigênio, além das ligações químicas com moléculas orgânicas como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres, terpenos, óxidos, ácidos orgânicos e compostos orgânicos nitrogenados e sulfurados. Contudo, devido os OEs serem quimicamente complexos, isso permite que tenham diferentes características como aromas naturais, devido ao aroma da planta que o produz; pureza, pois não contém nenhum solvente ou qualquer substância química; consistência oleosa, sendo insolúveis em água; voláteis, por possuírem compostos orgânicos voláteis na sua estrutura, o que permite que evapore à temperatura ambiente (MORETTO; BUENO; MORAIS, 2015).

Os OEs possuem propriedades farmacológicas que apresentam vantagens de maneira análoga a outros medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que permite o uso ideal em nebulizações, banhos de imersão ou em inalações. Além disso, apresentam diferentes propriedades biológicas como ação larvicida, atividade antioxidante, ação analgésica e anti-

inflamatória, fungicida e atividade antitumoral (MORETTO; BUENO; MORAIS, 2015). No entanto, a maior parte das plantas aromáticas apresentam toxicidade, sendo assim, os OEs carregam essa característica. Sendo assim, para que a aplicação terapêutica dos OEs seja adequada, é necessário que os óleos puros sejam diluídos, para que assim minimize efeitos como a irritação local no indivíduo (ANDREI; COMUNE, 2005).

Diferentes OEs estão sendo estudados como uma possibilidade de serem utilizados para o tratamento neoplásico, como são os casos dos óleos essenciais de erva cidreira, lavanda, limão e *Melaleuca*, os quais serão descritos posteriormente.

#### 4.5.2 Óleo Essencial de Erva Cidreira (*Lippia alba*)

A erva cidreira é uma planta medicinal nativa da América do Sul pertencente à família Verbenaceae, conhecida por diversos nomes populares, como erva cidreira de arbusto, erva cidreira do campo, alecrim do campo, alecrim selvagem, cidreira brava, cidró, erva cidreira brasileira, e entre outros (CAMILLO, 2016; BIASI; COSTA, 2003).

Essa planta é proveniente de um arbusto aromático, sendo muito utilizada na medicina popular brasileira. Suas folhas são utilizadas na forma de chás, maceradas, extratos, xaropes e tinturas para tratar problemas gastrointestinais, diarreia e disenteria (CAMILLO, 2016; BIASI; COSTA, 2003). O seu aroma está relacionado aos constituintes predominantes nos óleos essenciais, que incluem o limoneno,  $\beta$ -cariofileno, *p*-cimeno, cânfora, linalol e  $\alpha$ -pineno (TAVARES *et. al.*, 2005; AGUIAR, 2008; GOMES *et. al.*, 2011).

A figura 14 ilustra essa planta.

Figura 14 – *Lippia alba*.



Fonte: CASTRO, 2020.

Segundo a autora ALMEIDA (2016) a avaliação da atividade citotóxica do OE de *Lippia ssp* na linhagem de carcinoma de pulmão, teve como resultado a indução de morte programada (apoptose) sobre estas células, o que permitiu concluir que este óleo representa uma fonte promissora de compostos para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

#### 4.5.3 Óleos Essencial de Lavanda (*Lavandula angustifolia*)

A lavanda é uma planta pertence à família Lamiaceae, sendo procedente de países mediterrâneos da Europa. No entanto, seu cultivo se disseminou internacionalmente. Essa planta é encontrada como arbustos de aproximadamente 60 cm de altura, suas folhas são estreitas e apresenta pequenas flores (ALVES, 2018). As figuras 15 e 16 ilustram essa planta.

Figura 15 – Arbustos de lavanda.



Fonte: ALVES, 2018.

Figura 16 – Flor de lavanda de arbustos.



Fonte: ALVES, 2018.

O óleo essencial da *L. angustifolia* é extraído a partir das folhas e flores das plantas, apresentando uma diversidade de propriedades biológicas como sedativa, carminativas, antidepressivas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (GEZICI, 2018; ARAÚJO, 2012). Esse óleo é popularmente utilizado na medicina complementar e como aditivo em produtos cosméticos. A composição química do OE de lavanda apresenta diversas variedades em diferentes concentrações de acordo com cada espécie. No entanto, há um predomínio de monoterpenos encontrados com maior frequência em cada espécie, como linalol, acetato de linalol, borneol, cânfora e 1,8-cineol (MAMBRÍ, 2016; SILVEIRA *et. al.*, 2012).

Segundo os autores ZHAO *et. al.* (2016), foi avaliada e comprovada através de ensaios *in vitro* a propriedade antitumoral do OE de lavanda (*Lavandula angustifolia*) *in vitro* em linhagem de células tumorais prostáticas.

#### 4.5.4 Óleo Essencial de Limão Siciliano (*Citrus limon*)

O óleo essencial de limão, conhecido popularmente como limoeiro, pertence à família Rutaceae, sendo localizada em várias regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália. Suas folhas e frutos são aproveitados pela medicina popular para finalidades terapêuticas, devido apresentar várias ações terapêuticas como adstringente, antianêmico, antibiótico, antisséptico, antiemético, antidepressivo, anti-inflamatório, antiespasmódico, bactericida, antireumático e antidisentérico (CAMPELO *et. al.*, 2013).

A figura 17 ilustra essa planta.

Figura 17 – Limão siciliano.



Fonte: AUGUSTYL, c2020.

Para obter a extração desse óleo, geralmente, se utiliza a casca da planta (JOMAA *et. al.*, 2012). Os compostos voláteis presentes no óleo de limão são o limoneno, acetato de geraniol, neral, geraniol, nerol, dentre outros (MARTINS *et. al.*, 2017; CAMPELO *et.al.*, 2013).

Os autores Jomaa *et. al.* (2012), avaliaram e demonstraram através de experimentos *in vitro* o efeito citotóxico do OE de limão sobre a linhagem de carcinoma colorretal humano.

#### 4.5.5 Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia*

O gênero *Melaleuca* pertence à família Myrtaceae, e inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. A *Melaleuca alternifolia* é conhecida na Austrália como “árvore de chá”, devido florescer em áreas de pântano, próximas de rios (CORREA *et. al.*, 2020). A figura 18 ilustra uma planta de *Melaleuca alternifolia*.

Figura 18 – *Melaleuca alternifolia*.

Fonte: Filha da Terra, c2020.

A extração do óleo essencial dessa planta se dá a partir das folhas utilizando técnicas de hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor (VIEIRA *et. al.*, 2004; RUSSO *et. al.*, 2015; OLIVEIRA *et. al.*, 2011). A composição química do OE de *Melaleuca* é constituída pelos terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno, 1,8-cineol, dentre outros, em que estes são os principais responsáveis por fornecer as propriedades medicinais (OLIVEIRA *et. al.*, 2015).

De acordo com alguns autores como ASSMANN *et. al.* (2018) e BYAHATTI *et. al.* (2018), foram observadas as propriedades antitumorais do óleo de *Melaleuca* sobre algumas linhagens celulares tumorais.

A volatilização dos OEs acontece de maneira rápida, devido a presença de compostos orgânicos voláteis em sua composição química. Estudos realizados pelo grupo de Imunologia de Tumores da Faculdade de Tecnologia de Sorocaba (FATEC-SO), demonstraram o efeito citotóxico destes óleos essenciais sobre linhagens tumorais *in vitro*, mesmo quando colocados distantes das células. Porém, está rápida volatilização não permite que observemos estes efeitos de forma mais prolongada. Sendo assim, teve-se o intuito de encontrar um veículo carreador que possa realizar a liberação desses óleos essenciais de maneira gradativa. Para tanto, um possível veículo considerado para viabilização deste estudo foi a placa hidrocolóide.

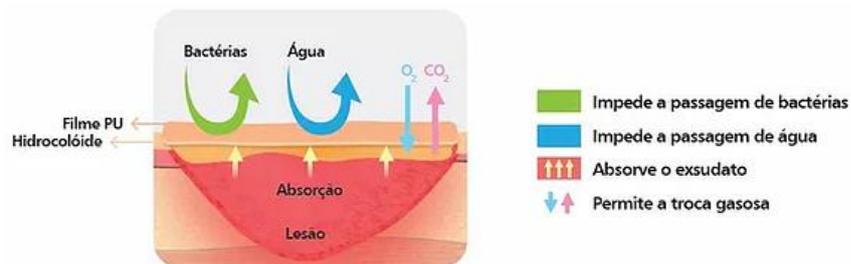
#### 4.6 Placa Hidrocolóide

A placa hidrocolóide (PH) é um curativo comercial que auxilia no processo de cicatrização de escaras e feridas. O curativo é composto por uma camada externa de filme de

poliuretano; e uma camada interna constituída de gelatina, pectina e carboximetilcelulose. A camada externa permite que ocorra troca gasosa, promovendo um isolamento térmico e meio hipóxico, que funciona como uma espécie de barreira que impede a passagem de líquidos e de microrganismos, além de permitir a produção de novos vasos sanguíneos conhecido pelo processo nomeado de angiogênese. A inibição do crescimento bacteriano se deve ao microambiente ácido promovido pela oclusão com o polímero do curativo, ao mesmo tempo que funciona como uma barreira mecânica para a ferida, enquanto que a camada interna promove um meio úmido, que proporciona alívio da dor, por manter úmida as terminações nervosas, promovendo assim um processo de cicatrização adequado (POTT *et. al.*, 2014; Secretaria Municipal de Saúde, 2008).

A figura 19 ilustra esquematicamente o mecanismo de ação desse curativo.

Figura 19 – Mecanismo de ação da placa hidrocolóide.



Fonte: Curatec, c2020.

Em relação ao tratamento de feridas, a placa promove a angiogênese, o aumento do número de fibroblastos da derme, estimula a produção de tecido e granulação e aumenta a quantidade da produção de colágeno, em que isto são essenciais ao processo de cicatrização (POTT *et. al.*, 2014).

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Local de Pesquisa

A realização das pesquisas e experimentos foram elaboradas no Laboratório de Imunologia de Tumores (ImunoCell) da Fatec Sorocaba. Devido à ausência de alguns equipamentos específicos, uma parte dos experimentos foi efetuado no Departamento de Caracterização de Materiais da Fatec Sorocaba, no Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTeC) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Sorocaba, no Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP) localizada no Campus de Sorocaba, e no Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da Universidade de Sorocaba (LabNUS) localizada no Parque Tecnológico de Sorocaba.

### 5.2 Materiais

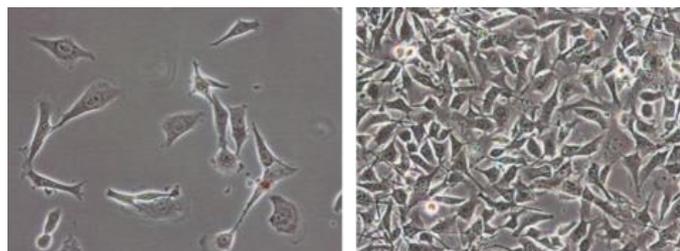
#### 5.2.1 Linhagens Celulares

Para este trabalho foram utilizadas a linhagem tumoral de melanoma murino (B16F10) e a linhagem celular de fibroblasto murino (L929), sendo esta última usada como controle.

A célula tumoral B16F10 é uma sublinhagem do melanoma murino que cresce espontaneamente em camundongos C57BL/6. Estas células funcionam como um bom modelo para a análise da progressão tumoral e estudo deste tipo de câncer em humanos, em virtude da alta capacidade de invadir a circulação sanguínea e produzir metástases (SILVA *et. al.*, 2013). A L929 é uma linhagem celular do tipo fibroblasto subclonada da linhagem parental L, sendo esta derivada do tecido aréola subcutâneo e do tecido conjuntivo adiposo de um camundongo macho C3H/An. Estas células são importantes nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos, sendo encontradas em tecidos conjuntivos perdidos ou danificados, acerca disto, esta linhagem foi utilizada como controle (PÉRTILE, 2007).

As figuras 20 e 21 ilustram microscopicamente as células de melanoma murino e de fibroblasto normal.

Figura 20 – Linhagem tumoral de melanoma murino (B16F10).



Fonte: Imanis Life Sciences, c2020.

Figura 21 – Linhagem celular de fibroblasto normal (L929).



Fonte: BUCUR *et. al.*, 2019.

#### 5.2.1.1 Condições de Cultivo Celular

As células B16F10 e L929 foram mantidas em meio de cultura denominado completo que consiste em RPMI 1640 (Gibco Life Technologies Corporation-USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell-Brasil), 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (Gibco Life Technologies Corporation-USA) e 1% de glutamina (Gibco Life Technologies Corporation-USA). Após o preparo, as células foram cultivadas em garrafas de cultura contendo este meio nutritivo, sendo mantidas em incubadora a uma tensão de 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de umidade relativa à 37 °C. Ao atingirem a confluência, foi feito o processo de replicação ou congelamento celulares.

Na figura 22 está sendo representado o local de armazenamento (estufa) para as garrafas de cultura contendo as linhagens celulares com meio nutritivo.

Figura 22 – Cultivo celular.

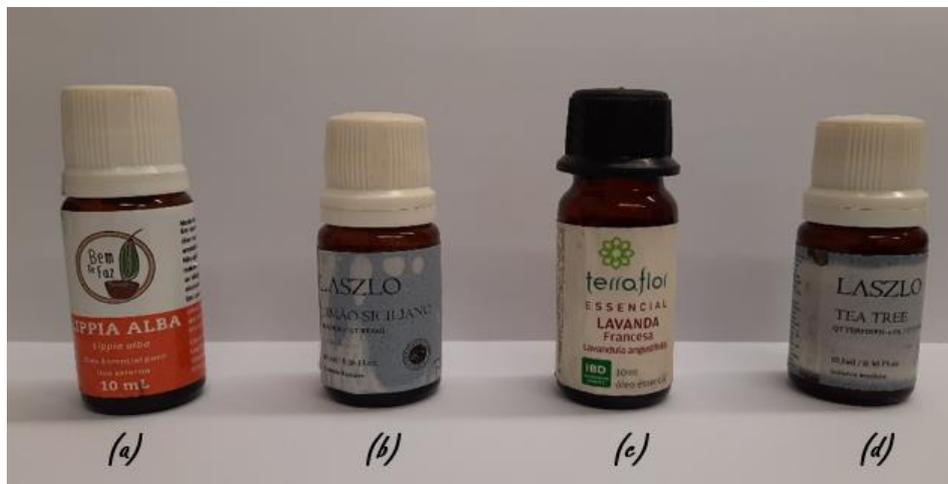


Fonte: SPLABOR, 2018.

### 5.2.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) utilizados neste trabalho (Figura 23) foram de erva cidreira (*Lippia alba*), da marca Bem te Faz, de lavanda francesa (*Lavandula augustifolia*), da marca Terra Flor, de limão siciliano (*Citrus limon*), da marca LASZLO e o de *Melaleuca* (*Tea Tree*), da marca LASZLO.

Figura 23 – Óleos essenciais utilizados para a realização deste trabalho. (a) óleo essencial de erva cidreira; (b) óleo essencial de limão siciliano; (c) óleo essencial lavanda francesa; e (d) óleo essencial de *Melaleuca*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

#### 5.2.2.1 Diluição dos Óleos Essenciais

Nesse procedimento realizou-se a diluição dos óleos essenciais, uma vez que utilizados de maneira pura apresenta uma acentuada toxicidade. Foi escolhido a diluição no percentual de 75% (composto de 750  $\mu$ L do óleo essencial + 250  $\mu$ L de DMSO puro) para serem utilizados como parâmetro para os posteriores experimentos, uma vez que tivemos como resultados satisfatórios de outros estudos realizados com os óleos essenciais em nosso laboratório de Imunologia de Tumores da Fatec Sorocaba.

O solvente usado para estas diluições foi o DMSO (Dimetilsulfóxido, Synth-Brasil). Após a realização deste procedimento, os OEs diluídos foram mantidos em frascos de vidro âmbar em uma temperatura ambiente para posterior utilização. A figura 24 ilustra o modo de preparo destas diluições.

Figura 24 – Diluição dos óleos essenciais de erva cidreira, lavanda francesa, limão siciliano e *Melaleuca*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

### 5.2.3 Placa Hidrocolóide

Através de um levantamento de tipos de placas hidrocolóides (PHs) encontradas no mercado, foram utilizadas neste estudo dois tipos principais, cada qual apresentando espessuras diferentes, por isto foram denominadas de PH fina (PH-F) da marca Curatec com um comprimento e uma largura de 20 x 20 cm, e PH grossa (PH G) da marca Convatec, sendo esta última mais espessa que a anterior, contendo um comprimento e uma largura de 20 x 30 cm.

Com o auxílio de um paquímetro digital (Stretto-USA) foram feitas as mensurações das espessuras das placas, em que a fina teve com medida 1,06 mm e a grossa teve como medida 1,92 mm.

Nas figuras 25 e 26 estão sendo apresentadas as duas placas hidrocolóide utilizadas para a realização deste trabalho.

Figura 25 – Placa hidrocolóide de espessura fina da marca Curatec.



Fonte: Ballke, c2020.

Figura 26 – Placa hidrocolóide de espessura grossa da marca Convatec.

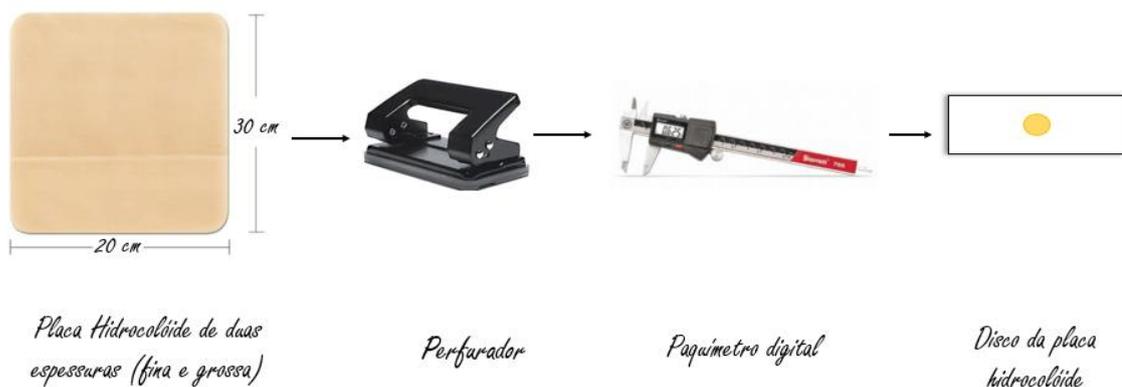


Fonte: Regional Rehab & Mobility, c2020.

#### 5.2.3.1 Preparação dos Discos da Placa Hidrocolóide

Para a realização desse procedimento, as placas hidrocolóide foram cortadas em formato de discos com o auxílio de um perfurador de papel. Para que as dimensões dos discos fossem padronizadas foi usado o paquímetro digital (Starrett-USA) para realizar a mensuração do diâmetro. A figura 27 mostra esquematicamente como foi realizado este procedimento.

Figura 27 – Desenho esquemático da preparação de discos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Essa metodologia foi aplicada para realizar os ensaios de sorção e de caracterização do material (ensaio pela técnica FTIR e avaliação de superfície), no intuito de que o formato do disco facilita a execução final desses ensaios.

### 5.3 Ensaio *in vitro*

Para o preparo desse ensaio, as linhagens B16F10 e L929 foram mantidas em garrafas de cultura até atingirem total confluência como foi citado anteriormente.

O meio de cultura foi retirado de cada garrafa e as células foram lavadas com a Solução Tampão Fosfato Salino conhecido pela sigla inglesa PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Posteriormente para descolamento das células aderentes, cada garrafa foi tripsinizada com 2 mL de Tripsina/EDTA (Vitrocell-Brasil) por 5 minutos. As células foram distribuídas em duplicata nas placas de 96 poços com a contagem de  $1 \times 10^5$  células/mL, sendo utilizadas a primeira e a segunda fileira na parte superior da placa, e a penúltima e última fileira na parte inferior da placa. Após a distribuição das células nas placas, elas foram incubadas a uma tensão de 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de umidade relativa à 37 °C até a adesão (12h a 14h), para que não houvesse interferência entre os tratamentos (efeito volátil) foram utilizadas uma placa para cada substância testada.

#### 5.3.1 Avaliação do Efeito Volátil dos Óleos Essenciais de Maneira Indireta sobre as Linhagens Celulares

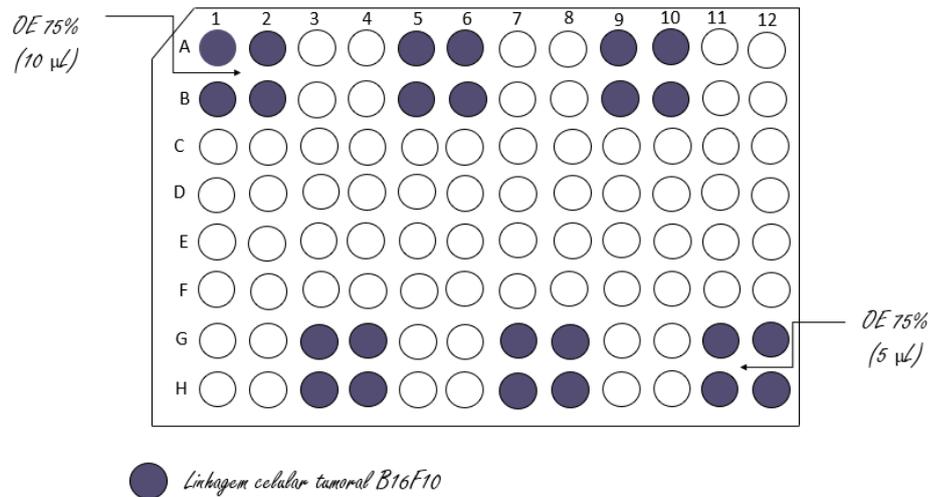
Após a realização do procedimento descrito no ensaio *in vitro*, foi inserido no espaço que há entre os poços da placa de cultura de 96 poços (Figuras 28 e 29) os óleos essenciais na diluição de 75% e DMSO (controle) na quantidade de 10 µL (localizado na região superior entre os poços da placa) e de 5 µL (localizado na região inferior entre os poços da placa). No total foram utilizadas dez placas de cultura de 96 poços. Destas, cinco continham a linhagem tumoral B16F10 e as outras cinco continham a linhagem celular L929. Cada placa foi identificada com as siglas dos respectivos óleos essenciais e controle.

- LA – *Lippia alba*;
- LV – Lavanda francesa;
- LI – Limão siciliano;
- ME – *Melaleuca*;
- DMSO – Dimetilsulfóxido.

A exposição aos OEs ocorreu por um período de 24 horas, e finalizado este período foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.

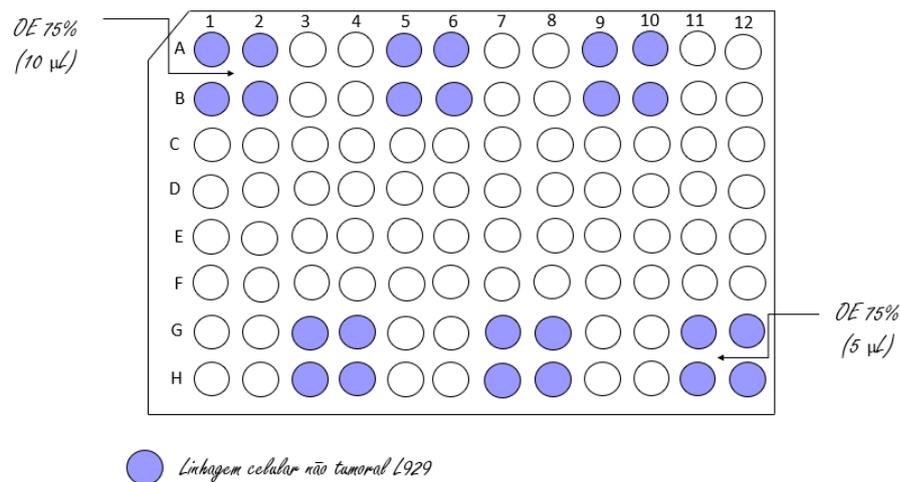
As figuras 28 e 29, ilustram esquematicamente a disposição das linhagens celulares e dos óleos essenciais na placa de cultura de 96 poços.

Figura 28 – Disposição da linhagem tumoral na placa de cultura de 96 poços.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Figura 29 – Disposição da linhagem celular não tumoral na placa de cultura de 96 poços.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

### 5.3.2 Avaliação da Liberação Gradativa do Efeito Volátil dos Óleos Essenciais Sorvidos na Placa Hidrocolóide sobre as Linhagens Celulares

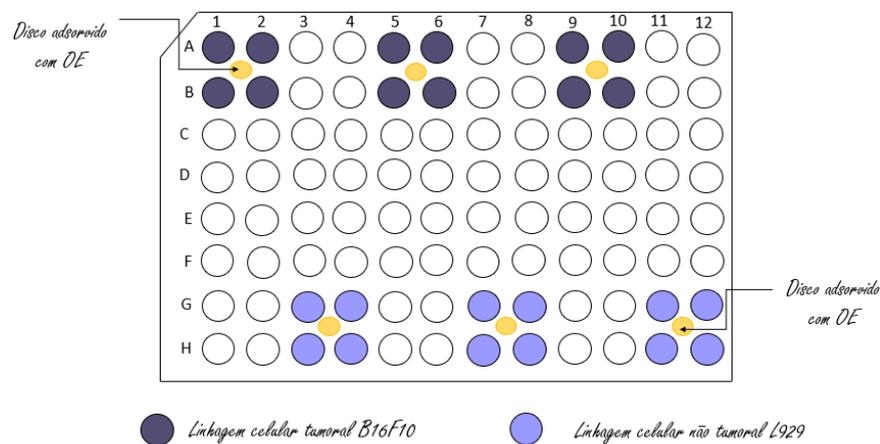
Após a realização do procedimento descrito no ensaio *in vitro*, em que se teve o cuidado sobre as linhagens celulares, na placa de cultura de 96 poços foram dispostas as linhagens celulares, sendo que a linhagem tumoral (B16F10) foi inserida nas fileiras A e B, enquanto que a linhagem de controle (L929) foi colocada nas fileiras G e H (Figura 30). Os discos sorvidos em OEs diluídos percentualmente em 75% e em DMSO foram dispostos entre os poços contendo as linhagens celulares como ilustra a figura 30.

No total, também foram utilizadas dez placas de cultura de 96 poços, cada qual foi identificada com as siglas dos respectivos óleos essenciais e controle (DMSO).

- LA 75%;
- LV 75%;
- ME 75%;
- DMSO.

A exposição dada foi por um período de 24 horas, e finalizado este período foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.

Figura 30 – Disposição das linhagens celulares B16F10 e L929 na placa de cultura de 96 poços.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

### 5.3.3 Ensaio de viabilidade celular pela técnica colorimétrica MTT

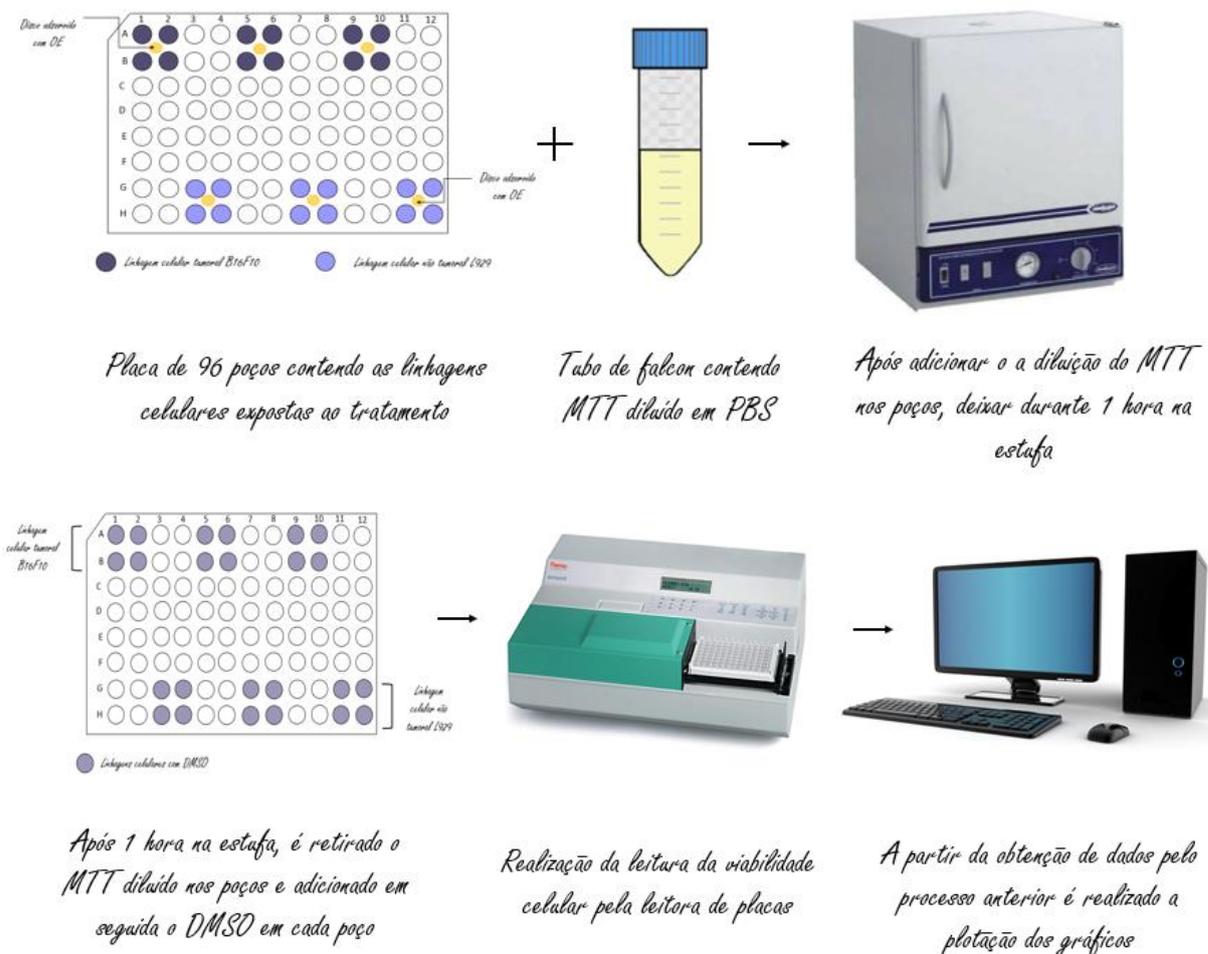
O ensaio de viabilidade celular utilizado pelo método MTT, consiste em um ensaio colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular, a proliferação e a sobrevivência celular. O MTT conhecido também como (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio brometo), é um sal hidrossolúvel, que em solução apresenta uma coloração amarelada. Células metabolicamente viáveis possuem na membrana interna da mitocôndria as enzimas desidrogenases mitocondriais, quando o sal de MTT é incorporado estas enzimas convertem este sal em formazan, que são cristais de cor azul escura insolúveis em soluções aquosas. O formazan é impermeável para as membranas celulares, deste modo, se acumula no citoplasma de células viáveis. A introdução do DMSO causa lise celular e a diluição dos cristais de formazan podem ser quantificados por espectrofotometria (GRACIOLI *et. al.*, 2013).

Neste ensaio, as células cultivadas e tratadas como descrito para o ensaio *in vitro* tiveram o sobrenadante de cada poço removido. Posteriormente foi adicionado 170  $\mu\text{L}$ /poço do sal de MTT diluído em PBS estéril na concentração de 5 mg/mL. Após 2 horas de incubação, todo o meio de cultura com MTT foi cuidadosamente retirado e 100  $\mu\text{L}$  de DMSO foi adicionado. Após alguns minutos a absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Multiskan-USA) no comprimento de onda de 540 nm.

Este ensaio foi realizado nas metodologias enumeradas 4.3.1 e 4.3.2.

A figura 31 ilustra esquematicamente o procedimento para a realização dessa técnica.

Figura 31 – Desenho esquemático do procedimento para a realização da técnica colorimétrica MTT.



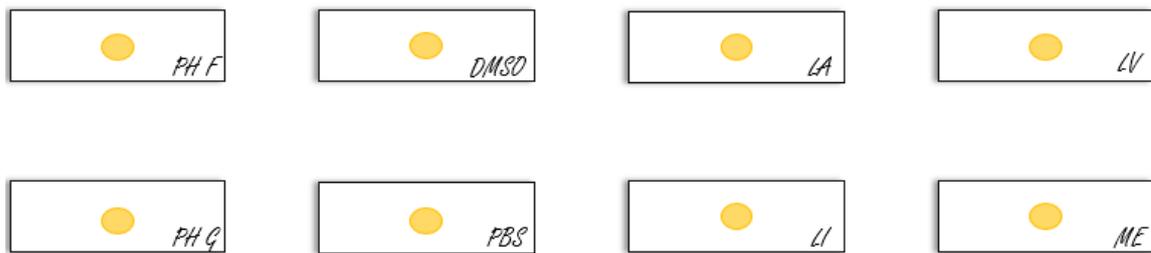
Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

## 5.4 Sorção dos Óleos Essenciais na Placa Hidrocolóide

### 5.4.1 Método Passiva

Para proceder essa metodologia de sorção, a preparação da amostra foi descrita na seção preparação dos discos da placa hidrocolóide (4.2.3.1). Após a elaboração dos discos, cada um foi disposto em lâminas identificadas, como demonstrado na figura 32.

Figura 32 – Disposição dos discos sobre as lâminas identificadas.



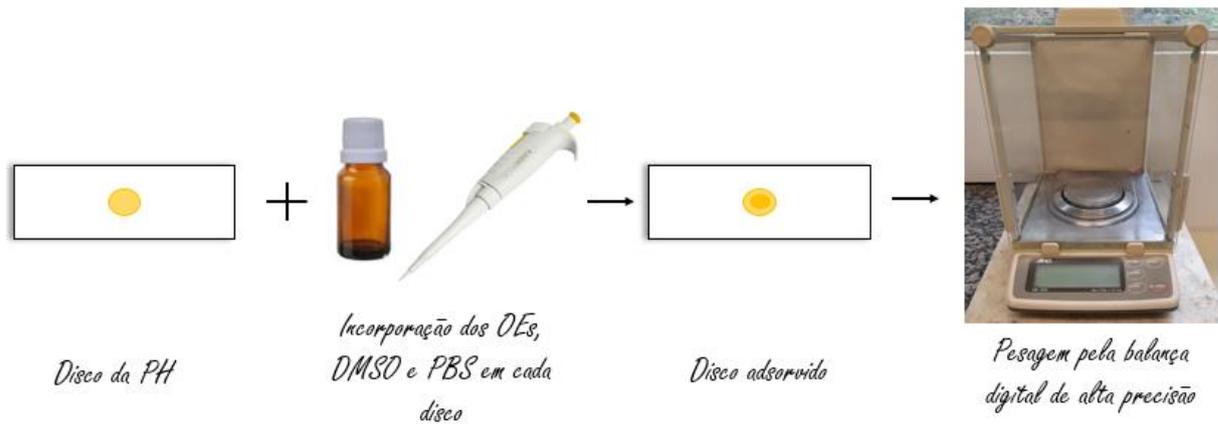
Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Após o procedimento anterior, foram aplicados diretamente no centro da camada interna de cada disco realizado nas placas fina e grossa um volume de 10  $\mu$ L dos óleos essenciais (LA, LV, LI e ME), do controle (DMSO) e do PBS. Feito este processo, os discos foram armazenados em potes com tampas identificados e mantidos em temperatura ambiente, variando em torno de 15°C a 30°C, durante 24 horas.

Decorridas 24 horas, foi feita a pesagem dos discos tanto antes quanto após a aplicação das substâncias, com o auxílio de uma balança digital de alta precisão. Posteriormente ao término da pesagem, foi acrescentado mais 10  $\mu$ L no centro da camada interna de cada disco que foram armazenados novamente por 24 horas. No final deste processo, os discos foram pesados novamente e os valores medidos anotados. Cada ensaio foi feito em triplicata (3 discos). Os dados obtidos das medidas foram inseridos no software GraphPad Prism da versão 5.0 para análise estatística (média e desvio padrão).

A figura 33 ilustra esquematicamente o desenho dessa metodologia.

Figura 33 – Método de sorção passiva.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

#### 5.4.2 Método de Centrifugação

Para realizar essa metodologia de sorção, a preparação da amostra foi descrita na seção preparação dos discos da placa hidrocolóide (4.2.3.1). Após a elaboração dos discos, cada um foi disposto em lâminas identificadas.

Após o procedimento anterior, foram utilizados tubos de ensaios identificados pela sigla dos óleos essenciais (LA, LV, LI e ME), do controle (DMSO) e do branco (água, H<sub>2</sub>O), sendo este último utilizado para se ter um balanceamento dos tubos que foram inseridos, posteriormente, no equipamento centrífuga.

Feita a identificação dos tubos de ensaio, foram aplicados em cada um, a quantidade de 50 µL dos OEs e DMSO, e em seguida foi introduzido um disco para cada tubo respectivo. Finalizado essa etapa, esses tubos foram inseridos no interior do equipamento centrífuga (Hettich-Alemanha), em que foi aplicada uma velocidade de 4500 rpm (rotação por minuto) durante 20 minutos. Terminado esse período de atuação da força centrípeta sobre os tubos de ensaio, os tubos foram retirados do equipamento, e posteriormente, os discos presentes nos tubos foram removidos, os quais foram depois inseridos sobre uma gaze durante 24 horas, para que fosse absorvido o excesso dos OEs e DMSO. Decorridas 24 horas foram realizados os ensaios de avaliação desse método (técnica de FTIR e avaliação de superfície).

O mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior foi repetido, contudo, foram aplicados em cada tubo de ensaio uma quantidade de 30 µL dos OEs e DMSO, e foi utilizada uma velocidade de 4500 rpm durante 15 minutos. Após a finalização do tempo de 15 minutos, os discos foram removidos dos tubos e inseridos sobre uma gaze durante 24 horas, para que

fosse absorvido o excesso dos OEs e DMSO. Decorridas 24 horas foram realizados os ensaios de avaliação desse método (técnica de FTIR e avaliação de superfície).

A figura 34 ilustra esquematicamente o desenho dessa metodologia.

Figura 34 – Método de sorção por centrifugação.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

## 5.5 Ensaio de Caracterização da Placa Hidrocolóide

### 5.5.1 Ensaio de Tração

Para realizar este ensaio, foi necessário confeccionar os corpos de prova (CP) padronizados de acordo com a norma ASTM D882, tendo como medidas padrões de comprimento inicial de 100 mm e de largura inicial de 10 mm. Assim, foram realizadas marcações dimensionais na placa de espessura grossa, para em seguida efetuar os cortes dos CP com o auxílio de um bisturi, tendo um total de 12 corpos de prova da placa hidrocolóide de espessura grossa (PH-G), que foi identificada como:

- PH-G;
- DMSO;
- LA;
- LV;
- LI;
- ME.

Para obter um resultado mais preciso, estatisticamente, foram utilizados dois CP para

cada ensaio. As amostras foram armazenadas em uma bandeja envolvida por um plástico de proteção e climatizadas com uma temperatura de 21 a 25 °C por 48 horas.

A figura 35 apresenta uma ilustração de um corpo de prova.

Figura 35 – Ilustração do corpo de prova utilizado para a realização do ensaio de tração.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Ao término das 48 horas, foi inserido na área dos corpos de prova identificados os respectivos OEs e o controle (DMSO) correspondentes, na quantidade de 740  $\mu\text{L}$ , deixando agir durante 24 horas. Para ter sido obtido essa quantidade (740  $\mu\text{L}$ ) de tratamento, foram realizados alguns cálculos.

De princípio foram realizados a mensuração de seis discos da PH de espessura mais grossa com o auxílio do paquímetro digital (Starrett-USA), tendo como unidade de medida o milímetro. Essa mensuração teve a finalidade para efetuar o cálculo da média do diâmetro dos discos.

A tabela a seguir apresenta os valores medidos do diâmetro dos seis discos da PH-G.

Tabela 1 – Valores medidos do diâmetro da placa de hidrocolóide de espessura grossa.

<b>Diâmetro (PH-G)</b>
5,61 mm
5,75 mm
5,73 mm
5,75 mm
5,76 mm
5,71 mm

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Após a aquisição dos dados dos diâmetros dos discos foi efetuado o cálculo da média, através da equação:

$$\bar{x} = \frac{\sum xi}{n} \quad (1)$$

Os resultados obtidos oriundos desta equação apresentarem um valor de 34,31 mm do diâmetro da placa grossa. Posteriormente, foi realizado a conversão do diâmetro em raio, em que o raio é a metade do diâmetro, para que assim se consiga obter o cálculo da área dos discos fino e padrão através da equação:

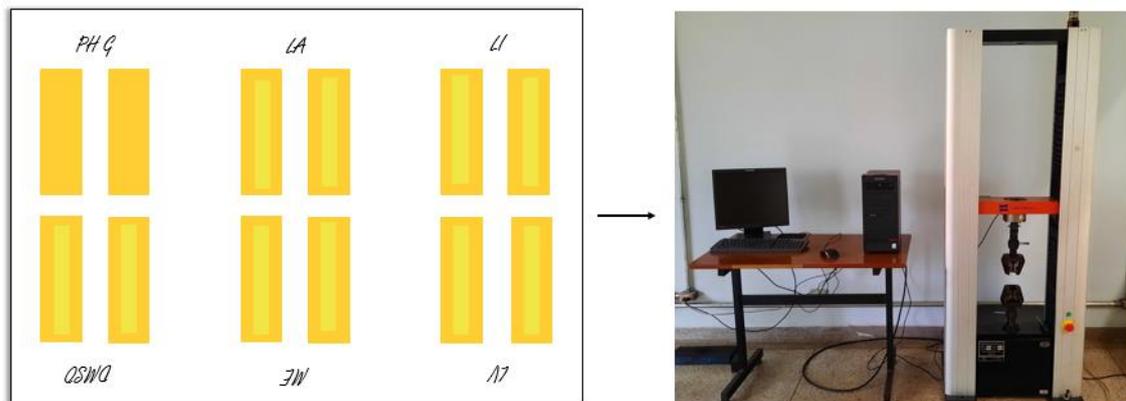
$$A = 4 \pi r^2 \quad (2)$$

Logo após o cálculo, os resultados apresentaram um valor de 36,98 cm<sup>2</sup> da placa grossa. Com este valor foi feito a multiplicação pela quantidade de adionamento dos tratamentos nos discos, sendo 20 µL no disco mais espesso. Assim, obteve-se a quantidade de 740 µL para inserir nos CPs da PH-G.

Após as 24 horas, foi realizado o ensaio de tração no Laboratório de Tratamento Térmico sob auxílio do com o uso da máquina universal de ensaio da marca TIME GROUP ICN do modelo WDW20-E com controle pneumático de tração e com capacidade para células de carga de até 300 kN. O equipamento foi ajustado com espaço entre as garras de 72 mm e as amostras foram tracionados com velocidade de 200 mm/min.

A figura 36 ilustra esquematicamente o procedimento para a realização desse ensaio.

Figura 36 – Desenho esquemático do procedimento para a realização do ensaio de tração.



*Disposição dos corpos de prova adsorvidos em OEs e DMSO em uma bandeja*

*Realização do ensaio de tração pela máquina universal de ensaio*

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Nesse presente estudo, essa metodologia foi aplicada para avaliar se os óleos essenciais alteram de alguma maneira as propriedades mecânicas do polímero (placa hidrocolóide). Para tanto, foi analisado três propriedades mecânicas, descritas adiante:

- Alongamento percentual – corresponde ao quanto que se teve de acréscimo percentual referente ao comprimento final do corpo de prova após o ensaio em relação ao seu comprimento inicial. Esse parâmetro pode ser calculado através da seguinte equação, tendo como unidade a porcentagem (JUNIOR, 2004).

$$\%AL = \frac{L}{L_0} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde “%AL” corresponde ao alongamento percentual, “L” o comprimento final do corpo de prova, e o “Lo” compreende o comprimento inicial do corpo de prova.

- Resistência a tração – abrange o ponto máximo da curva plotada no gráfico tensão-deformação que condiz a quantidade de força necessária para romper o corpo de prova por estiramento. Essa propriedade pode ser calculada pela equação 4 apresentada adiante, tendo como unidade de medida expressa em Mega Pascal (MPa) (JUNIOR, 2004).

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (4)$$

Onde “ $\sigma$ ” representa a tensão de tração, “F” indica a força ou carga aplicada sobre o corpo de prova, e “Ao” é compreendido como a área inicial da seção transversal do corpo de prova.

- Módulo de elasticidade ou módulo de Young – é uma grandeza proporcional que mede à rigidez de um material à deformação elástica, ou seja, é a capacidade que o material possui de resistir ao retorno do seu estado original após a aplicação de uma força de tração. Esse módulo pode ser calculado através da equação seguinte (JUNIOR, 2004):

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (5)$$

Onde “E” representa o módulo de elasticidade dada em Giga Pascal (GPa), “ $\sigma$ ” indica a tensão aplicada sobre o corpo de prova, e “ $\varepsilon$ ” corresponde a deformação elástica longitudinal do corpo de prova.

Ademais, o módulo de elasticidade pode também ser proveniente da regressão linear da curva, isto é, procedente da equação da reta, como ilustrado na figura 37.

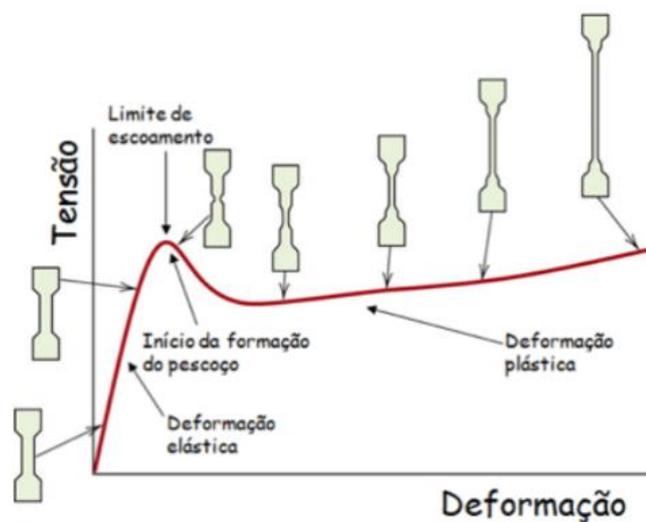
Figura 37 – Gráfico tensão-deformação.



Fonte: Afinko Soluções em Polímeros, 2019.

O gráfico obtido do ensaio de tração em materiais poliméricos apresenta curvas típicas, como demonstrado na figura a seguir. Na presente figura (Figura 38), pode-se observar as etapas de alongamento da peça até a fase final que corresponde a ruptura do corpo de prova. Ainda analisando o gráfico, pode-se identificar duas regiões de deformações, uma elástica, que constitui uma região que não sofre alterações significativas na estrutura do material, diferentemente do que ocorre na deformação plástica, a qual provoca tensões que ultrapassam o limite de elasticidade, ocorrendo assim um deslocamento permanente entre os átomos e moléculas daquele material avaliado.

Figura 38 – Fisionomia do corpo de prova polimérico em vários estágios da deformação.



Fonte: Afinko Soluções em Polímeros, 2019.

Perante a isso, após a realização desse ensaio, obteve-se dados referente as propriedades, as quais foram tratadas pelo software Excel, resultando no final em uma tabela que mostra os valores para cada um desses parâmetros.

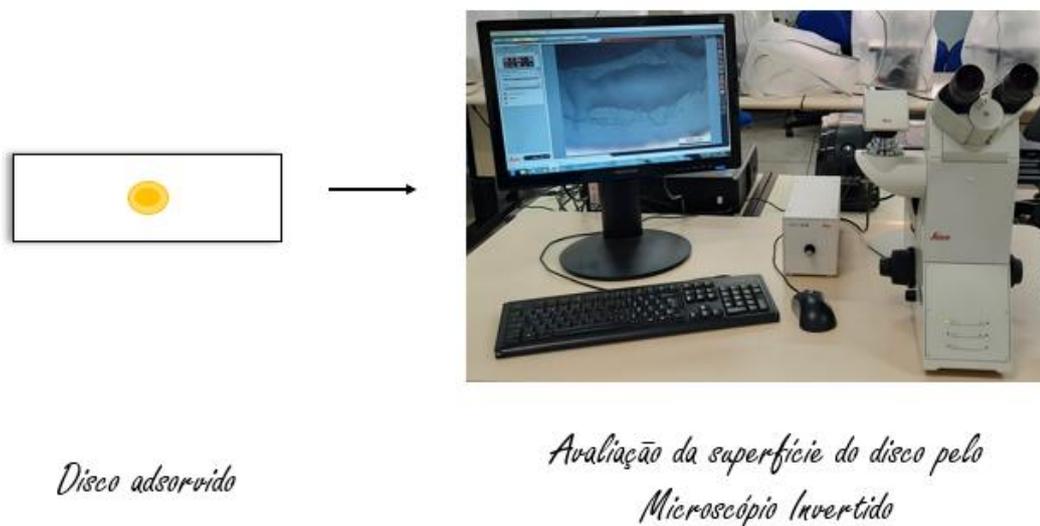
### 5.5.2 Avaliação de Superfície

Esta avaliação, realizada no Departamento de Caracterização de Materiais da Fatec Sorocaba, teve como intuito analisar as possíveis alterações na superfície das placas hidrocolóide de espessuras fina e grossa após a aplicação dos óleos essenciais (erva cidreira, lavanda, limão e *Melaleuca*) e do controle (DMSO).

Para se obter uma praticidade foram utilizadas as placas no formato de disco, em que estes foram preparados como descrito nas metodologias de sorção localizadas pela enumeração 4.4.1 e 4.4.2. O registro fotográfico da superfície dos discos foi obtido pelo microscópio invertido do modelo DMi8 C da marca Leica Microsystems, utilizando o software *Application Suite* versão 4.9 para a análise das imagens.

A figura 39 apresenta esquematicamente como foi efetuado essa avaliação.

Figura 39 – Esquema ilustrativo da metodologia de avaliação de superfície.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

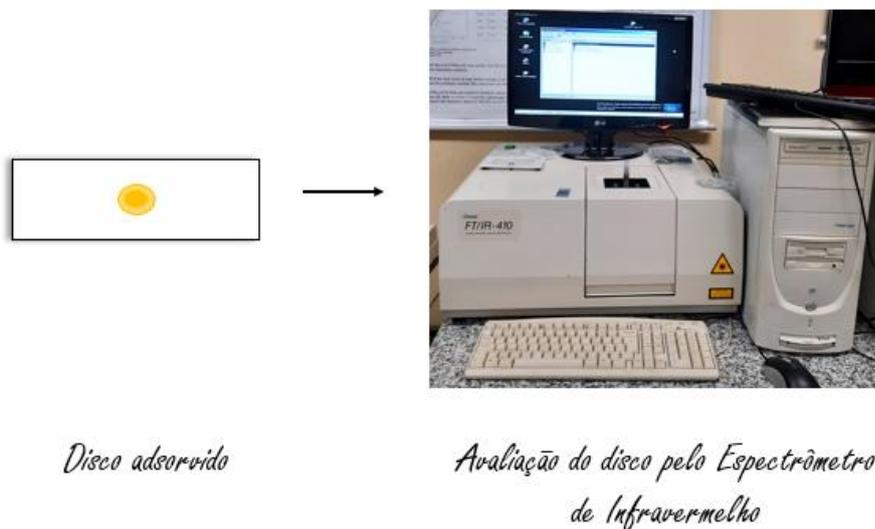
### 5.5.3 Ensaio de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Este ensaio realizado no Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTeC) da Unesp de Sorocaba, teve como intuito analisar as amostras preparadas descritas nas metodologias de sorção localizadas pela enumeração 4.4.1 e 4.4.2, sendo que também foi analisado uma amostra

sem nenhum tratamento inserido (placa hidrocolóide) utilizada como parâmetro de referência. O ensaio pela técnica FTIR foi realizado pelo modo de reflectância total atenuada (ATR), o qual se usa um cristal com índice de refração muito elevado e de baixa absorção no infravermelho na faixa de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ . A realização da confecção e da leitura dos gráficos foi recorrente ao software Origin na versão 8.0.

A figura 40 ilustra esquematicamente como efetuado essa metodologia.

Figura 40 – Esquema ilustrativo da metodologia de espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier.

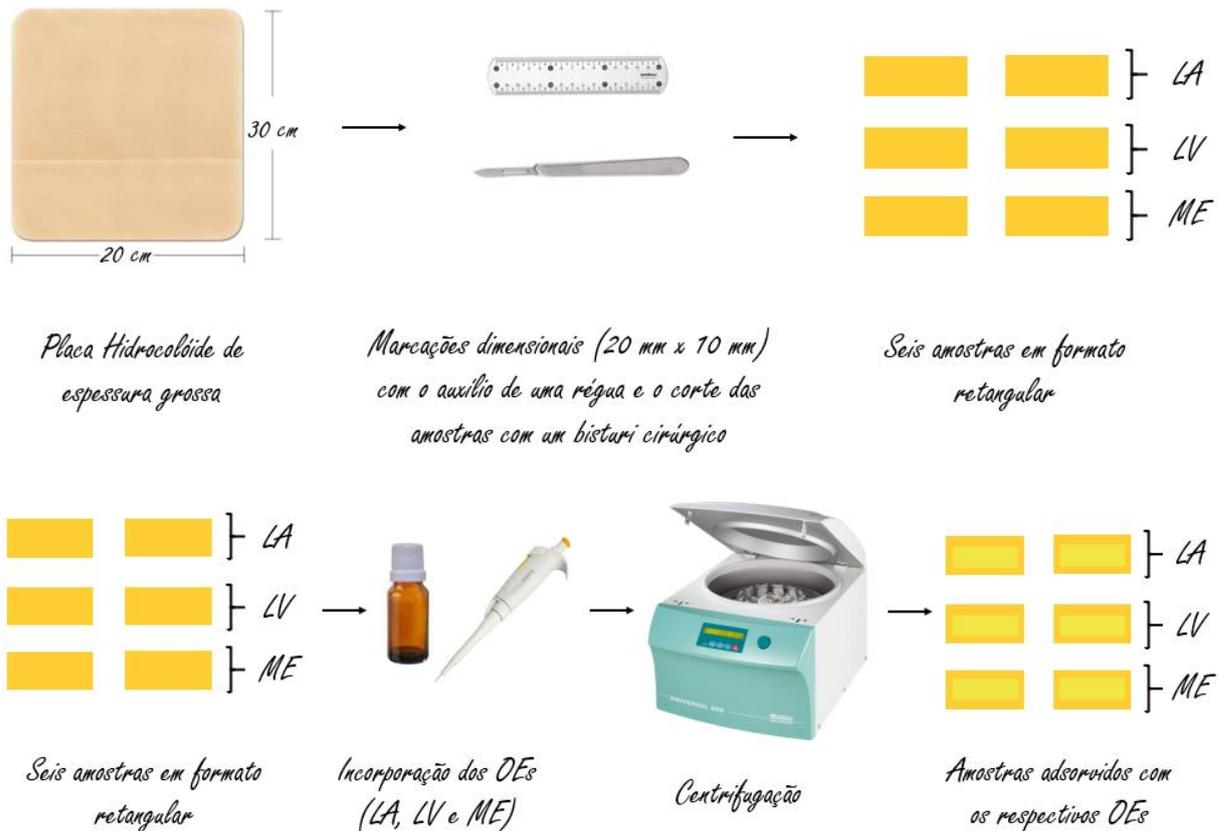


Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

### 5.6 Ensaio de Liberação Controlada dos Óleos Essenciais

Para o estudo da liberação controlada dos óleos essenciais, seis amostras em formato retangular [20 mm (c) x 10 mm (l)] foram utilizadas, sendo que a duas amostras desse total foram sorvidas com 200  $\mu\text{L}$  de cada OE (*Lippia alba*, lavanda e *Melaleuca*), como ilustra a figura 41.

Figura 41 – Preparo e sorção pelo método de centrifugação das amostras.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Após a sorção, estas amostras foram pesadas com o auxílio de uma balança digital de alta precisão (tabela 2), para em seguida serem imersas separadamente em 5 mL de PBS e incubadas no banho-maria (Quimis-Brasil) a 37 °C. Durante o procedimento da incubação, foram realizados um total de 20 alíquotas para as duas amostras de cada OE, isso foi possível através da interrupção da ação da temperatura de 37 °C em alguns intervalos para se conseguir avaliar, posteriormente, a liberação dos OEs, como pode-se observar na tabela 3.

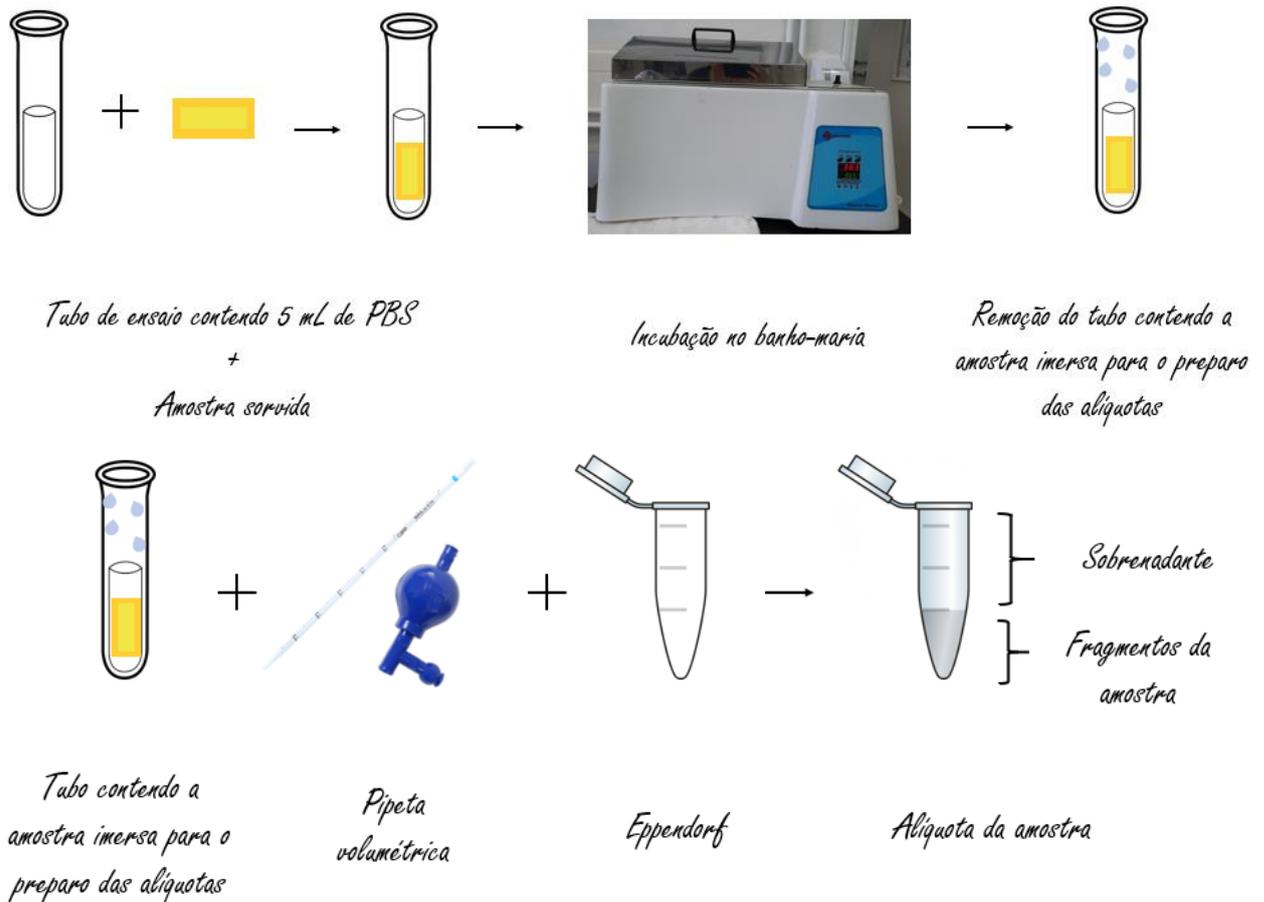
A figura 42 ilustra esquematicamente como foi realizada a imersão, incubação e o preparo das alíquotas das amostras.

Tabela 2 – Pesagem das amostras sorvidas pelos OEs.

	<i>Lippia alba</i> (LA)	Lavanda (LV)	<i>Melaleuca</i> (ME)
<b>Amostra 1</b>	0,3790 g	0,3855 g	0,3593 g
<b>Amostra 2</b>	0,3740 g	0,3124 g	0,3766 g

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Figura 42 – Procedimento de imersão, incubação e alíquotas das amostras.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Tabela 3 – Contagem do tempo de liberação dos OEs.

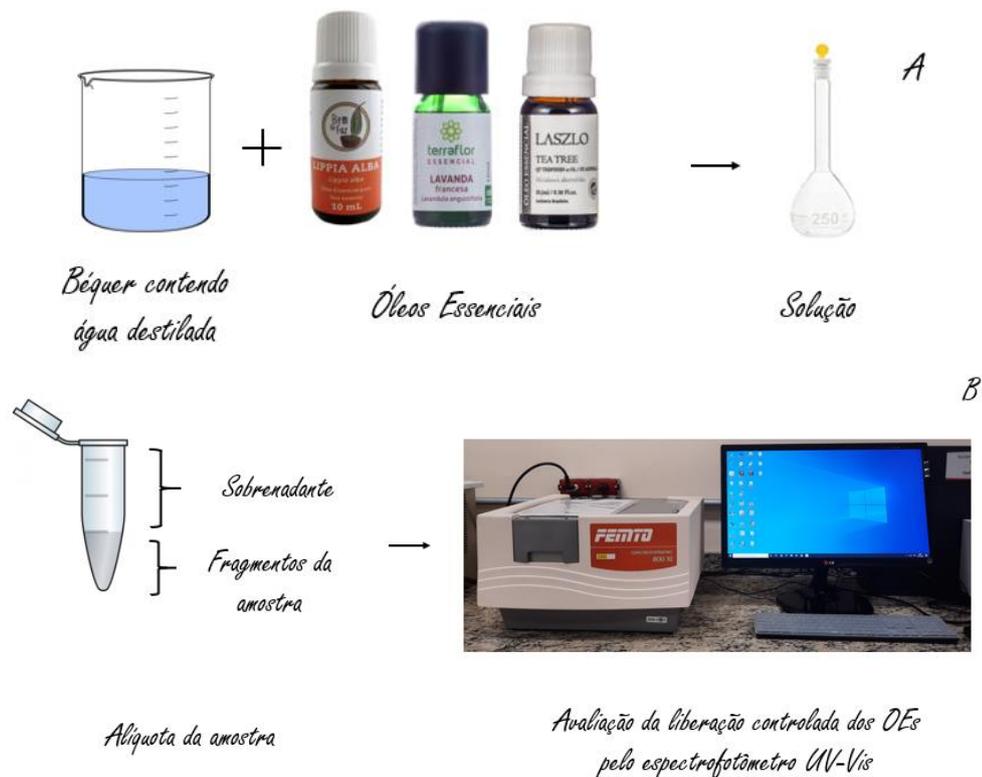
<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>
5	Amostra 1.1	Amostra 2.1
15	Amostra 1.2	Amostra 2.2
30	Amostra 1.3	Amostra 2.3
45	Amostra 1.4	Amostra 2.4
60	Amostra 1.5	Amostra 2.5
120	Amostra 1.6	Amostra 2.6
180	Amostra 1.7	Amostra 2.7
240	Amostra 1.8	Amostra 2.8
1140	Amostra 1.9	Amostra 2.9
1560	Amostra 1.10	Amostra 2.10

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Após a obtenção das alíquotas, estas foram armazenadas na geladeira durante uma semana, e finalizado esse período foi realizado a análise delas. De princípio foi preparado

soluções para os OEs (*Lippia alba*, lavanda, *Melaleuca*) como demonstrado na figura 43, para em seguida realizar a curva de calibração por regressão linear para cada OE, respectivamente, para que assim possa ser realizado as análises das alíquotas. Completado essa etapa, foram removidos das alíquotas 2,5 mL do sobrenadante e estes foram medidos em espectrofotômetro de UV-Vis (Femto 800 XI) nos comprimentos de onda de 328 nm (*Lippia alba*), de 236 nm (lavanda) e de 204 nm (*Melaleuca*), e essa alíquota foi descartada logo após a medição, como ilustrado na figura 43. Este processo foi repetido após concluir as 20 alíquotas de cada amostra de cada OE.

Figura 43 – Análise das alíquotas utilizando o espectrofotômetro de UV-Vis. (a) preparação da solução para curva de calibração; (b) procedimento para realizar a curva das alíquotas.



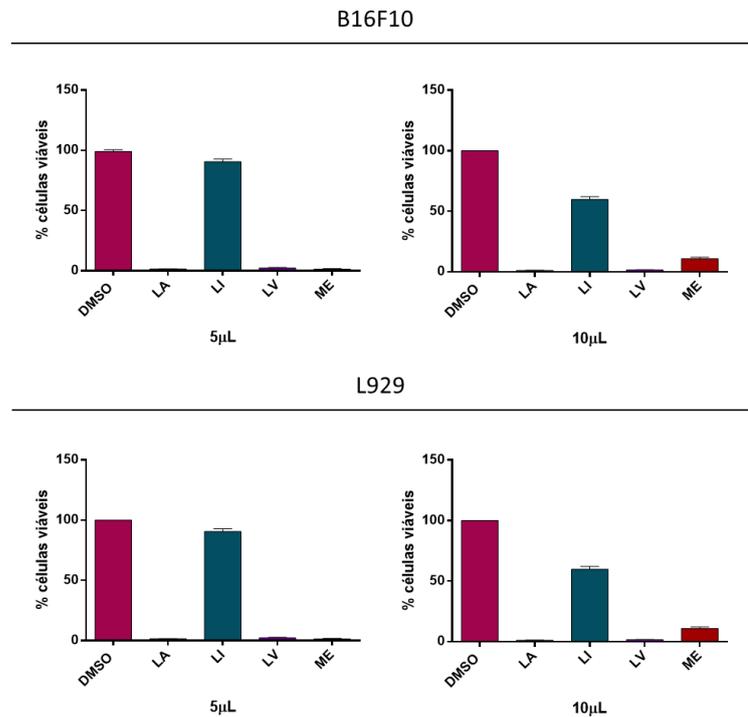
Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

A quantidade de cada OE liberado foi calculada a partir de uma curva padrão contendo quantidades conhecidas de OE, para tanto, foi utilizado o software Origin para confeccionar os gráficos.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Avaliação do Efeito Volátil dos Óleos Essenciais sobre as Linhagens Celulares

Figura 44 – Viabilidade celular das linhagens celulares B16F10 (tumoral) e L929 (controle) expostas as quantidades de 5  $\mu$ L e 10  $\mu$ L do tratamento com OEs e o controle (DMSO) durante 24 horas, verificada através do ensaio MTT.



Pode-se verificar que na figura 44, os OEs de LA (*Lippia alba*) e LV (lavanda) nas quantidades de 5  $\mu$ L e 10  $\mu$ L mostraram-se capazes de reduzir a viabilidade da linhagem B16F10, enquanto que o OE de ME (*Melaleuca*) na quantidade de 5  $\mu$ L demonstrou um efeito volátil mais intenso do que na quantidade de 10  $\mu$ L, e o OE LI (limão) demonstrou não ter um efeito tão eficiente para reduzir a viabilidade da linhagem B16F10 comparado com os outros OEs.

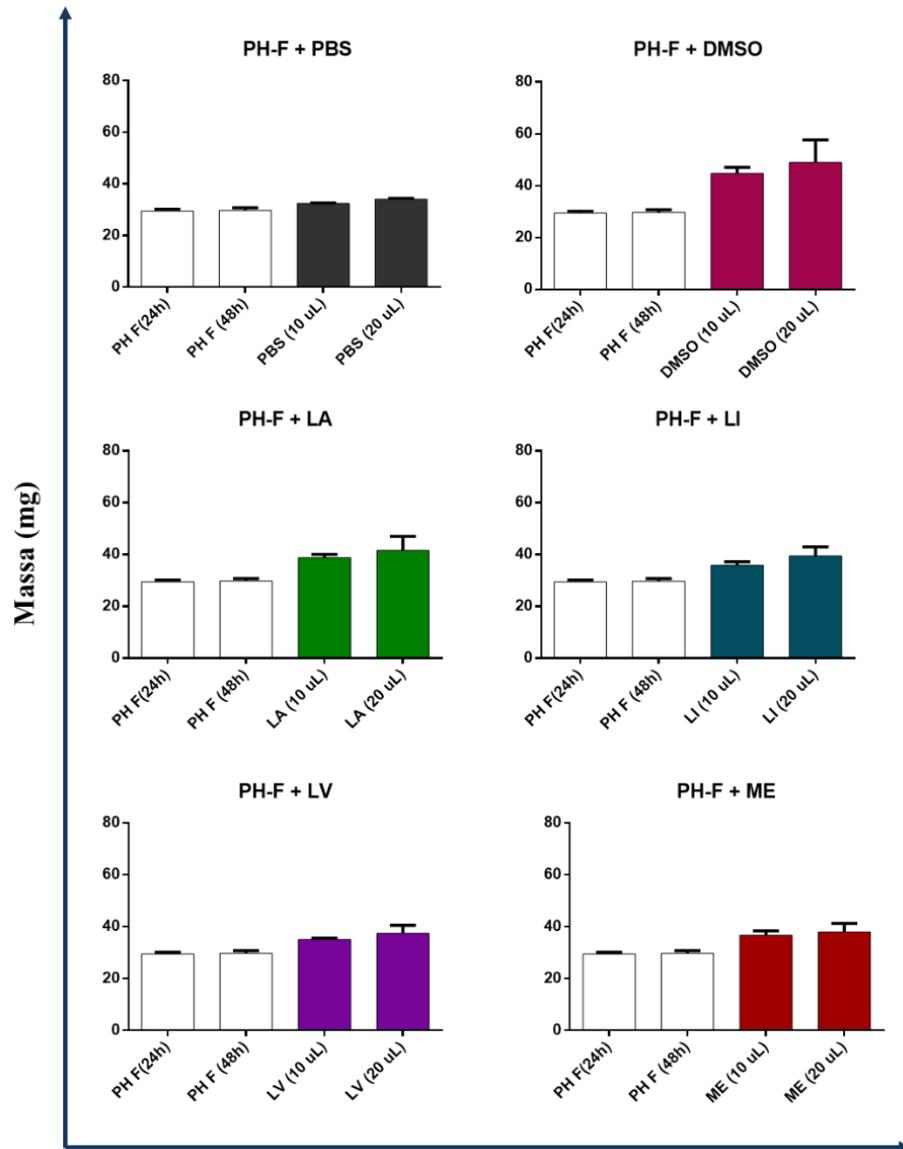
Na mesma figura, os OEs de LA (*Lippia alba*), LV (lavanda) e ME (*Melaleuca*) nas quantidades de 5  $\mu$ L e 10  $\mu$ L mostraram-se capazes de reduzir a viabilidade da linhagem L929, diferentemente do LI que apresentou um efeito volátil não tão eficaz na linhagem controle.

### 6.2 Avaliação da Sorção dos Óleos Essenciais na Placa Hidrocolóide

A sorção dos OEs nas placas hidrocolóide fina e grossa (PH-F e PH-G) teve como finalidade verificar a saturação dos OEs, do veículo de diluição (DMSO) e do PBS, sendo este último para comparar o quanto de massa o curativo consegue suportar com o exsudato liberado de uma ferida.

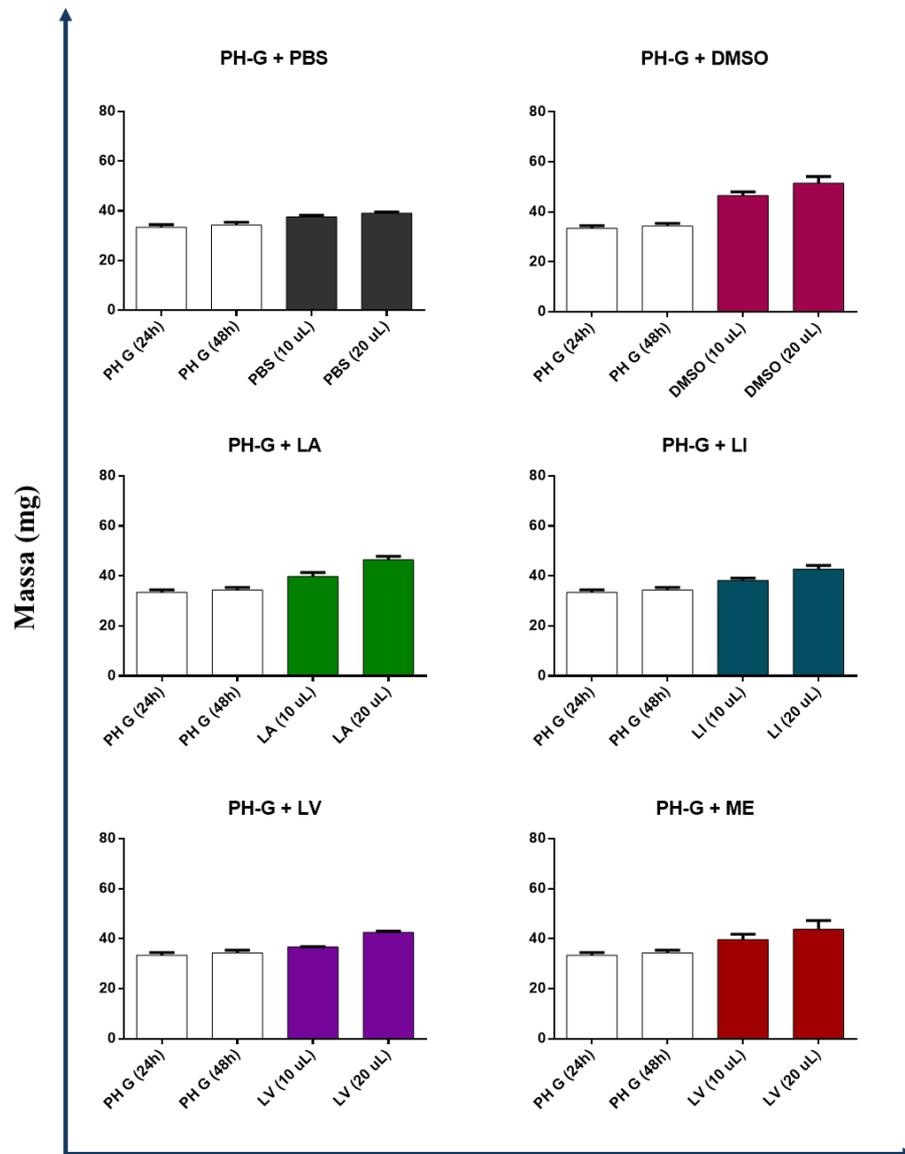
Os resultados obtidos pelo método de sorção passiva durante 24 horas foram apresentados pelas figuras 45 e 46. Referente aos resultados pelo método de centrifugação foi analisado através das técnicas de FTIR e avaliação de superfície.

Figura 45 – Gráfico de sorção dos OEs em discos de PH F que relaciona massa com o tratamento.



Na figura 45, pode-se verificar que os discos contendo DMSO e os quatro OEs no volume de 10 µL demonstraram maior sorção quando comparado ao volume de 20 µL, enquanto que o disco contendo PBS nas quantidades de 10 µL e 20 µL aparentemente não obteve alteração da massa dos discos.

Figura 46 – Gráfico de sorção dos OEs em discos de PH G que relaciona massa com o tratamento.



A figura 46 confere que os discos contendo a quantidade de 20 µL dos quatro OEs e DMSO demonstraram uma sorção melhor do que comparada com os discos da PH F, além de que os discos contendo PBS não apresentaram uma alteração elevada em sua massa. Com estas análises, foi padronizado a quantidade ideal para inserir nos discos, sendo o disco da PH F na quantidade de 10 µL e o disco da PH G na quantidade de 20 µL.

### 6.3 Avaliação dos Ensaio de Caracterização da Placa Hidrocolóide

#### 6.3.1 Ensaio de Tração

Tabela 4 – Valores resultantes dos três parâmetros analisados pelo ensaio de tração.

	<b>Alongamento percentual (%)</b>	<b>Resistência à tração (MPa)</b>	<b>Módulo de Young (GPa)</b>
<b>PH G</b>	427,50	$0,35 \cdot 10^{-2}$	300
<b>DMSO</b>	603,75	$0,30 \cdot 10^{-2}$	300
<b>LA</b>	74	$0,30 \cdot 10^{-2}$	400
<b>LI</b>	108,90	$0,30 \cdot 10^{-2}$	320
<b>LV</b>	66,75	$0,25 \cdot 10^{-2}$	85
<b>ME</b>	139,5	$0,35 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-6}$

A camada interna do curativo hidrocolóide onde foi incorporado os óleos essenciais, é constituída pelos polímeros poliuretano, carboximetilcelulose e gelatina. Estes polímeros apresentam uma elevada resistência à tração segundos os autores AQUINO *et. al.* (2010), GUGLIELMI *et. al.* (2008) e LEITE *et. al.* (2017), além de que isto foi evidenciado também durante a ocorrência do ensaio de tração na PH-G.

Os dados obtidos apresentados na tabela 4, demonstram que os OEs de LA e LI apresentaram valores relativamente elevados para o módulo de elasticidade, diferentemente dos OEs de LV e ME. Isso significa que quanto maior o módulo elástico, maior a rigidez do material, e, portanto, se torna mais propenso a se deformar elasticamente.

A respeito do alongamento percentual, este teve uma variação característica comparando os valores entre si. O OE de *Lippia alba* pelo ensaio de liberação controlada apresentou uma liberação em menor quantidade, indicando uma interação intensa entre a PH G e as moléculas presentes do OE, isso pode indicar, provavelmente, a diminuição do alongamento percentual do CP sorvido pelo LA comparando-se com a PH G.

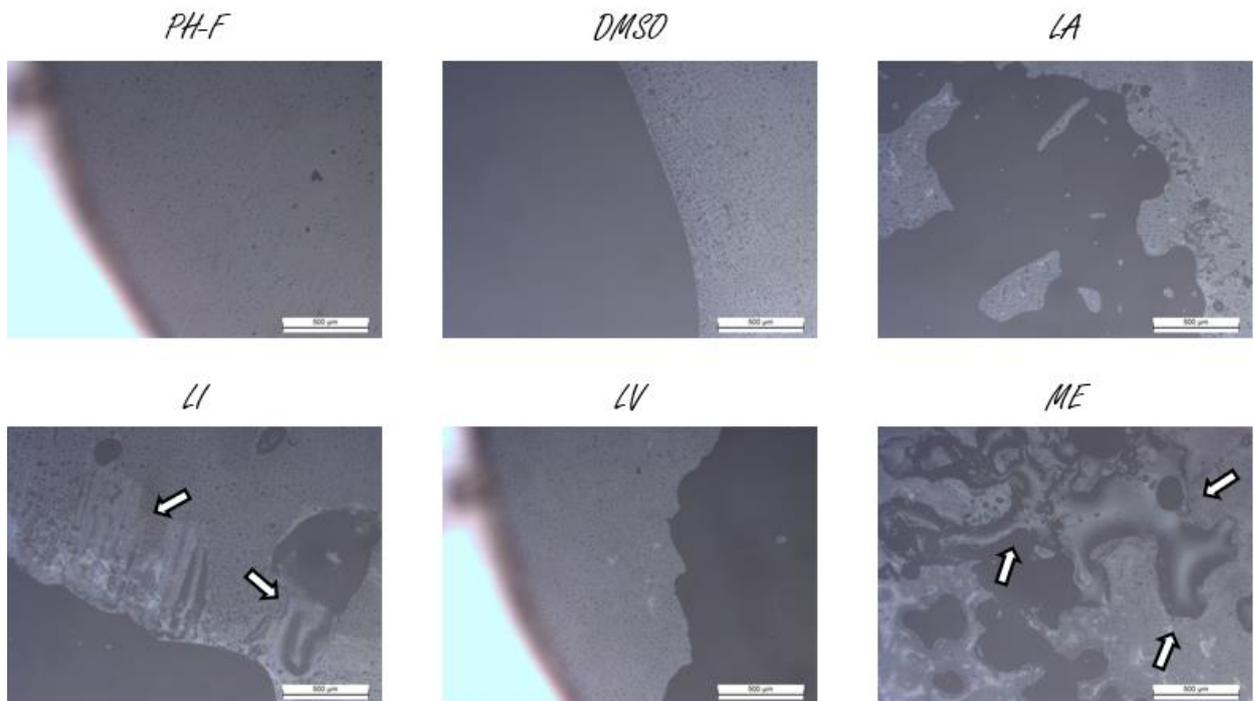
Referente a resistência à tração, o resultado obtido não demonstrou variação comparando as amostras sorvidas nos OEs e no controle (DMSO) com a PH G.

Assim, os resultados mecânicos presentes neste ensaio evidenciaram que os OEs não prejudicaram o comportamento característico da PH.

### 6.3.2 Avaliação de Superfície da Placa Hidrocolóide com os Óleos Essenciais e o Controle

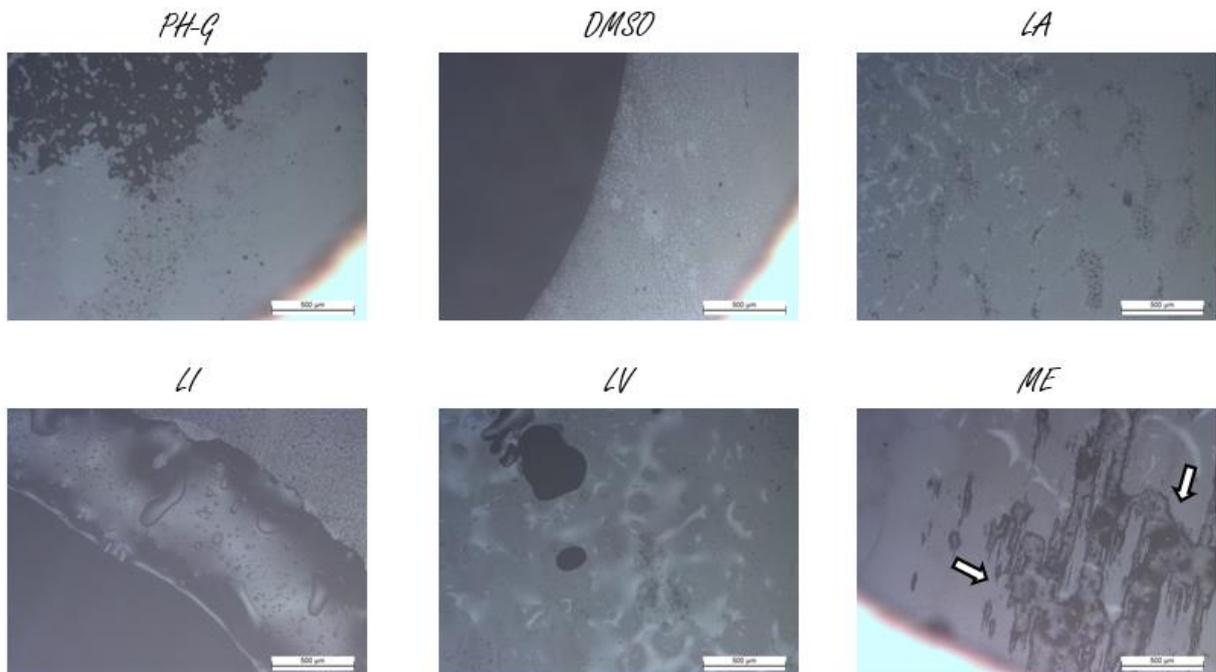
Este procedimento teve o intuito de comparar a alteração de superfície dos discos das PH F e PH G com o auxílio do microscópio óptico invertido utilizando a ampliação de 500  $\mu\text{m}$ . As amostras da PH-F e PH-G foram sorvidas pelos OEs e controle (DMSO) através das duas técnicas de sorção descritas pelas metodologias enumeradas 4.4.1 e 4.4.2.

Figura 47 – Registro fotografado pelo microscópio invertido (Leica Microsystems) das alterações superficiais dos discos da PH-F pelo método de sorção passiva por 24 horas.



Na figura 47, os quatro OEs e o controle (DMSO) foram inseridos na região central dos discos pelo método de sorção passiva por 24 horas com uma quantidade de 10  $\mu\text{L}$ . Através das fotografias dos OEs foi observado que LI e ME apresentaram degradação em vários locais da superfície do material, indicada pelas setas, diferentemente dos OEs de LA e LV, e do DMSO, em que estes não apresentaram danificações na área dos discos.

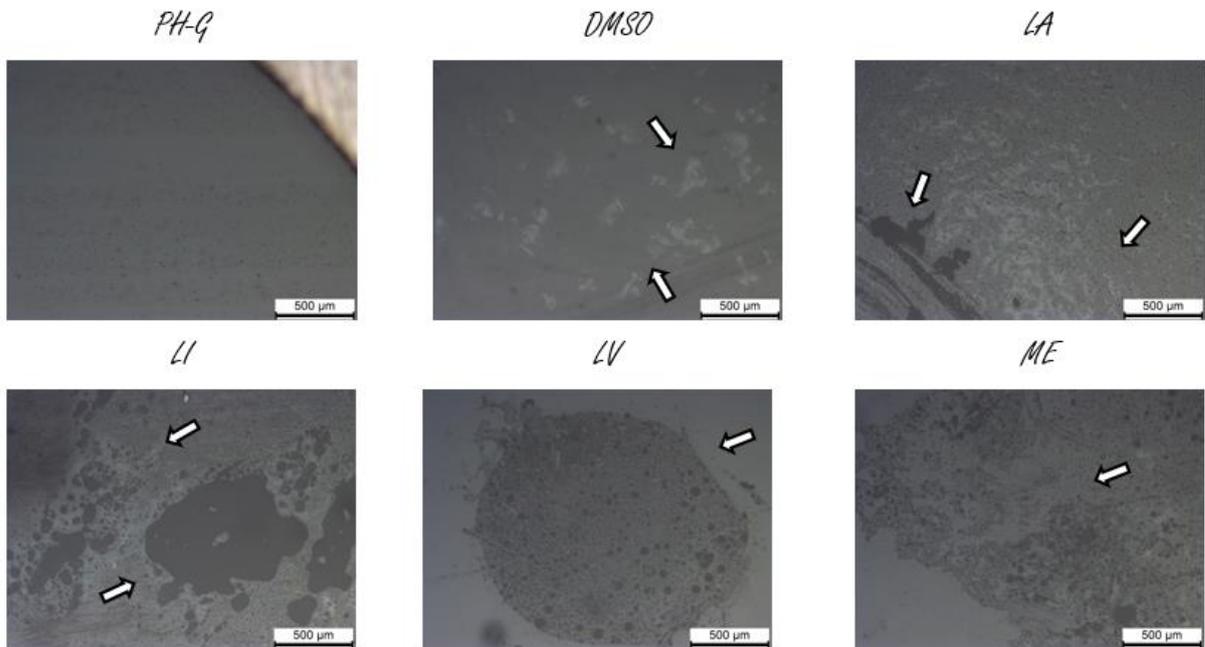
Figura 48 – Registro fotografado pelo microscópio invertido (Leica Microsystems) das alterações superficiais dos discos da PH-G pelo método de sorção por 24 horas.



Na figura 48, os quatro OEs e o controle foram inseridos na região central dos discos pelo método de sorção por 24 horas com uma quantidade de 20  $\mu\text{L}$ . As fotografias dos discos contendo os OEs de LI e LV demonstraram presença do óleo sobre a superfície do polímero. A fotografia do OE de ME permitiu observar a degradação que efetuou sobre o polímero, como evidencia as setas. E a imagem registra pelo microscópio do OE de LA indica que o óleo foi sorvido parcialmente pela placa hidrocolóide. Um detalhe adicional, referente as regiões de colorações escuras, estas indicam a adesão do disco na lâmina, a qual foi colocada no suporte de apoio.

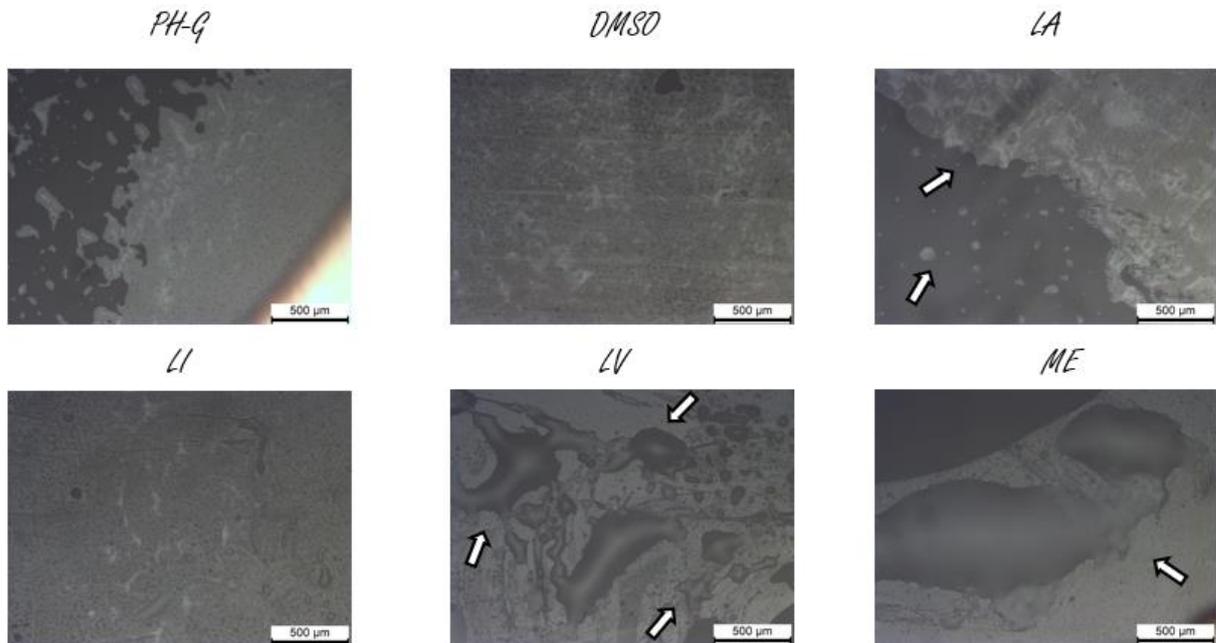
Em virtude do resultado observado da figura 47, foi constatado que a PH-F não foi eficiente para utilizar como um possível veículo de liberação controlada de OEs, portanto, não foi realizado a avaliação de superfície do método de centrifugação para a PH-F.

Figura 49 – Registro fotografado pelo microscópio invertido (Leica Microsystems) das alterações superficiais dos discos da PH-G pelo método de centrifugação, o qual a amostra ficou em contato com as substâncias por 24 horas.



Na figura 49, os quatro OEs e o controle (DMSO) foram inseridos nos discos pelo método da centrifugação com uma quantidade de 50 µL durante 24 horas. As fotografias dos discos contendo os OEs e DMSO demonstraram a sorção em várias localidades evidenciadas pelas disposições dos óleos em pequenas regiões no disco, sendo indicado pelas setas.

Figura 50 – Registro fotografado pelo microscópio invertido (Leica Microsystems) das alterações superficiais dos discos da PH-G pelo método de centrifugação, o qual a amostra ficou em contato no dia da realização desta avaliação.



Na figura 50, os quatro OEs e o controle (DMSO) foram inseridos nos discos pelo método da centrifugação com uma quantidade de 30 µL, em que após esse método foi realizado o registro fotográfico das amostras. As fotografias dos discos contendo os OEs de LA, LV e ME demonstraram a presença do óleo sobre a superfície do material, como evidencia as setas.

### 6.3.3 Ensaio de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Neste ensaio foi utilizado as placas hidrocolóide de espessura fina e grossa (PH-F e PH-G), que contém estruturas como carboximetilcelulose, gelatina e pectina na sua camada interna, em que essa camada teve o contato direto com os OEs e controle (DMSO).

As amostras da PH-F foram sorvidas pelas substâncias citadas no parágrafo anterior pelo método de sorção durante 24 horas, enquanto que as amostras da PH G foram sorvidas pelas substâncias pelo método de centrifugação, em virtude que nos resultados da avaliação superficial da PH foi observado e constatado que a espessura PH F não foi eficiente como veículo de liberação controlada dos OEs, diferente da placa com espessura grossa (PH-G).

Nas tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 são apresentados os principais grupos funcionais das estruturas químicas da PH, dos OEs (LA, LI, LV e ME) e do controle (DMSO), bem como a localização no eixo horizontal (número de onda na unidade  $\text{cm}^{-1}$ ) dos mesmos (PAVIA; LAMPAN; KRIZ,

2001; LEITE, 2014; MAMBRÍ, 2016; SILVEIRA *et. al.*, 2012; MARTINS *et. al.*, 2017; CAMPELO *et. al.*, 2013; OLIVEIRA *et. al.*, 2015; TAVARES *et. al.*, 2005; AGUIAR, 2008; GOMES *et. al.*, 2011).

Tabela 5 – Principais grupos funcionais da PH com sua banda respectiva.

<b>Grupo Funcional (PH)</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>
Deformação axial do grupo ácido carboxílico (C-O)	1300-1000
Alceno de estiramento (C=C)	1680-1600
Grupo éter (C-O)	1300-1050
Alcano de dobramento (CH <sub>3</sub> )	1450 e 1375

Tabela 6 – Principais grupos funcionais da DMSO com sua banda respectiva.

<b>Grupo Funcional (DMSO)</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>
Grupo sulfóxido (S=O)	1060-1040
Alcano de dobramento (CH <sub>3</sub> )	1450 e 1375

Tabela 7 – Principais grupos funcionais da LA com sua banda respectiva.

<b>Grupo Funcional (LA)</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>
Alceno de estiramento (C=C)	1680-1600
Alcano de dobramento (CH <sub>3</sub> )	1450 e 1375
Grupo éter (C-O)	1300-1050

Tabela 8 – Principais grupos funcionais da LI e LV com sua banda respectiva.

<b>Grupo Funcional (LI e LV)</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>
Alceno de estiramento (C=C)	1680-1600
Alcano de dobramento (CH <sub>3</sub> )	1450 e 1375
Grupo éster (C=O)	1750-1740
Grupo éster (C-O)	1300-1050

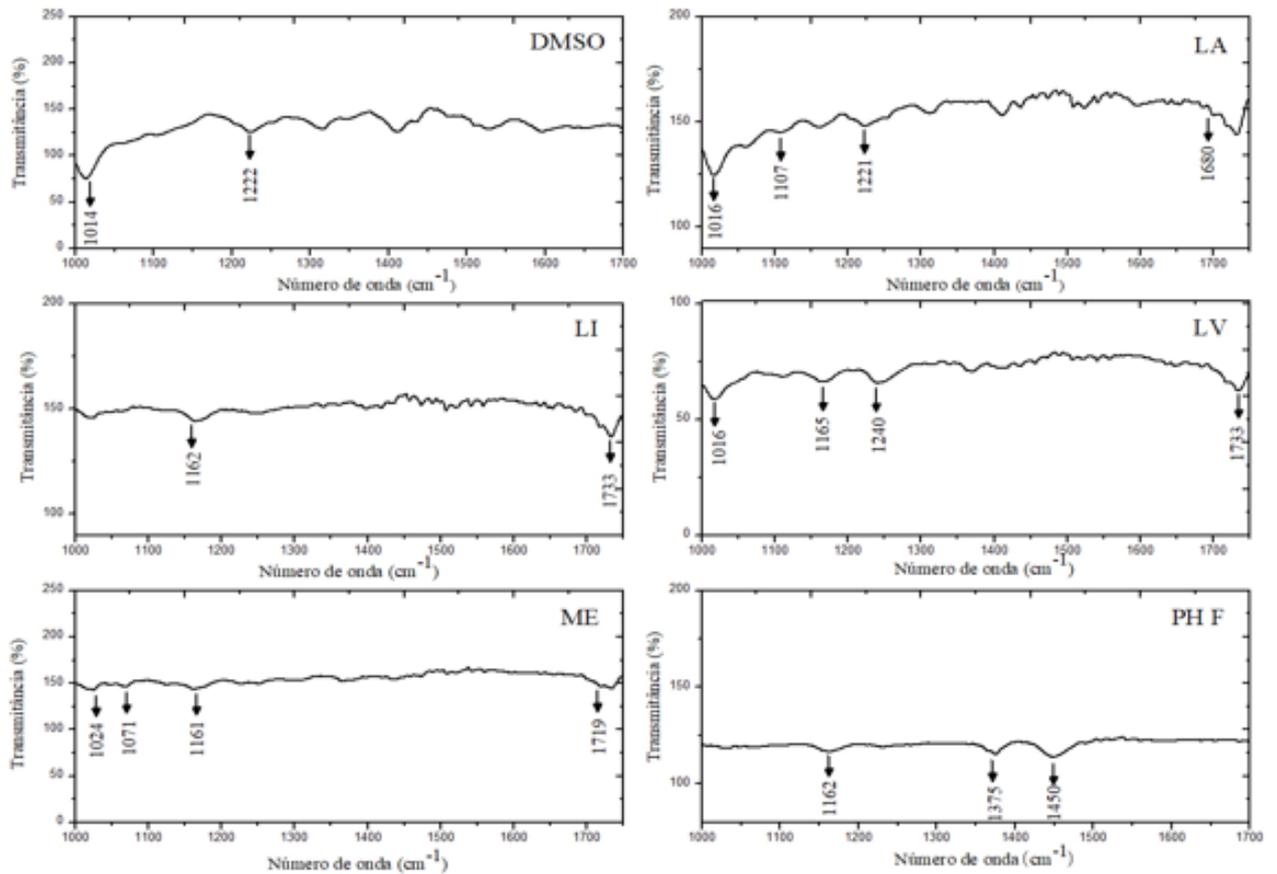
Tabela 9 – Principais grupos funcionais da ME com sua banda respectiva.

<b>Grupo Funcional (ME)</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>
Alceno de estiramento (C=C)	1680-1600
Alcano de dobramento (CH <sub>3</sub> )	1450 e 1375

## Grupo cetona (C=O)

1720-1700

Figura 51 – Espectros de infravermelho da PH F, do tratamento (LA, LI, LV e ME) e do controle (DMSO).

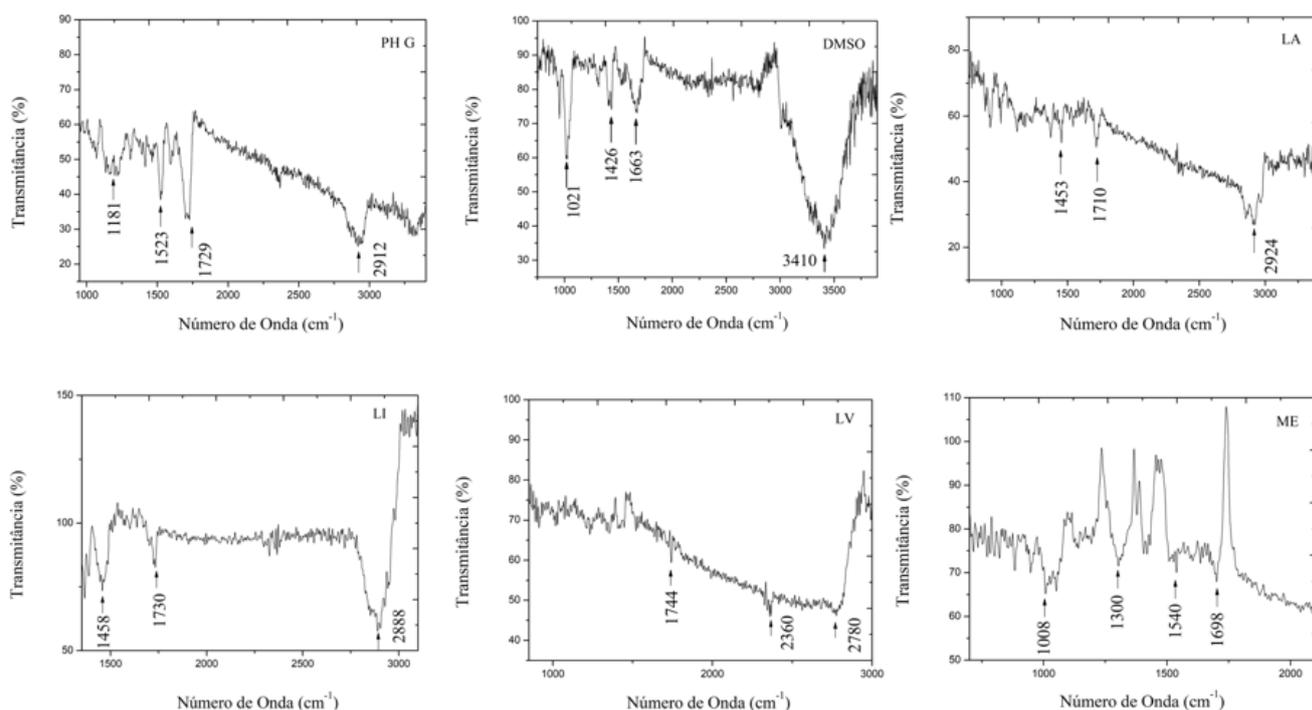


A figura 51 apresenta os espectros da PH F, da sorção da PH com os OEs e com o DMSO. Referente ao espectro FTIR da PH F pode-se observar bandas de deformação axial de C-O de ácidos carboxílicos na região 1662 cm<sup>-1</sup>, bem como a deformação angular de CH<sub>3</sub> nas faixas 1375 cm<sup>-1</sup> e 1450 cm<sup>-1</sup>. No espectro do DMSO apresentou bandas de éteres alifáticos e deformação axial de C-O de ácidos carboxílicos na região 1014 cm<sup>-1</sup>. O espectro da LA foi identificado grupos éteres alifáticos e deformação axial C-O de ácidos carboxílicos nas regiões de 1016 cm<sup>-1</sup> e 1221 cm<sup>-1</sup>, bem como o alceno de estiramento (C=C) na faixa região 1680 cm<sup>-1</sup>.

No espectro do LI, foram observadas bandas de deformação axial de C-O de ácidos carboxílicos na faixa 1662 cm<sup>-1</sup> e do grupo éster C=O na faixa de 1733 cm<sup>-1</sup>. Enquanto que o espectro da LV, foi identificado as bandas de deformação axial de C-O de ácidos carboxílicos nas regiões 1016 cm<sup>-1</sup> e 1240 cm<sup>-1</sup>, além do grupo éster C-O situado na região 1165 cm<sup>-1</sup> e do

grupo éster C=O na faixa  $1733\text{ cm}^{-1}$ . Por fim, o espectro da ME apresentou bandas de deformação axial de C-O de ácidos carboxílicos nas regiões  $1024\text{ cm}^{-1}$  e  $1071\text{ cm}^{-1}$ , como também o grupo éster C-O nas faixas  $1071\text{ cm}^{-1}$  e  $1161\text{ cm}^{-1}$ , e o grupo cetona C=O na região  $1719\text{ cm}^{-1}$ .

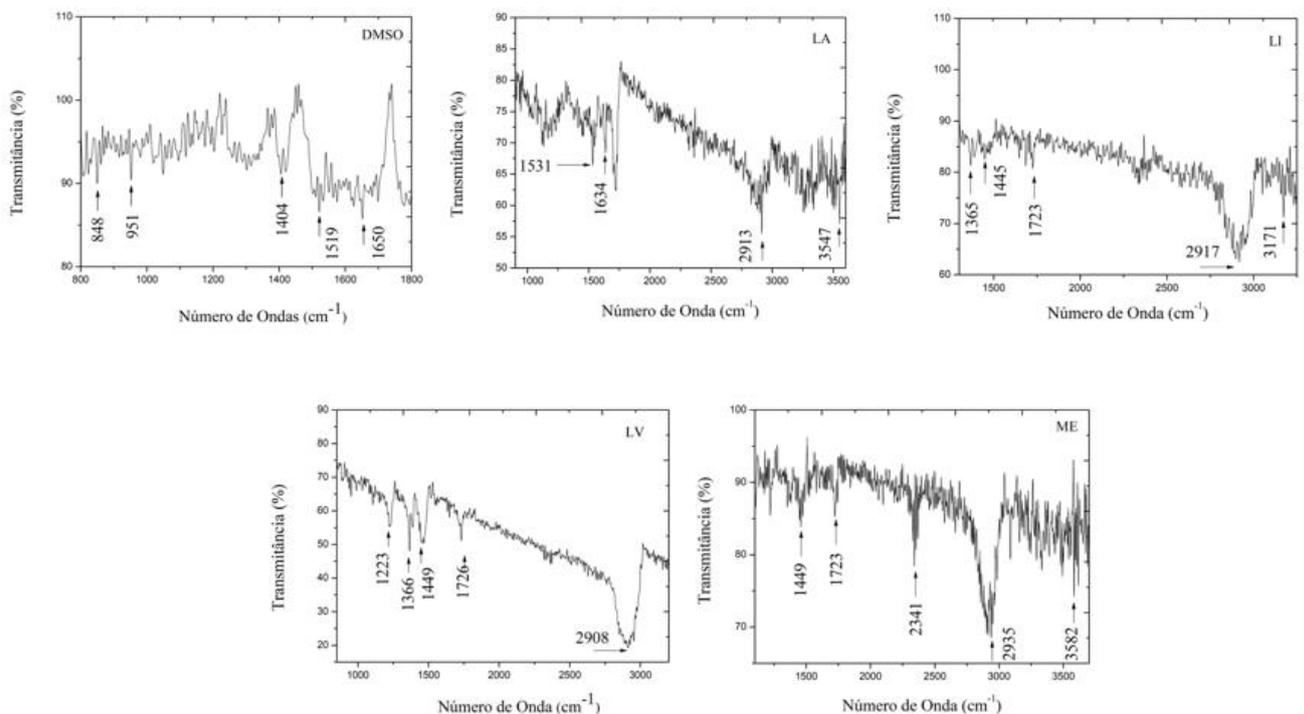
Figura 52 – Espectros de infravermelho da PH G e das sorções dos OEs e DMSO sobre ela na quantidade de  $30\text{ }\mu\text{L}$ .



A figura 52 apresenta os espectros da PH G, da sorção pelo método da centrifugação com uma quantidade de  $30\text{ }\mu\text{L}$  dos OEs e do DMSO, ambos sorvidos na PH G. Referente ao espectro FTIR da PH G pode-se observar bandas de deformação axial de C-O de ácidos carboxílicos e deformação angular de  $\text{CH}_3$  na região  $1181\text{ cm}^{-1}$ . No espectro do DMSO apresentou banda do grupo funcional alcano de dobramento ( $\text{CH}_3$ ) na região  $1426\text{ cm}^{-1}$ . O espectro da LA foi identificado o grupo alcano de dobramento ( $\text{CH}_3$ ) na região  $1453\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro do LI, foram analisadas bandas do grupo funcional alcano de dobramento ( $\text{CH}_3$ ) na região  $1458\text{ cm}^{-1}$  e do grupo éster C=O na faixa de  $1730\text{ cm}^{-1}$ . Enquanto que o espectro da LV, foi identificado o grupo funcional éster C=O na faixa de  $1744\text{ cm}^{-1}$ . Por fim, o espectro da ME apresentou banda no grupo funcional alceno de estiramento (C=C) situada na região de  $1698\text{ cm}^{-1}$ .

Figura 53 – Espectros de infravermelho das sorções dos OEs e DMSO sobre a mesma na quantidade de 50  $\mu\text{L}$ .



A figura 53 apresenta os espectros das sorções pelo método da centrifugação com uma quantidade de 50  $\mu\text{L}$  dos OEs e do DMSO incorporados sobre a PH G. Sobre o espectro FTIR do DMSO, este apresentou banda do grupo funcional alcano de dobramento ( $\text{CH}_3$ ) na região 1404  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro da LA foi identificado o grupo alceno de estiramento ( $\text{C}=\text{C}$ ) na região 1634  $\text{cm}^{-1}$ .

No espectro do LI, foram analisadas bandas do grupo funcional alcano de dobramento ( $\text{CH}_3$ ) na região 1445  $\text{cm}^{-1}$  e do grupo éster  $\text{C}=\text{O}$  na faixa de 1723  $\text{cm}^{-1}$ . Enquanto que o espectro da LV, foram identificadas bandas do grupo funcional alcano de dobramento ( $\text{CH}_3$ ) na faixa de 1449  $\text{cm}^{-1}$ , do grupo éster  $\text{C}=\text{O}$  na faixa de 1726  $\text{cm}^{-1}$  e do grupo éster ( $\text{C}-\text{O}$ ) localizada na região 1223  $\text{cm}^{-1}$ . Por fim, o espectro da ME apresentou bandas nos grupos funcionais alcano de dobramento ( $\text{CH}_3$ ) na região 1449  $\text{cm}^{-1}$ , e do grupo cetona ( $\text{C}=\text{O}$ ) na faixa espectral de 1723  $\text{cm}^{-1}$ .

Perante a esses resultados, pode-se observar que nem todos os grupos funcionais dos dois métodos foram possíveis de serem identificados, em virtude da não ocorrência da vibração molecular através da emissão da radiação infravermelho vibracional, em que o detector do equipamento não conseguiu ler essa vibração. Esse resultado pode ser devido à perda desses grupos funcionais através da liberação gradativa dos OEs no período de 24 horas, e de que pelo

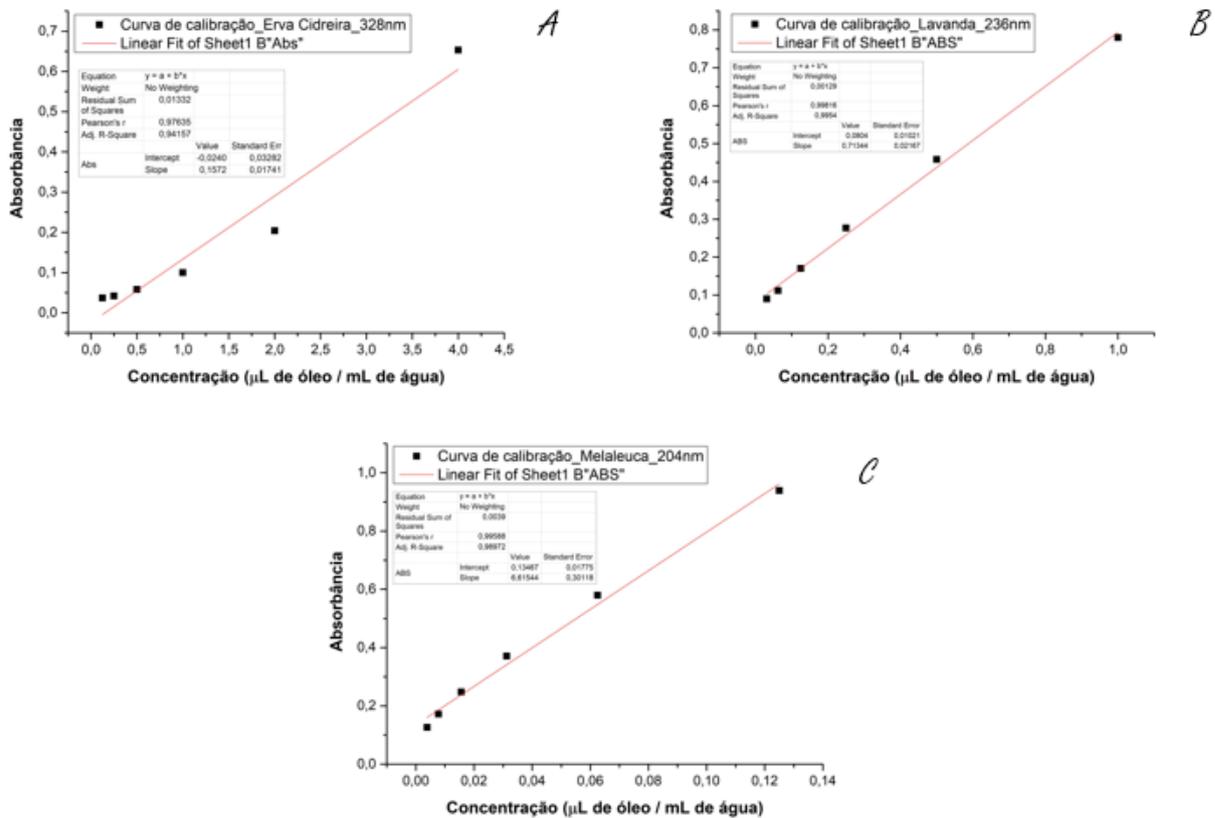
método de centrifugação, pode ter propiciado para que a placa hidrocolóide de alguma maneira tenha aprisionado os compostos voláteis em sua estrutura interna, permitindo com que sua liberação se torne ainda mais prolongada.

#### 6.4 Avaliação do Ensaio de Liberação Controlada dos Óleos Essenciais

O ensaio de liberação controlada foi utilizado com o intuito de analisar a capacidade de liberação dos óleos essenciais pelo polímero (placa hidrocolóide), e tal análise foi importante, pois o objetivo geral desse estudo é a avaliação se o polímero poderia servir como um veículo de liberação controlada e prolongada sobre as linhagens celulares tumoral (B16F10) e não tumoral (L929).

A figura 54 apresenta os gráficos da curva de calibração dos respectivos óleos essenciais utilizados nesse estudo, exceto o de limão, pois este demonstrou não ter um efeito antitumoral eficiente na linhagem tumoral observado pelo resultado 5.1 (avaliação do efeito volátil dos óleos essenciais sobre as linhagens celulares).

Figura 54 – Curva de Calibração dos OEs. (a) erva cidreira; (b) lavanda; e (c) *Melaleuca*.



A curva de calibração representa a relação gráfica entre os valores de absorvância e os de concentração de uma determinada substância, e tem a finalidade de se determinar a linearidade do método e permitir a análise quantitativa do produto (PASCHOAL *et. al.*, 2003). A partir dos gráficos confeccionados pela figura 54 foi possível realizar o cálculo de conversão dos valores de absorvância em concentração para os posteriores gráficos que serão apresentados adiante.

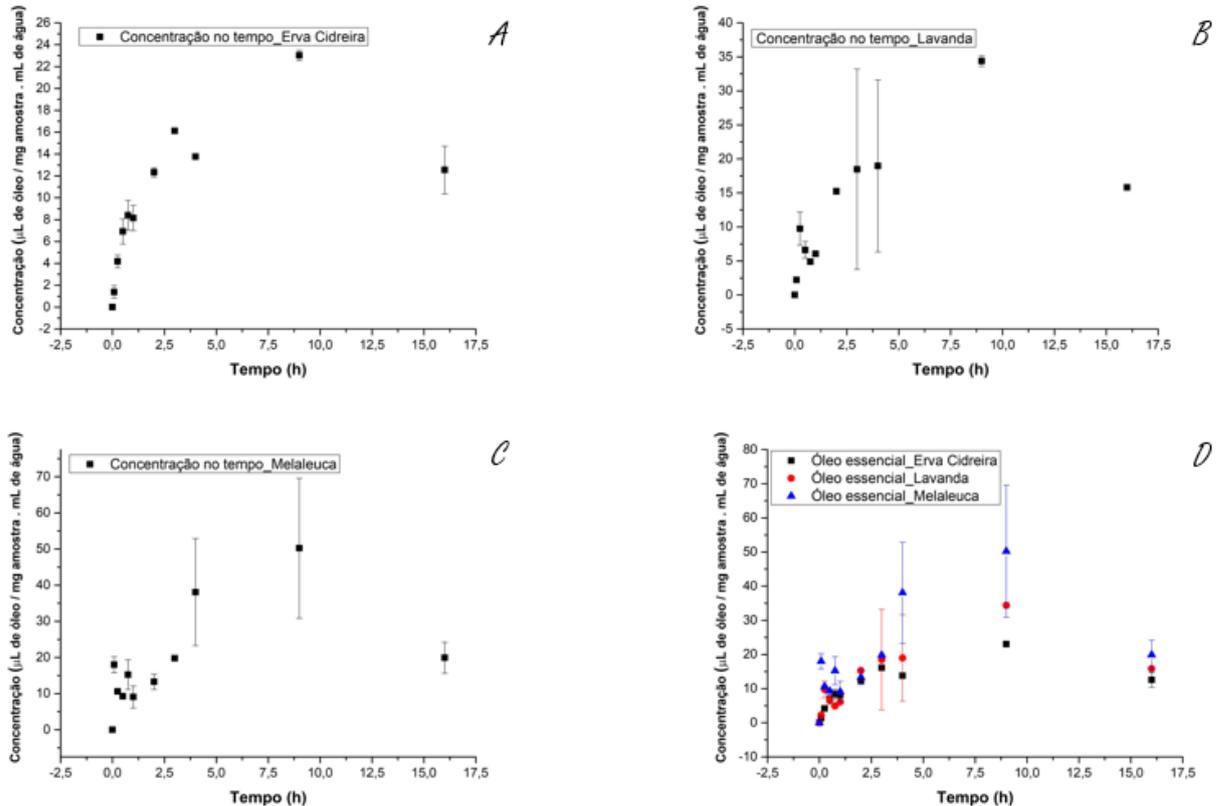
O cálculo é obtido pela seguinte expressão matemática:

$$y = ax + b \quad (6)$$

Onde “y” representa a resposta medida (absorvância) “x” corresponde a concentração, o “a” compreende a inclinação da curva analítica (sensibilidade), e por fim o “b” representa a interseção com o eixo y (quando x = 0).

A figura 55 ilustra graficamente essa curva de cada OE utilizado nesse estudo, com exceção do óleo essencial de limão, e um comparativo entre os eles.

Figura 55 – Curva de concentração dos OEs no decorrer do tempo. (a) erva cidreira; (b) lavanda; (c) *Melaleuca*; e (d) comparação entre os três óleos essenciais.



A figura 55 A apresenta uma curva de liberação com baixos valores de desvio padrão, isso assegura que a placa de hidrocolóide em contato com o óleo essencial de erva cidreira apresenta uma estrutura homogênea. Assim como ocorreu no gráfico da figura 55 A, a curva de liberação da figura 55 B mostrou, no início do teste de liberação, que as primeiras amostras apresentaram uma barra de desvio padrão relativamente pequena, contudo, ao percorrer do tempo de liberação obteve-se uma diferença desse desvio. Isso pode ser um indicativo de que o método de incorporação (centrifugação) do OE no polímero não foi tão efetivo, uma vez que as duas amostras foram inseridas no mesmo tubo de ensaio contendo o OE, e isso pode ter propiciado a sobreposição das amostras, dificultando a incorporação do OE para dentro das amostras. Portanto, essa diferença foi proveniente da sobreposição que contribuiu para que a quantidade de OE sorvida em cada amostra fosse diferente. Sendo assim, o contato da amostra, sorvida com OE, em PBS resultou em uma liberação de maneira diferente. Todavia, por mais que resultou em uma diferença, teve-se uma liberação controlada depois de 2,5 horas. O gráfico ilustrado na figura 55 C demonstrou um comportamento semelhante comparando-se com o gráfico do OE de lavanda (figura 55 B).

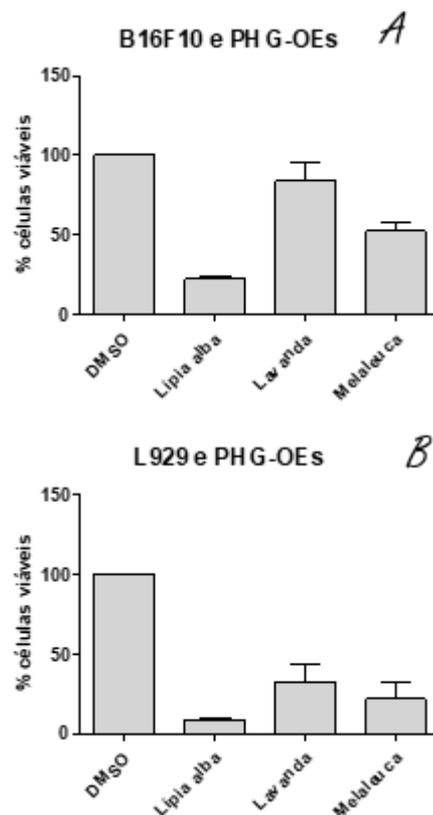
Por fim, a figura 55 D apresenta uma comparação da liberação de concentração dos OEs sorvidos na placa hidrocolóide, pode-se observar que o OE de *Melaleuca* propiciou uma liberação em maior quantidade pelo tempo analisado, em virtude de uma menor afinidade entre a PH com as moléculas presente do OE, indicando, portanto, uma menor interação entre ambos. Diferentemente do que foi observado no OE de erva cidreira, em que se teve uma liberação em menor quantidade comparando-se com os outros dois OEs, isso pode ser decorrente de uma interação intensa entre o polímero e a amostra, permitindo com que a liberação no meio aquoso (PBS) fosse de uma maneira mais prolongada. Por sua vez, o OE de lavanda apresentou um comportamento intermediário comparando com os OEs de erva cidreira e *Melaleuca*.

Ademais, foi observado no ensaio de liberação controlada que durante o preparo das alíquotas, o polímero comercial foi se degradando parcialmente durante cada coleta, isso também permitiu que a liberação ocorresse de maneira diferente. Portanto, esse efeito de degradação da PH, devido as características distintas dos OEs, ocasionou a diferença observada no desvio padrão.

### 6.5 Avaliação da Liberação Gradativa do Efeito Volátil dos Óleos Essenciais Sorvidos na Placa Hidrocolóide sobre as Linhagens Celulares

Para avaliar a liberação controlada dos OEs propiciada pelo veículo placa hidrocolóide nas linhagens celulares comparando-se com o controle (DMSO) foram realizados o ensaio de viabilidade celular mensurada através do método colorimétrico MTT. Os dados obtidos após a realização da leitura pelo equipamento ELISA foram tratados no software Prism (GraphPad Software Inc., EUA), em que para normalizar os resultados foi considerado a placa controle (DMSO) como 100% de células viáveis e o cálculo realizado foi obtido a partir de uma regra de três para determinar a viabilidade celular das amostras.

Figura 56 – Viabilidade celular verificada através do ensaio MTT. (A) linhagem tumoral (B16F10) exposta ao método de sorção por centrifugação dos OEs diluídos percentualmente a 75% e do controle (DMSO); (B) linhagem não tumoral (L929) exposta pelos OEs diluídos.



Na figura 56, pode-se verificar de maneira comparativa a média de células viáveis das linhagens celulares (B16F10 e L929) após exposição ao PH G+DMSO (controle) e o PH G+LA, PH G+LV, PH G+ME. A figura 56 A demonstra que os três óleos apresentaram atividade de compostos voláteis sobre a linhagem tumoral, quando comparado ao grupo controle (DMSO).

No entanto, a figura 56 B demonstra que os mesmos resultados foram observados com a célula não tumoral (L929).

Então, pode-se verificar na figura 56, de maneira geral, que os OEs de LA (*Lippia alba*) e de ME (*Melaleuca*) apresentaram uma maior eficácia da sua propriedade antitumoral sobre a viabilidade celular das linhagens celulares, diferentemente do que foi demonstrado com o OE de LV (lavanda). Nesse estudo não foi utilizado o OE de LI (limão), em virtude de não ter tido um efeito volátil eficiente sobre a linhagem tumoral.

Diante desses dados preliminares, estes sugerem que a PH G foi capaz de liberar os compostos voláteis sobre a linhagem tumoral, no entanto, essa liberação afetou a linhagem não tumoral. Através do ensaio de liberação controlada possibilitou o entendimento do comportamento dos OEs de erva cidreira, lavanda e *Melaleuca*, em que o OE de *Melaleuca* demonstrou uma liberação em maior quantidade, porém de maneira controlada após 2,5 horas, porém seu efeito sobre as linhagens ocorreu com uma conduta menos efetiva sobre a linhagem tumoral, diferentemente do que ocorreu com o OE de erva cidreira, o qual teve uma liberação em menor quantidade, controlada após 2,5 horas, no entanto, apresentou um efeito mais eficiente do que o OE de ME.

Estes comportamentos sobre as linhagens celulares podem ser provenientes da maneira como foi disposto os discos incorporados pelos OEs entre os poços da placa de cultura, em que por mais que a ilustração apresentada na metodologia 4.3.2 indica a maneira como teria que ser executada, todavia, no momento em que foi realizado esse ensaio *in vitro*, alguns discos não ficaram totalmente no centro como indicado pela ilustração, isso pode ter afetado parcialmente a avaliação desse ensaio.

Assim, na sequência desse estudo, será trabalhado e voltado ao estudo das diluições dos óleos essenciais na finalidade de atenuar esse efeito volátil sobre as linhagens não tumorais.

Diferentes estudos têm demonstrado o interesse de muitos pesquisadores em estudar os efeitos voláteis dos OEs sobre diferentes tipos de câncer, sendo que a forma de aplicação, a concentração e o desenvolvimento de reações alérgicas são preocupações elencadas por diversos pesquisadores (SUHAIL *et al.*, 2011; REIS e JONES, 2017; AZIZ ZAA *et al.*, 2018; ISHFAQ *et al.*, 2018). Porém se estes problemas forem resolvidos, é possível que estes óleos se tornem uma terapia adjuvantes para alguns tipos de câncer, entre estes o melanoma cutâneo.

## 7. CONCLUSÃO

- O efeito volátil dos OEs diluídos (75%) de *Melaleuca*, lavanda e erva cidreira se mostraram mais eficazes para diminuir a viabilidade das células B16F10 *in vitro*, do que o OE de limão;
- A volatilidade dos OEs diluídos também apresentou efeito intenso sobre a linhagem não tumoral L929 *in vitro*;
- Comparativamente a sorção da PH G foi mais eficiente do que a PH F, devido sua espessura ser mais resistente à degradação exercida dos OEs;
- Comparativamente o método de sorção por centrifugação foi mais eficaz do que a sorção passiva (por 24h).;
- O método de sorção por centrifugação se mostrou melhor em preservar a estrutura e a integridade da PH G;
- Através do ensaio de liberação controlada dos OEs sorvidos na PH G foi possível observar que o OE de ME teve uma liberação em maior quantidade, diferentemente do que foi demonstrado pelo OE de LA, o qual teve uma liberação em menor quantidade, demonstrando que precisa aumentar a sua quantidade de sorção sobre a PH;
- A liberação controlada dos OEs sorvidos na PH G sobre a linhagem tumoral demonstrada pela técnica colorimétrica MTT resultou na redução da viabilidade celular.

## 8. REFERÊNCIAS

Afinko Soluções em Polímeros. **Tração: saiba tudo sobre esse ensaio**, 2019. Disponível em: <https://afinkopolimeros.com.br/ensaio-de-tracao/>. Acesso em: 01 dez. 2020.

AGUIAR, Jaciana S.; COSTA, Maria C. C. D.; NASCIMENTO, Silene C.; SENA, Kêsia X. F. R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista brasileira farmacognosia**, v. 18, n. 3, 436-440, 2008.

AIRES, Marcelo Augusto Martins; GUEDES, Virgílio Ribeiro. Novas terapias com alvo-molecular para o câncer de pulmão de não-pequenas células. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 5, n. 1, p. 65-69, 2018.

ALMEIDA, Diogo Barata de; LOPES, Márcia Gonçalves. Recidiva tardia de melanoma cutâneo: relato de caso. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 32, p. 410-414, 2016.

ALMEIDA, Patrícia de Oliveira Santos. **Atividade citotóxica do óleo essencial de *Lippia spp.* frente a células da linhagem A549 de carcinoma de pulmão humano**. 2016. 42f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2016.

ALVES, Bárbara. **Óleo essencial de Lavanda (*Lavandula angustifolia*) no tratamento da ansiedade**. 2018. 27 f. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2018.

Amvī Cosméticos Naturais. **Óleos Essenciais**, 2017. Disponível em: <https://www.entrapele.com.br/post/2017/08/18/oleos-essenciais-aromaterapia-cosm%C3%A9ticos-pele>. Acesso em: 28 nov. 2020.

ANDREI, Patrícia; COMUNE, Aparecida Peres Del. Aromaterapia e suas aplicações. **Centro Universitário S. Camilo**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 57-68, 2005.

ANGELOTTI, Nicola. **Breslow-thickness**, c2020. Disponível em: <https://www.ilmelanoma.com/melanoma/stadiazione-e-prognosi/indice-di-breslow/breslow-thickness/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

AQUINO, Fabio G.; SHELDRAKE, Terry; CLEVELARIO, Judimar; PIRES, Fabio. Estudo do Envelhecimento de Poliuretanos Aplicados na Indústria de Petróleo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 33-38, 2010.

ARAÚJO, João Paulo Miranda Ribeiro. **Estudo químico da *Lavandula luisieri***. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.

ASSMANN, Charles Elias; CADONÁ, Francine Carla; BONADIMAN, Beatriz da Silva Rosa; DORNELLES, Eduardo Bortoluzzi; TREVISAN, Gabriela; CRUZ, Ivana Beatrice Mânica da. Tea tree oil presents *in vitro* antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1253-1261, 2018.

AUGUSTYL, Adam. Encyclopaedia Britannica. **Limão**, c2020. Disponível em: <https://www.britannica.com/plant/cherry-laurel>. Acesso em: 28 nov. 2020.

AZIZ ZAA, AHMAD A, SETAPAR SHM, KARAKUCUK A, AZIM MM, LOKHAT D, RAFATULLAH M, GANASH M, KAMAL MA, ASHRAF GM. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. **Curr Drug Metab.** 2018;19(13):1100-1110.

Ballke. **Curativo Hidrocoloide Curatec a Unidade (20x20cm)**, c2020. Disponível em: [https://ballke.com.br/produtos/curativo-hidrocoloide-curatec-a-unidade\\_20x20cm/](https://ballke.com.br/produtos/curativo-hidrocoloide-curatec-a-unidade_20x20cm/). Acesso em: 28 nov. 2020.

BARBOSA, Fernanda de Souza. **Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea**. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BERNARDO, Ana Flávia Cunha; SANTOS, Kamila dos; SILVA, Débora Parreiras da. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em Foco**, n. 11, 2019.

BetaEQ. **Química dos perfumes II: a essência das essências**, 2019. Disponível em: <https://betaeq.com.br/index.php/2019/04/10/quimica-dos-perfumes-ii-a-essencia-das-essencias/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

BIASI, Luiz Antônio; COSTA, Giampalolo. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, 2003.

BRANQUINHO, Maryana Stephany Ferreira. **Papel do metabolismo de triptofano e do interferon- $\alpha$  na melanogênese**. 2019. 58 f. Tese (Dourado em Fisiopatologia e Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2019.

Brasil. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo (CRF SP). *Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2019.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. *Terapia-alvo (vemurafenibe, dabrafenibe, cobimetinibe, trametinibe) e imunoterapia (ipilimumabe, nivolumabe, pembrolizumabe) para o tratamento de primeira linha do melanoma avançado não-cirúrgico e metastático*. Brasília, 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. *Manual de Condutas para Úlceras Neurotróficas e Traumáticas*. Brasília: Ministério da Saúde: Secretaria de Políticas de Saúde, 2002.

BRASIL. Secretaria Municipal de Saúde. Prefeitura Municipal de Florianópolis. **Protocolo de Cuidados de Feridas**. Florianópolis, 2008. 80p.

BUCUR, Mihai; CONSTANTIN, Carolina; NEAGU, Monica; ZURAC, Sabina; DINCA, Octavian; VLADAN, Cristian; CIOPLEA, Mirela; POPP, Cristiana; NICHITA, Luciana; IONESCU, Ecaterina. Alveolar blood clots and platelet-rich fibrin induce *in vitro* fibroblast

proliferation and migration. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 17, n. 2, p. 982-989, 2019.

BYAHATTI, Sujata M.; BOGAR, Chetana; BHAT, Kishore; DANDAGI, Girish. Evaluation of anticancer activity of *Melaleuca alternifolia* (i.e., tea tree oil) on colon cancer cell line (HT29): An *in vitro* study. **Journal of Advanced Clinical & Research Insights**, v. 5, p. 99-103, 2018.

CAMILLO, Flávia da Cunha. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, n. 4, 2016.

CAMPELO, L.M.L.; SÁ, C.G.; FEITOSA, C.M.; SOUSA, G.F.; FREITAS, R.M. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 708-716, 2013.

Cancro online. **Tratamento do melanoma**, c2020. Disponível em: <https://www.cancro-online.pt/melanoma/informacao-basica/tratamento/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

CARVALHO, Antonia Patrícia da Silva; CONCEIÇÃO, Gonçalo Mendes da. Utilização de plantas medicinais em uma área da estratégia de saúde da família, Caxias, Maranhão. **Enciclopédia Bioesfera**, 2015.

CASTRO, João Gabriel. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Pesquisa com erva-cidreira pode beneficiar pequenos agricultores da Baixada Fluminense**, 2020. Disponível em: <https://portal.ufrrj.br/pesquisa-da-ufrrj-com-erva-cidreira-pode-beneficiar-pequenos-agricultores-da-baixada-fluminense/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

CESTARI, Simara da Costa Pereira. **Dermatologia Pediátrica**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2012. 757 p.

CORREA, Leonardo Tibiriçá; NICOLETTI, Maria Aparecida; DE AMORIM, Cledja Soares; DA COSTA, Amanda Ramos; LEONI, Luís Antônio Bafille; MUNÖZ, Juliana Weckx Peña; FUKUSHIMA, André Rinaldi. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca* e sua incorporação em um creme mucocutâneo. **Revista Fitos**, v. 14, n. 1, p. 26-37, 2020.

COSTA, Helena Olegário. **Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos finos: análise da densidade microvascular utilizando-se os marcadores D2-40 e CD31**. 2008. 109 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Curatec. **Curatec Hidrocolóide**, c2020. Disponível em: <https://www.curatec.com.br/curatec-hidrocoloide>. Acesso em: 28 nov. 2020.

DANTAS, Élida Livia Rafael; SÁ, Fernando Henrique de Lima; CARVALHO, Sionara Melo de Figueiredo; ARRUDA, Anderson Pontes; RIBEIRO, Evelane Marques; RIBEIRO, Erlane Marques. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2009.

FELIZARDO, Vinícius Augusto. **Extração e análise do óleo de *Cinnamomum cassia* Presl (CANELA)**. 2017. 37 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Química) - Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, 2017.

FERREIRA, Ana Rita Alvez. **Uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos**. 2014. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

Filha da Terra. **Tea Tree 10ml (*Melaleuca alternifolia*)**, c2020. Disponíveis em: <https://www.filhadaterra.com/tea-tree.html>. Acesso em: 28 nov. 2020.

FLORES E, YÉLAMOS O, CORDOVA M, KOSE K, PHILLIPS W, LEE EH, ROSSI A, NEHAL K, RAJADHYAKSHA M. Peri-operative delineation of non-melanoma skin cancer margins in vivo with handheld reflectance confocal microscopy and video-mosaicking. **J Eur Acad Dermatol Venéreos**. 2019 Jun;33(6):1084-1091.

FRANCO, Norma Salgado. Fundamentos em Bio-Neuro Psicologia PUC-Rio. **Embriologia do sistema nervoso**, c2020. Disponível em: <http://bio-neuro-psicologia.usuarios.rdc.puc-rio.br/embriologia-do-sistema-nervoso.html>. Acesso em: 28 nov. 2020.

GARLET, Tanea Maria Bisognin. **Plantas medicinais nativas de uso popular no Rio Grande do Sul**. Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

GEZICI, Sevgi. Promising anticancer activity of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) essential oil through induction of both apoptosis and necrosis. **Annals of Phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 38-45, 2018.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GRACIOLI, Emanuelli Cabral; WINTER, Patrícias; ZIULKOSKI, Ana Luiza; SPILKI, Fernando; DULLIUS, Jeane; EINLOFT, Sandra; PERINI, Sílvio; BODANESE, Luiz Carlos; JAHNO, Vanusca Dalosto; LIGABUE, Rosane Angélica. Dispositivos poliméricos cardiovasculares: comportamento termomecânico e viabilidade celular. **Revista Matéria**, v. 18, n. 2, p. 1313-1322, 2013.

Grupo Brasileiro de Melanoma (GBM). **O Melanoma**, c2020. Disponível em: <https://gbm.org.br/o-melanoma/#textos>. Acesso em: 28 nov. 2020.

GUGLIELMI, Daniel; NEVES, Wenceslau Fernandes das; BUOSO, Alberto. Caracterização da Carboximetilcelulose Comercial. **Cerâmica Industrial**, v. 13, n. 5, 2008.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

Imanis Life Sciences. **B16F10-Fluc-Puro**, c2020. Disponível em: <https://imanislife.com/products/b16f10-fluc-puro/#!>. Acesso em: 28 nov. 2020.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 4. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2018. 111 p. ISHFAQ PM, SHUKLA A, BERAIYA S, TRIPATHI S, MISHRA SK. Biochemical and Pharmacological Applications of Essential Oils in Human Health Especially in Cancer Prevention. **Anticancer Agents Med Chem**. 2018;18(13):1815-1827.

JOMAA, Samer; RAHMO, Abdulkader; ALNORI, Ahmad Samir; CHATY, Mohammad Eyad. The Cytotoxic Effect of Essential Oil of Syrian *Citrus limon* Peel on Human Colorectal Carcinoma Cell Line (Lim1863). **Middle East Journal of Cancer**, v. 3, n.1, p. 15-21, 2012.

JUNIOR, Sebastião Vicente Canevarolo. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1 ed. São Paulo: Artliber, 2004. 435 p.

Laboratório Biomarker. **Melanoma**, c2020. Disponível em: <https://biomarker.com.br/melanoma/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

LEITE, Liliame Samara Ferreira; PIZA, Marcos Antônio; MOREIRA, Francys Kley Vieira; MATTOSO, Luiz Henrique Capparelli. **Preparação e caracterização de bionanocompósitos à base de gelatina e nanocristais de celulose por casting contínuo**. In: IX WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 10., 2017. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017, p. 209-212.

LEITE, Thays de Carvalho Martins. **Espectroscopia de Fotofragmentação e Fotoabsorção de Camada Interna da Acetona e do Dimetilsulfóxido (DMSO)**. 2014. 146 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

LIMA, Jackeline Cristina Gomes de. **Imunovigilância e mecanismos de escape tumoral: Principais abordagens terapêuticas**. 2010. 16 f. Especialização em Imunologia - Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto, 2010.

LOPES, Ademar; CHAMMAS, Roger; IYAYASU, Hirofumi. **Oncologia para a Graduação**. 3. ed. São Paulo: Lemar, 2013. 752 p.

LO, Jennifer A.; FISHER, David E. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. **Science**, v. 346, p. 945-949, 2014.

LOPES, Jéssica Dayane. **Principais avanços no tratamento do melanoma cutâneo: Imunoterapia e terapia alvo**. 2018. 37 f. Trabalho de conclusão de curso - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2018.

LOTÉRIO, Ligia. **Alguns cânceres de pele não têm nada a ver com o sol: veja como surgem e seu sinais**, c2005. Disponível em: [https://www.vix.com/pt/saude/553229/cancer-afeta-regiao-do-rostoque-ninguem-aplica-protetor-doenca-fica-ainda-mais-grave?utm\\_source=next\\_article](https://www.vix.com/pt/saude/553229/cancer-afeta-regiao-do-rostoque-ninguem-aplica-protetor-doenca-fica-ainda-mais-grave?utm_source=next_article). Acesso em: 28 nov. 2020.

MAMBRI, Ana Paula de Souza. **Lavandula dentata L. Sob o Efeito da Radiação Solar e de Diferentes Épocas de Colheita**. 2016. 77f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

- MÂNICA, Aline; LANG, Maria Teresa Granella. Relação entre o desenvolvimento do melanoma cutâneo e o estresse oxidativo. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 1, p. 22-25, 2017.
- MARTINS, Gisele dos Santos Oliveira; ZAGO, Hugo Bolsoni; COSTA, Adilson Vidal; JUNIOR, Luis Moreira de Araújo; CARVALHO, José Romário de. Caracterização química e toxicidade de óleos essenciais cítricos sobre *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Revista Caatinga**, v. 30, n. 3, p. 811-817, 2017.
- MATEJUK, Agata. Skin Immunity. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 66, p. 45-54, 2018.
- MELO, Raquel. **Divisão Celular: Mitose e Meiose**, 2014. 67 slides. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/raeckell11/mitose-e-meiose-primeiro-ano>. Acesso em: 28 nov. 2020.
- MENDONÇA, Rosimeri da Silva Castanho; RODRIGUES, Geruza Baima de Oliveira. As principais alterações dermatológicas em pacientes obesos. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 1, p. 68-73, 2011.
- MONTANARI, Tatiana. **Histologia: Texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2016. 229 p.
- MORETTO, Barbara Michele; BUENO, Camilo Davi Cordeiro; MORAIS, Lorena Rafaela. **Aromaterapia: O Benefício das Plantas Aromática e Óleos Essenciais - Uma Revisão de Literatura**. 2015. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Paraná, Matinhos, 2015.
- NIEZGODA, Anna; NIEZGODA, Piotr; CZAJKOWSKI, Rafał. Novas abordagens para o tratamento do melanoma avançado: uma revisão sobre terapia direcionada e imunoterapia. **BioMed Research International**, v. 2015, Artigo ID 851387, 16 p., 2015.
- OLIVEIRA, A. C. M.; FONTANA, A.; NEGRINI, T. C.; NOGUEIRA, M. N. M.; BEDRAN, T. B. L.; ANDRADE, C. R.; SPOLIDORIO, L. C.; SPOLIDORIO, D. M. P. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 492-499, 2011.
- OLIVEIRA, Isabel Oliveira de; JUNIOR, Hiram Larangeira de Almeida. Conhecimentos atuais sobre a biologia dos melanócitos no folículo piloso humano. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 3, 2003.
- OLIVEIRA, Marcielli Indira de; SCHNEIDER, Manuella; ROSA, Maira Braga da; SILVA, Chana Medeiros da; MORAES, Maria Silvana Aranda; SCHNEIDER, Rosana de Cassia de Souza; KIST, Lourdes Teresinha. Extração e Caracterização do Óleo Essencial de *Melaleuca* e Desenvolvimento de Uma Formulação Semi-sólida de Uso Tópico. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 5, n. 1, p. 50-59, 2015.
- PASCHOAL, Luís Roberto; FERREIRA, Weverson Alvez; PRADO, Mara Régia Dias; VILELA, Ana Paula Oliveira. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na

identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2003.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S. **Introduction to Spectroscopy**. 3 ed. Bellingham: Thomson Learning Academic Resource Center, 2001.

PÉRTILE, Renata Aparecida Nedel. **Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PINHEIRO, Ana Maria Costa; CABRAL, Andrea Leão Santos Veiga; FRIEDMAN, Horácio; RODRIGUES, Helbert Abe. Melanoma cutâneo: características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas no Hospital Universitário de Brasília entre janeiro de 1994 e abril de 1999. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 2, p. 179-186, 2003.

PLANA, A. Moya; ROUTIER, E.; MATEUS, C.; KOLB, F.; ROBERT, C. Melanoma cutâneo cervicofacial. **EMC Otorrinolaringologia**, v. 46, n. 4, p. 1-9, 2017.

POTTEZ M, TRAPPETTI V, BOUCHET A, FERNANDEZ-PALOMO C, GÜÇ E, KILARSKI WW, HLUSHCHUK R, LAISSUE J, DJONOV V. Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. **PLoS One**. 2018 Nov 5;13(11): e0206693.

POTT, Franciele Soares; MEIER, Marineli Joaquim; STOCCO, Janislei Gisele Dorociak; CROZETA, Karla; RIBAS, Janyne Dayane. A efetividade do hidrocoloide versus outras coberturas na cicatrização de úlceras por pressão em adultos e idosos: revisão sistemática e metanálise. **Revista Latino- Americana de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 511-520, 2014.

Regional Rehab & Mobility. **DuoDerm CGF Dressings**, c2020. Disponível em: <https://regionalrehab.com.au/product/duoderm-cgf-dressings/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

REIS D, JONES T. Aromatherapy: Using Essential Oils as a Supportive Therapy. **Clin J Oncol Nurs**. 2017 Feb 1;21(1):16-19.

Revista Abrale. **Neste Dezembro Laranja, atenção com o câncer de pele do tipo melanoma**, 2019. Disponível em: <https://revista.abrale.org.br/atencao-ao-cancer-de-pele-melanoma/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

RIBEIRO, Ana Maria Quinteiro. **Fatores Prognósticos de Melanoma Cutâneo em um Estudo de Base Populacional em Goiânia**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

RIVITTI, Evandro A. **Manual de Dermatologia de Sampaio e Rivitti**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2014. 748 p.

RUSSO, Rossella; CORASANITI, Maria Tiziana; BAGETTA, Giacinto; MORRONE, Luigi Antonio. Exploitation of Cytotoxicity of Some Essential Oils for Translation in Cancer Therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternatice Medicine**, p. 1-9, 2015.

SALEH, Najla Adel. **Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais**. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SANTOS, Ana Paula Silva de Azevedo dos. **Efeito do microambiente tumoral sobre as características funcionais e fenotípicas de células dendríticas geradas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico de voluntárias saudáveis e de pacientes com câncer de mama**. 2010. 33 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Unidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SANTOS, Marcella Esteves Vita. **Novas Terapias para o Câncer de Pele do Tipo Melanoma**. 2017. 67 f. Trabalho de conclusão de curso - IBMR Laureate Internacional Universities, Rio de Janeiro, 2017.

SILVA, Cassio Fernando Nunes da; MELO, Gabriella Pasqual; BERNARDES, Sara Santos; CECCHINI, Alessandra Armani. Modelos experimentais de melanoma murino *in vivo*. **Biosaúde**, v. 15. n. 2, 2013.

SILVA, Constanza Thaise Xavier. **Análise dos fatores epidemiológicos, clínico-patológicos e expressão das proteínas OCT4 e NANOG em amostras de melanoma cutâneo**. 2016. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

SILVEIRA, Sheila Mello da; JR., Anildo Cunha; SCHEUERMANN, Gerson Neudí; SECCHI, Fábio Luiz; VERRUCK, Silvani; KROHN, Marisete; VIEIRA, Cleide Rosana Werneck. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 471-480, 2012.

SONDA, Laíse Cristine. **Fatores de Risco para Melanoma: Uma Revisão Integrativa**. 2011. 17f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2011.

SPLABOR. **Estufa para Laboratório e Incubadoras: Qual é a Ideal para Sua Aplicação?**, 2018. Disponível em: <http://www.splabor.com.br/blog/incubadora-b-o-d/estufas-e-incubadoras-descubra-qual-e-a-melhor-camara-para-sua-aplicacao/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

SUHAIL MM, WU W, CAO A, MONDALEK FG, FUNG KM, SHIH PT, FANG YT, WOOLLEY C, YOUNG G, LIN HK. Boswellia sacra essential oil induces tumor cell-specific apoptosis and suppresses tumor aggressiveness in cultured human breast cancer cells. **BMC Complement Altern Med**. 2011 Dec 15;11:129.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 15, p. 1-5, 2005.

THAM M, KHOO K, YEO KP, KATO M, PREVOST-BLONDEL A, ANGELI V, ABASTADO JP. Macrophage depletion reduces postsurgical tumor recurrence and metastatic

growth in a spontaneous murine model of melanoma. **Oncotarget**. 2015 Sep 8;6(26):22857-68.

THAM M, KHOO K, YEO KP, KATO M, PREVOST-BLONDEL A, ANGELI V, ABASTADO JP. Macrophage depletion reduces postsurgical tumor recurrence and metastatic growth in a spontaneous murine model of melanoma. **Oncotarget**. 2015 Sep 8;6(26):22857-68.

TOLEDO, Denise Caroline. **Fatores Genéticos e Moleculares Relacionados ao Melanoma: Revisão da Literatura**. 2012. 35 f. Seminário - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

TORTORA, Gerard J.; NIELSEN, Mark T. **Princípios de Anatomia Humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 1110 p.

TSEPKOLENKO, Anna; TSEPKOLENKO, Vladimir; DASH, Sabyasachi; MISHRA, Apoorva; BADER, Augustinus; MELERZANOV, Alexander; GIRI, Shibashish. The regenerative potential of skin and the immune system. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v. 12, p. 519–532, 2019.

VICENTE, Anna Luiza Silva Almeida. **Perfil Molecular de Melanomas Cutâneos e de Mucosas**. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) - Biblioteca da Fundação Pio XII, Hospital de Câncer de Barretos, 2016.

VIEIRA, Tatiana R.; BARBOSA, Luiz C.; MALTHA, Célia R. A.; PAULA, Vanderlúcia F.; NASCIMENTO, Evandro A. Constituintes químicos from *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, São Paulo, 2004.

Vital Âtman. **Prensagem a frio**. Disponível em:  
<http://homolog.vitalatman.com.br/prensagem-a-frio#>. Acesso em: 28 nov. 2020.

WAINSTEIN, Alberto J. A.; BERLFORT, Francisco A. Conduta para o Melanoma Cutâneo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 31, n. 3, p. 204-214, 2004.

ZHAO, Yunqi; CHEN, Ran; WANG, Yun; QING, Chen; WANG, Wei; YANG, Yixin. *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy Studies of *Lavender angustifolia* Essential Oil and Its Active Constituents on the Proliferation of Human Prostate Cancer. **Integrative Cancer Therapies**, v. 16, n. 2, p. 215-226, 2016.