

SERGIO MESTIERI CHAMMAS

**Avaliação da atividade antitumoral da formulação lipossomal DODAC – 2AEH<sub>2</sub>F e do composto SC1640 um flavonóide obtido do extrato de *Baccharis dracunculifolia* em células de melanoma.**

São Paulo

2023

SERGIO MESTIERI CHAMMAS

**Avaliação da atividade antitumoral da formulação lipossomal DODAC – 2AEH<sub>2</sub>F e do composto SC1640 um flavonóide obtido do extrato de *Baccharis dracunculifolia* em células de melanoma**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:  
FMVZ-Departamento de Cirurgia -VCI

Área de concentração:  
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:  
Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo  
2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

Chammas, Sergio Mestieri

Avaliação da atividade antitumoral da formulação lipossomal DODAC - 2AEH2F e do composto SC1640 um flavonóide obtido do extrato de *Baccharis dracunculifolia* em células de melanoma / Sergio Mestieri Chammas ; orientador Durvanei Augusto Maria. - São Paulo, 2023.

278 f. : il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres - Departamento de Cirurgia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Melanoma. 2. Alecrim-do-campo. 3. Extrato. I. Título.



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

## Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 02 de agosto de 2023  
CEUAx N 3931020321  
(ID 002096)

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Durvanei Augusto Maria  
Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "Avaliação da atividade antitumoral da formulação lipossomal DODAC/2AEH2F e do composto SC1640 um flavonoide obtido do extrato de Baccharis dracunculifolia em células de melanoma."

### CERTIFICADO (Alteração do cadastro versão de 13/junho/2023)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 13/junho/2023) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Prezados membros da CEUA Solicitamos a modificação do título da tese para : Avaliação da atividade antitumoral da formulação lipossomal DODAC/2AEH2F e do composto SC1640 um flavonoide obtido do extrato de Baccharis dracunculifolia em células de melanoma. O motivo desta solicitação é divulgação das informações e o pedido de patenteamento que está em andamento no NIT-INOVA. Desde já agradeço Durvanei A Maria ".

Comentário da CEUA: Alteração de título aprovada atendendo solicitação do responsável. Projeto não envolve o uso de animais vertebrados vivos.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

São Paulo, 01 de fevereiro de 2021  
CEUax N 8524061120

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Durvanei Augusto Maria

Área: Biologia Molecular

Equipe envolvida: Sergio Mestieri Chammas - colaborador (universidade De São Paulo); Durvanei Augusto Maria (orientador)

Título do projeto: "Avaliação da atividade antitumoral da formulação lipossomal DODAC-2H2AF e do Artepelin C em células de melanoma murino B16F10".

**Parecer Consubstanciado da CEUA IB**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, na reunião de 18/11/2020, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan



Nancy Oguiura  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CHAMMAS, Sergio Mestieri

Título: Avaliação da atividade antitumoral da formulação lipossomal DODAC – 2AEH<sub>2</sub>F e do composto SC1640 um flavonóide obtido do extrato de *Baccharis dracunculifolia* em células de melanoma.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: 11/09/2023

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

Instituição: Instituto Butantan

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Kurt Buchegger Mena

Instituição: Universidad de La Frontera-Chile

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva

Instituição: Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Ana Cristina Jacobowsky

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT

Julgamento: Aprovado

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus pela minha vida, pela minha fé e inspiração, onde nos momentos de solidão, à Ele elevei meus pensamentos e preces, recebendo os influxos divinos de forma direta ou indireta, através de sonhos, pensamentos e situações que muitas vezes não entendemos o motivo, mas no fundo existe um propósito para nossa aprendizagem e evolução.

Aos meus avós e aos meus antepassados mais distantes que direta ou indiretamente proporcionaram minha existência.

Aos meus pais pela dedicação na minha formação, pelos ensinamentos e formação dos meus princípios.

À minha esposa que me deu todo o suporte para que este trabalho fosse contruído, e me aguentou nos momentos mais complexos dessa jornada e aos meus filhos, por ajudaram seja pela presença ou por auxílio técnico em processos de informática.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria pela oportunidade dada para que eu pudesse desenvolver este trabalho, pela dedicação e orientação recebida durante todas as etapas, pelas discussões construtivas que tivemos de forma a amadurecer e desenvolver um padrão de pensamento científico e por me colocar no rumo durante meus devaneios, sempre atento aos princípios éticos e morais.

À Dra. Ana Olívia pela dedicação na obtenção das frações oriundas do extrato bruto e pelas orientações sobre a melhor metodologia para chegarmos a uma análise da incorporação do extrato nos lipossomas. Também ao Rafael que auxiliou a Dra. Ana Olívia neste trabalho de fracionamento do extrato.

À Dra. Iolanda Midea Cuccovia e sua equipe do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, na dedicação para a síntese das formulações lipossomais.

À Rosa, pela amizade, pelas reflexões, sempre contribuindo com idéias, transmitindo entusiasmo e motivação, também sempre preocupada com as pessoas, através de uma postura altruísta, ajudando na evolução dos trabalhos como um todo.

À Rosely Cabet Alves, pela ajuda ímpar recebida sempre com entusiasmo e dedicação.

Ao Guilherme e Sr. Juliano, sempre contribuindo com o suporte do Laboratório para o bom andamento dos experimentos de todos.

Ao Daniel Rabelo que desde o início se mostrou dedicado a ajudar nas resoluções de problemas, pelas discussões técnicas que realizamos, das quais consegui elaborar processos e conceitos sobre características químicas dos compostos, além da grande/gigante ajuda na análise dos dados recebidos da Central Analítica, também é claro, da amizade e das nossas conversas sobre assuntos variados.

Aos amigos Laerty Cabral, Monique, Amanda, Ranya, Thalles, Juliana, Thaís, Manuela, Carla, Angelina, Guilherme, José Artur, Mercedes, Poliana, Júlio, Edson, pela amizade e pelas reflexões, nessa jornada da vida, sempre seremos alunos em busca da luz do conhecimento.

Ao amigo Roberto Nascimento que me deu a oportunidade de conhecer o Professor Durvanei, num determinado dia em que eu levava uma jararaca para a recepção de animais do Instituto Butantan, e encontrei o Roberto que me falou, “vamos lá ao laboratório do Prof. Durvanei, assim você o conhece e vê se ele tem interesse em te orientar no doutorado”, foi dessa forma que comecei com um projeto de leishmania, e acabei migrando no início de 2021 para o presentetema.

Ao Dr. Carlos Jared e Dra. Marta Antoniazzi pelo apoio e disponibilização do uso dos equipamentos de microscopia de transmissão e varredura e às amigas Beatriz e Simone do Laboratório de Biologia Celular pela dedicação na operacionalização desses equipamentos.

Álvaro e Lucas, espero ter contribuído de alguma forma na construção do conhecimento durante a atividade de Iniciação Científica de vocês.

Agradeço ao Prof. José Roberto Kfoury e à Dra. Maria Angélica Miglino por terem me recebido no programa, e pela dedicação de vocês na realização dos congressos semestrais, que nos engrandecem na nossa formação como alunos do programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZUSP.



Agradeço à Daura por ter me apoiado nas minhas dificuldades burocráticas no início da minha jornada no departamento, também ao Carlos, Regina e Renato sem esse trabalho de suporte das secretarias nada poderia ser feito.

Ao Dr. Chiafarelli que através de conversas cobertas pelo véu da subjetividade do tecido espaço e tempo, costurou-se uma realidade muito além do próprio tempo concretizando imagens no silêncio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher.

Cora Coralina

## RESUMO

CHAMMAS, S. M. Avaliação da atividade antitumoral da formulação lipossomal DODAC — 2AEH<sub>2</sub>F e do composto SC1640 um flavonóide obtido do extrato de *Baccharis dracunculifolia* em células de melanoma. 2023. 278 f. Tese (Doutorado em Ciências) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O melanoma é um tumor causado pelo crescimento descontrolado de melanócitos, cuja forma metastática está envolvida em um complexo sistema de sinalização celular. Esta característica infere certa quimioresistência, tornando o melanoma uma enfermidade de difícil cura, uma vez, que as terapias envolvidas para o tratamento, proporcionam baixa eficácia e variados efeitos colaterais. Investigações para encontrar alternativas aos tratamentos convencionais, sempre é de grande valia. O presente estudo avaliou os efeitos citotóxicos do extrato de *Baccharis dracunculifolia*, obtido pelo método supercrítico em câmara de CO<sub>2</sub> diretamente do vegetal Alecrim-do-Campo, sem a utilização de solventes e designado neste trabalho como SC-1640 ou ArC. O extrato assim obtido, foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas (CG-MS) com a finalidade de identificar as moléculas presentes. Através de ensaios *in vitro*, foram comparados os efeitos citotóxicos do flavonóide ArC, do composto monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F, com os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel, em células de melanoma humano SKmel-28, melanoma murino B16F10, e fibroblasto de origem humana FN1, e fibroblasto de origem murino L929. Foram avaliadas as formulações lipossomais com o carreador lipossomal DODAC com ArC, em três concentrações diferentes. Os ensaios de viabilidade celular demonstraram efeitos favoráveis aos compostos estudados entre o grupo controle e as células tumorais. Foram utilizados marcadores para verificação de possíveis vias apoptóticas, como Bax, Bad, uPA, BCL-2, Caspase 3, PCNA, TNF-DR<sub>4</sub>, Citocromo C, mTOR e p53. A análise *in silico* da interação medicamentosa foi realizada pela plataforma *SynergyFinder 2.0*. O flavonóide ArC gerou um valor de IC<sub>50</sub> para as células de melanoma humano SKmel-28 de 1,2 mM ao passo que os fibroblastos humanos FN1 sofreram alterações na concentração de 2,47 mM, subsequentemente, produzindo um efeito tóxico ao melanoma SKmel-28. As células de melanoma murino, B16F10, apresentaram valor de IC<sub>50</sub> de 1 mM, valor menor que o apresentado pelas células controle fibroblastos L929, que foi de 2,8 mM. Em ensaios com a formulação lipossomal do ArC os resultados foram potencializados pelos lipossomas carregados com o composto, demonstrando diferenças entre o DODAC vazio e o carregado com os compostos. As análises morfológicas corroboraram com os outros ensaios realizados, demonstrando alterações estruturais em organelas e nas membranas das células. Os compostos demonstraram-se favoráveis para a prospecção de novos tratamentos de melanoma, decorrente de sua citotoxicidade e por apresentarem potencial modulador das fases do ciclo celular, potencial elétrico mitocondrial, consequentemente produzindo efeitos antiproliferativos, significativos em células tumorais de melanoma humano e murino em comparação às células normais.

Palavras-chave: Apoptose; Citotoxicidade; Lipossoma; Melanócitos.

## ABSTRACT

CHAMMAS, S. M. Evaluation of the antitumor activity of the liposomal formulation DODAC — 2AEH2F and the compound SC1640 a flavonoid obtained from the extract of *Baccharis dracunculifolia* in melanoma cells. . 2023. 278 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Melanoma is a tumor caused by the uncontrolled growth of melanocytes, and the metastatic form is involved in a complex cell signaling system, inferring a certain chemoresistance, making it a difficult disease to cure and the therapies involved for the treatment, providing low efficacy, in addition to causing severe side effects. Investigations to find alternatives to treatments are always of great value. The present study evaluated the cytotoxic effects of the extract of *Baccharis dracunculifolia*, obtained by the supercritical method in a CO<sub>2</sub> chamber directly from the plant Alecrim-do-Campo, without the use of solvents, designated in this work as SC-1640 or ArC, the extract thus obtained, was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrophotometry (GC-MS) in order to identify the molecules present. Through *in vitro* assays, the cytotoxic effects of the flavonoid ArC, the monophosphoester compound 2AEH2F, with the chemotherapeutic drugs dacarbazine and paclitaxel, were compared in cells of human melanoma SKmel-28, of murine melanoma B16F10, and normal fibroblast of human origin FN1, and fibroblast of murine origin L929. Liposomal formulations with the DODAC carrier with ArC, at three different concentrations, were also evaluated. Cell viability assays showed favorable effects of the compounds studied between the control group and tumor cells. Markers were used to verify possible apoptotic pathways, such as Bax, Bad, uPA, BCL-2, Caspase 3, PCNA, TNF-DR4, Cytochrome C, mTOR and p53. The *in silico* analysis of the drug interaction was performed using the SynergyFinder 2.0 platform. The flavonoid ArC generated an IC<sub>50</sub> value for SKmel-28 human melanoma cells of 1.2 mM whereas for human FN1 fibroblasts, it underwent concentration changes of 2.47 mM, producing a more toxic effect on melanoma. SKmel-28. In a murine melanoma cell line, the B16F10 tumor cells had an IC<sub>50</sub> value of 1 mM, a value lower than that presented by the L929 fibroblast control cells, also murine, of 2.8 mM. In tests on the liposomal formulation of ArC, the results were enhanced by liposomes loaded with the compound, demonstrating differences between the empty DODAC and the one loaded with the compounds. The morphological analyses corroborated the other assays, demonstrating structural alterations in organelles and cell membranes. The compounds proved to be favorable for the prospect of new treatments for melanoma due to their cytotoxicity and because they have the potential to modulate the cell cycle, the mitochondrial electrical potential and, consequently produce significant antiproliferative effects in human and murine melanoma tumor cells compared to fibroblasts.

Keywords: Apoptosis; Cytotoxicity; Liposome; Melanocytes.

## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	ALECRIM-DO-CAMPO <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	17
2.2	MÉTODO SUPERCRÍTICO .....	19
2.3	LIPOSSOMAS .....	19
2.4	AMINOETIL DIIDROGÊNIO FOSFATO (2-AEH <sub>2</sub> F).....	21
2.5	DACARBAZINA.....	23
2.6	PACLITAXEL .....	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>24</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1	CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA .....	25
4.2	EXTRATO DE <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	25
4.2.1	CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	25
4.3	CONSERVAÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO .....	26
4.3.1	ANÁLISE DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA GASOSA .....	26
4.3.2	ESPECTROGRAFIA DE MASSAS.....	26
4.4	ESTUDO DAS FRAÇÕES.....	27
4.4.1	ANÁLISE DAS FRAÇÕES .....	27
4.4.2	RELEVÂNCIA DAS ANÁLISES.....	27
4.5	PREPARAÇÃO DO EXTRATO PARA UTILIZAÇÃO NOS EXPERIMENTOS .....	28
4.5.1	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ArC PARA OS TESTES DE VIABILIDADE CELULAR .....	29
4.6	PREPARAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO DA DACARBAZINA E PACLITAXEL .....	29
4.6.1	CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES MOLARES UTILIZADAS.....	30
4.7	PREPARAÇÃO DO CARREGADOR DODAC VAZIO E DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS .....	30
4.7.1	PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE DODAC/ArC.....	31
4.8	CULTURA CELULAR.....	31
4.8.1	CÉLULAS UTILIZADAS .....	32
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT.....	32
4.10	AVALIAÇÃO DO EFEITO FARMACOLÓGICO SINÉRGICO.....	33
4.10.1	ANÁLISE DA COMBINAÇÃO FARMACOLÓGICA ENTRE	

COMPOSTOS E MEDICAMENTOS .....	35
4.11 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS PEROXIDADOS POLISSATURADOS .....	35
4.12 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
4.13 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	36
4.14 MARCAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS COM FLUOROCROMO MitoRed PARA ANÁLISE EM MICROSCÓPIO CONFOCAL A LASER.....	37
4.15 ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	37
4.16 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	38
4.16.1 PROCESSAMENTO DAS IMAGENS PARA CONTAGEM DAS CÉLULAS .....	39
4.17 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	40
4.18 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	40
4.19 ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE LUZ .....	42
4.19.1 COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU .....	42
4.20 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	43
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
5.1 ALECRIM-DO-CAMPO <i>Baccharis dracunfolia</i> .....	44
5.1.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE <i>Baccharis dracunfolia</i> .....	44
5.1.2 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Baccharis dracunfolia</i> .....	44
5.2 CROMATOGRAFIA GASOSA PARA ANÁLISE DO EXTRATO .....	48
5.2.1 PARÂMETROS PARA AJUSTE DO EQUIPAMENTO.....	48
5.3 ANÁLISE DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA .....	51
5.3.1 PARÂMETROS PARA AJUSTE DO EQUIPAMENTO.....	51
5.4 ANÁLISE DAS FRAÇÕES .....	53
5.5 FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL .....	59
5.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS LIPOSSOMAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	66
5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT. ....	68

5.8	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DA MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ ) POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	88
5.9	ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	92
5.10	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO FARMACOLÓGICA ENTRE OS COMPOSTOS .....	98
5.11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS AVALIADA PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT .....	139
5.12	EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE MORTE CELULAR E PROLIFERAÇÃO NAS CÉLULAS TUMORAIS SKmel-28 e B16F10.....	157
5.13	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO MITOCONDRIAL COM O FLUOROCROMO MitoRed PARA ANÁLISE EM MICROSCÓPIO CONFOCAL A LASER.....	170
5.14	COLORAÇÃO PELO MÉTODO PAPANICOLAOU .....	175
5.15	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) CÉLULAS TUMORAIS B16 E SKmel-28 .....	180
5.16	AVALIAÇÃO DAS ULTRAESTRUTURAS DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO SKmel-28 POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	185
5.17	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	191
6	DISCUSSÃO.....	201
7	CONCLUSÕES.....	229
8	REFERÊNCIAS.....	230
9	APÊNDICES .....	246
9.1	APÊNDICE A .....	246
9.2	APÊNDICE B .....	266
9.3	APÊNDICE C.....	276
9.4	APÊNDICE D.....	277
10	ANEXO A .....	278

## 1. INTRODUÇÃO

A elucidação dos processos envolvidos na formação e tratamento dos variados tipos de câncer tem sido motivo de grande desafio para a ciência, motivando intensas pesquisas na tentativa de trazer à luz o entendimento científico e as bases dessas anomalias celulares. Nesse sentido, o trato da matéria evoluiu muito, de forma a melhorar e aumentar a eficácia das metodologias de prevenção e procedimentos terapêuticos, procurando sempre a melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Um fato a ser considerado é que as terapias de ponta, apresentam elevados custos e os tratamentos aprovados e utilizados nos centros de saúde ainda causam diversos efeitos colaterais (MAO, *et al.*, 2022).

A evolução dos estudos oncológicos, transitaram do campo da histologia para o campo da genética (BIRNER, PRAGER & STREUBEL, 2016), revelando a complexidade molecular da doença (SILVA, *et al.* 2019). Apesar dos avanços, a doença continua aumentando e segundo a American Cancer Society, somente para os melanomas, estimou-se que no ano de 2020 nos Estados Unidos 100.350 novos casos seriam diagnosticados .

Nesse contexto, o câncer de pele pode ser considerado um importante problema de saúde pública, e é classificado de duas formas distintas, os não melanomas e os melanomas. O câncer de pele não melanoma, compreende o carcinoma de células escamosas e o carcinoma basocelular. O câncer de pele melanoma de origem nos melanócitos, tem baixa representatividade estatisticamente nos diagnósticos, entre as diferentes formas da doença e tem a característica de crescer e se espalhar rapidamente (INCA, 2019; American Cancer Society, 2019; National Cancer Institute, 2019). A estimativa para o Brasil no triênio de 2020-2022, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), para o câncer de pele não melanoma, foi de 176.930 novos casos, para cada cem mil habitantes; para os cânceres do tipo melanoma, a estimativa foi de 4.200 homens e 4.250 mulheres acometidos para cada cem mil habitantes.

Apesar do melanoma representar em números, índices menores que os outros tipos de câncer, a forma metastática tem sido causa de preocupação das autoridades de saúde, por sua elevada letalidade (BATTIST, *et al* 2009).



Essa característica metastática, está envolvida em um complexo sistema de sinalização celular (PETERSEN, *et al.*, 2014), por outro lado, esse processo de sinalização, pode ser, e tem sido pesquisado como uma importante fonte de informações para o diagnóstico precoce do melanoma (SOSMAN and MARGOLIN, 2009) .

As duas terapias aprovadas pela Food and Drug Administration nos Estados Unidos, são, a aplicação de altas doses de Interleucina-2 (IL-2) e a dacarbazina. Estas duas terapias estão associadas a taxas de resposta de apenas 10 a 20% (FLAHERTY, *et al.* . 2010), proporcionando uma expectativa de vida em torno de 2 anos, entre 10 a 20% sobrevivem (ROBERT, *et al*, 2011) .

Além desses tratamentos proporcionarem baixa resposta, estão associadas a pesados efeitos colaterais, como a dacarbasina, que induz toxicidade do sistema respiratório e dispneia, a IL-2 está associada à síndrome de derrame induzido, sintomas de hipotensão e oligúria (CHELSEA Ma & ARMSTRONG, 2013).

A interleucina-2 é um produto biosintético originado da interleucina 2 humana, que exerce ampla atividade no sistema imunológico, ativando a imunidade celular e produzindo citocinas. Os pesados efeitos colaterais devem ser avaliados levando-se em conta a relação dos riscos e dos benefícios do tratamento. O mecanismo de ação da Dacarbazina, é adicionar um grupo radical alquil no DNA, inibindo sua replicação (BRACCI, 2014). Em decorrência dos efeitos colaterais resumidamente descritos acima, e das respostas efetivas dos tratamentos, alternativas aos quimioterápicos convencionais vem sendo pesquisadas.

Pesquisas com bioativos naturais, podem ser uma via alternativa para amenizar os problemas relativos aos tratamentos de várias doenças complexas, com efeitos favoráveis na terapêutica de doenças como o câncer (VALENTE, *et al*, 2011; MENDONÇA, *et al*, 2015; ABUTAHA, 2020; RIVERO-CRUZ, *et al*, 2020). Um exemplo é o uso medicinal do própolis, remonta mais de 300 anos Antes de Cristo (GHISALBERT, 1979), O conhecimento do uso de produtos provenientes das abelhas, está demonstrado em pinturas rupestres da idade das cavernas. No Egito antigo através da interpretação dos hieróglifos, observou-se que utilizavam produtos provenientes de abelhas criadas domesticamente (KUROPATNICKI, SZLISZKA, KROL, 2013; ZABAIUO, *et al.* 2017).

Mesmo se tratando de um composto natural amplamente utilizado, pode causar alguns efeitos colaterais, como alergias em profissionais que manipulam essas substâncias (MÜNSTEDT, 2009), e pode sofrer alterações em sua composição decorrente das mudanças sazonais (VALENCIA, *et al.*, 2012).

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

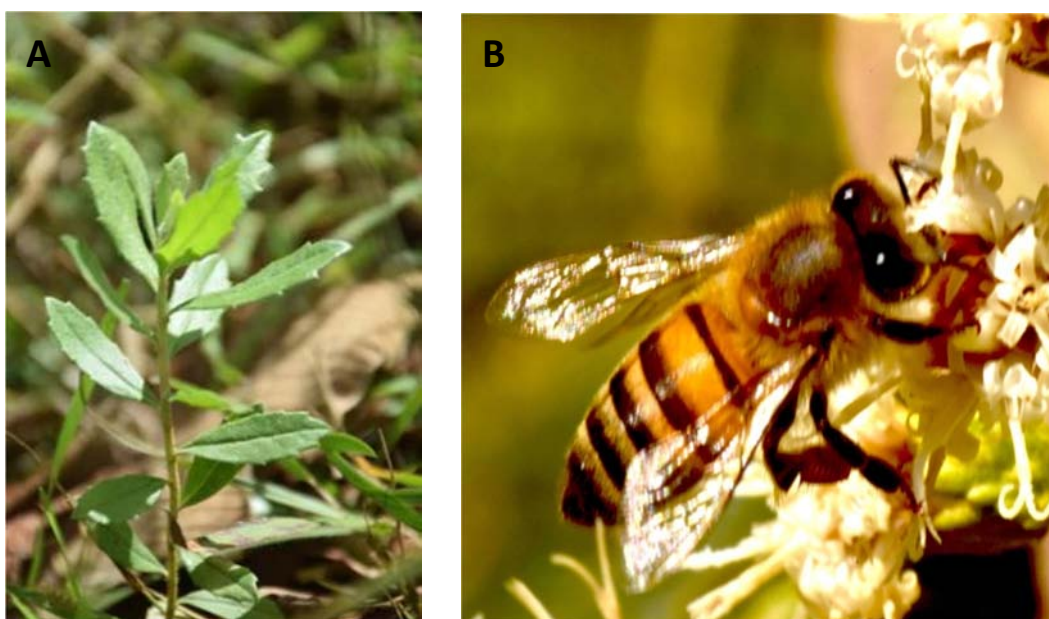
### 1.1. ALECRIM-DO-CAMPO *Baccharis dracunculifolia*

O gênero *Baccharis* compreende cerca de 340 espécies distribuídas nas américas, em países como Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México (VERDI, *et al.*, 2005). No Brasil a maioria das espécies é encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sendo a maioria dioicas com reprodução por sementes (HEIDEN, *et al.* 2012).

*Baccharis dracunculifolia*, é conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou vassourinha (Figura 1A), aparecendo principalmente em áreas de cerrado, campos abertos como pastos e bordas de floresta. É uma planta com características de um arbusto lenhoso, que pode atingir quatro metros de altura, sendo uma espécie perene, apresentando galhos bastante ramificados (SFORCIN, *et al.* 2012).

O alecrim-do-campo é considerado uma planta infestante de pastagens nativas quando não se aplica um manejo correto, sendo que o aumento demasiado é visto como uma infestação podendo levar à inutilização total da pastagem. As roçadas são ineficazes como procedimento para controle do alecrim-do-campo, uma vez que o corte desencadeia intensa rebrota, por outro lado, é uma excelente planta apícola e suas folhas são utilizadas na medicina caseira e na confecção de vassouras rústicas, de onde provém o nome “vassourinha” (LORENZI, *et al.*, 2008).

O Alecrim-do-Campo é um exemplo de planta medicinal, muito utilizada pela medicina popular, para tratamento ou suporte terapêutico em diversas doenças, agindo como anti-inflamatório, antisséptico em feridas da pele e no auxílio de doenças gástricas (SILVA FILHO, *et al.* 2008).



**Figura 1. A:** *Baccharis dracunculifolia*; **B:** Interação entre insetos e *Baccharis punctulata*.

Existe uma relação sistêmica entre o alecrim do campo e a entomofauna (Figura 1B), tanto para atrair insetos polinizadores quanto em proteção contra parasitas (BASTOS, *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2020). A produção de alguns compostos pela planta é alterada conforme a sazonalidade e alterações climáticas associadas (SOUSA, *et al.* 2011).

Essa interação do alecrim-do-campo com isetos apícolas, torna-o um dos principais vegetais fornecedores de compostos do própolis verde. Em 1993 Hajime Aga isolou compostos antimicrobianos do própolis verde, entre eles, o Artepelin C, 3,5-diprenyl- 4-hydroxycinnamic acid ( $C_{19}H_{24}O_3$ ) ou ácido fenólico, com atividades bactericidas (AGA, *et al.* 1993). O Artepelin C é um composto fenólico, derivado do ácido cumarínico prenilado ou p-ácido cumarínico, representando um dos princípios bioativos do própolis verde, sendo a principal fonte vegetal o alecrim-do-campo. Seu mecanismo de ação, anticancer inclui uma via apoptótica mediada pelo Artepelin C, através do estresse celular por vias extrínseca e intrínseca e a inibição do crescimento celular, por interrupção do ciclo mitótico (SHAHINOZZAMAN, *et al.* 2020).

As folhas do alecrim-do-campo possuem em sua epiderme tricomas, que produzem um material resinoso de composição variada, destacando-se os flavonóides e os ácidos fenólicos (BERNANDE *et al.*, 2022; SHAHINOZZAMAN *et al.*, 2020). O composto SC-1640, é um flavonóide e um dos principais componentes do vegetal alecrim-do-campo (CHAMMAS, *et al.* 2023). Possui atividades biológicas diversas, destacando-se como antioxidante e antitumoral (SPRONG, VAN DER e VAN MEER, 2001).

## 1.2. MÉTODO SUPERCRÍTICO

Existem poucos métodos para a extração de compostos ativos de origem vegetal, sendo um deles a extração por solventes etanólicos, ou pela utilização de fluídos dispersivos para formar microcápsulas. Também podem ser extraídos pela diluição em solução aquosa de etanol, ou pelo método supercrítico de extração em câmara de dióxido de carbono, sendo este, o processo que garante maior pureza, para aplicação em atividades terapêuticas com moléculas hidrofóbicas (LEE, *et al.* 2007).

A extração por meio do fluido supercrítico consiste em uma metodologia onde os solventes líquidos convencionais são substituídos por fluidos supercríticos. As vantagens oferecidas por esta técnica englobam principalmente a possibilidade de modulação contínua do poder de seletividade (REVERCHON and DE MARCO, 2006; PEREIRA and MEIRELES, 2010), garantindo uma extração direcionada para a obtenção de compostos de forma mais completa possível, sendo primordial para obtenção dos princípios ativos naturais (SONAGLIO, *et al.*, 2007), a um custo menor, e com baixa geração de resíduos (DEVEQUI-NUNES, *et al.* 2018).

## 2.3. LIPOSSOMAS

Muitos extratos vegetais possuem característica apolar, podendo ser dissolvidos em certos detergentes como o DMSO (SOUZA, *et al.* 2018), ou incorporadas a microvesículas lipossomais. Os lipossomas são vesículas microscópicas, compostas por uma bicamada lipídica, formada por fosfolipídios, semelhante à membrana celular, portanto, contendo uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica, característica que facilita a incorporação de moléculas com pouca solubilidade como os extratos apolares (TAO, *et al.*, 2014), incorporando-se nas regiões hidrofóbicas das microvesículas lipossomais, possibilitando a entrega aos sítios de interesse terapêutico (LUNA, *et al.* 2016).

Os lipossomas tem sido estudados como carreadores de fármacos “Drug Delivery” há muito tempo, nesse sentido, Alec Bangham em meados da década de 60 observou que os fosfolipídeos dispersos em solução aquosa tendiam a se estruturar em bicamadas, com a característica de se fecharem nas extremidades, essa observação permitiu o início do desenvolvimento dessas microvesículas, porém, um longo caminho ainda seria percorrido até os dias de hoje, convertendo-os de simples objetos de pesquisa biofísica em carreadores terapêuticos para numerosas aplicações clínicas (TORCHILIN, 2005).

A aplicação de compostos em terapias contra tumores, através da utilização de lipossomas, tem sido estudadas há muito tempo (SONG, *et al.* 2009). Aplicações de nanopartículas em tratamentos contra várias doenças, tem evoluído e demonstrado resultados no aumento da eficácia dos compostos carreados nessas microvesículas, como quimioterápicos no combate a certos tipos de câncer (HUANG, *et al.* 2020), nesse aspecto, formulações lipossomais, usadas como carreadores de moléculas terapêuticas, também demonstraram resultados satisfatórios e seletividade contra tumores (FERREIRA, *et al.* 2013; LUNA, *et al.* 2016).

Os lipossomas como vesículas multilamelares assumem formato esférico no processo da sua formulação, podendo ser formados de uma ou mais bicamadas lipídicas, obedecendo ao mesmo princípio das membranas celulares, contendo uma porção polar e uma região apolar entre as estruturas polares, conforme figura 2. As drogas carreadas, podem se ligar a superfície externa ou interna, ou ainda, no meio da bicamada (LIU, *et al.* 2020).

Os lipossomas podem ser classificados como vesículas multilamelares (diâmetro entre 0,1-15  $\mu\text{m}$ ), pequenas vesículas unilamelares (diâmetro de 25 a 50nm), ou vesículas grandes unilamelares (100nm a 1  $\mu\text{m}$ ). Nessa classificação, as vesículas podem ser gigantes unilamelares (de 1,0 a 200 $\mu\text{m}$  bem como multivesicular medindo de 1,6 a 10,5 $\mu\text{m}$  (GUANGYAN, *etal.* 2020).

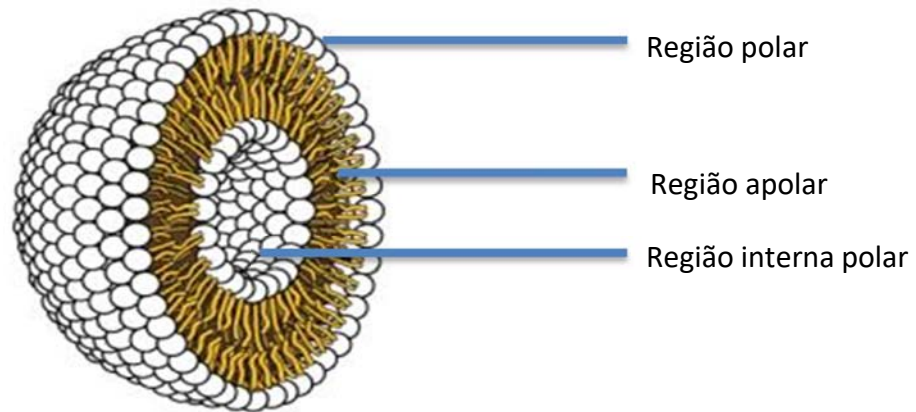


Figura 2: Lipossoma, demonstrando região polar externa, região apolar intermediária e a região interna lipossomal, revestida pela porção polar dos fosfolipídios. Fonte: *Open Stax Biology, original by Mariana Ruiz Villareal.*

A bicamada lipídica das membranas celulares de certa forma é reproduzida nessas microvesículas lipossomais, conferindo uma característica anfifílica, por possuírem propriedades polares e apolares na mesma estrutura. Nas ligações dos lipossomas, moléculas hidrofílicas, tendem a ser incorporadas na cavidade polar aquosa interna, enquanto que as hidrofóbicas seriam incorporadas na porção apolar da bicamada e as anfifílicas, ao longo de toda a sua extensão (BITOUNIS, *et al.* 2012; MATTHEOLABAKIS, *et al.* 2012; SLINGERLAND, *et al.* 2012; HUANG, *et al.* 2016; XING, *et al.* 2016; LUNA, *et al.* 2016).

#### 2.4. AMINOETIL DIIDROGÊNIO FOSFATO (2-AEH<sub>2</sub>F)

Os fosfolípeos são os lípeos mais abundantes na composição da membrana plasmática das células eucarióticas do reino animal, junto com outros elementos estruturais da membrana, como o colesterol e proteínas, formam uma bicamada lipídica. Essas moléculas estruturais possuem uma cabeça polar, constituída por grupos fosfato, portanto solúvel em água e caudas longas, formando estruturas semelhantes a caudas, sendo estas apolares. Constituem ass, estruturas insaturadas de ácidos graxos, nas quais, uma porção polar fica voltada para o citosol e a apolar para o meio extracelular .

Essa estrutura proporciona o transporte seletivo de solutos, assim, compostos hidrofóbicos lipossolúveis atravessam com certa facilidade a membrana e compostos hidrofílicos atravessam com maior dificuldade (YEAGLE, 1989). Neste caso, proteínas transmembrana atuam através de um complexo mecanismo molecular, como transportadoras ativas de certos compostos específicos (SCHNELL, & HEBERT, 2003).

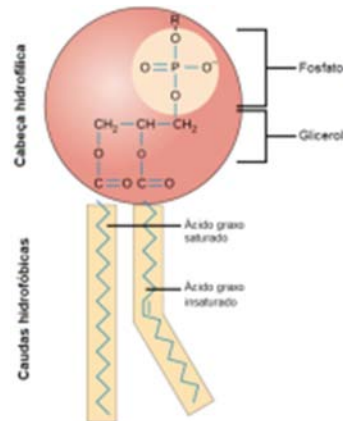


Figura 3: Fosfolipídio estrutural de membrana. Imagem adaptada de *Open Stax Biology*.

Um importante precursor da biossíntese de fosfolipídios da membrana celular, a fosfoetanolamina, bem como a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, participam das principais vias de sinalização, induzindo receptores de membrana, através da geração de receptores secundários. O monofosfoéster sintético 2 aminoetil dihidrogênio fosfato (2-AEH<sub>2</sub>F) figura 4, age na renovação de vários fosfolipídeos da membrana celular, mais especificamente na fosfatidilcolina, (FERREIRA, *et al.*, 2013) que faz parte dos principais fosfoglicerídeos das membranas das células de mamíferos.

O 2- AEH<sub>2</sub>F tem se tornado importante elemento no tratamento de várias doenças, como o câncer, sendo a miltefosina (KHADEM VATAN, *et al.*, 2011) e os alquil fosfolipídios, exemplos dessa classe de fármacos. Nesse sentido, existem vários trabalhos sobre a ação do 2-AEH<sub>2</sub>F sintético sobre uma grande variedade de linhagens de células de tumores sólidos (LUNA, *et al.*, 2018; CONCEIÇÃO, *et al.*, 2019; CABRAL, *et al.*, 2022).



Figura 4: Fórmula estrutural do 2-AEH<sub>2</sub>F. Imagem obtida através de análise e processamento do programa *Molinspiration*.

## 2.5. Dacarbazina

A dacarbazina (imidazol carboxamida) é um quimioterápico utilizado para o tratamento de melanoma cutâneo metastático. O Ministério da Saúde, através da Portaria n° 357, de 8 de abril de 2013 aprovou entre outras coisas, as diretrizes terapêuticas para tratamento do melanoma cutâneo maligno com a Dacarbazina. Portanto, este medicamento é considerado o tratamento de referência para pacientes acometidos por essa doença que adentram no Sistema Único de Saúde (SUS).

É comercializada com o nome de Fauldacar<sup>®</sup> (Libbs) e conforme informações da bula, o mecanismo de ação exato da dacarbazina é desconhecido, mas existem hipóteses prováveis. Uma delas é que este medicamento aja como agente alquilante, destruindo as células ao adicionar um grupo alquil (C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>) ao DNA, outra hipótese, é que possui uma ação inibitória da síntese de DNA por agir como um análogo de purina. Pacientes tratados com dacarbazina, sofrem pesados efeitos colaterais como anorexia, náusea e vômito, alguns, podem apresentar mialgias e mal-estar. A ação da dacarbazina produz interferência não só em células cancerígenas, mas também em células normais, obtendo-se uma taxa de resposta objetiva de 20% (BOUCHEREAU, *et al.* 2021)

## 2.6. Paclitaxel

O paclitaxel tem origem botânica, extraído da casca de uma árvore conífera da família das Taxáceas originária do Hemisfério Norte, *Taxus brevifolia*. É um quimioterápico de primeira linha com atividades citotóxicas e antineoplásicas.



O mecanismo de ação nas células ocorre através da atuação do paclitaxel nas tubulinas impedindo a desmontagem dos microtúbulos e resultando no impedimento da divisão celular.

Em combinação com um composto de platina, é utilizado para o tratamento do carcinoma avançado de ovário. Também é indicado no tratamento adjuvante do câncer de mama linfonodopositivo, administrado em sequência a uma terapia padrão apropriada (DECARTIS, et al. 2004; TIAN, et al. 2021).

### 3. OBJETIVO

Avaliar os efeitos antitumorais citotóxicos seletivos do extrato de *Baccharis dracunculifolia* (Alecrim-do-Campo), em formulação farmacêutica, obtido pelo método supercrítico, em câmara de dióxido de carbono, denominado neste estudo de SC-1640 ou ArC e efetivar a incorporação desse extrato aos lipossomas DODAC, comparando como o fosfolipídico 2-AEH<sub>2</sub>F, e os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel, em células de melanoma murino e humanas.

#### 3.1. Objetivos específicos

Os experimentos foram estruturados com o intuito de avaliar os resultados nos grupos tratados com o SC-1640 a partir de uma solução estoque e com o 2-AEH<sub>2</sub>F e as formulações lipossomais DODAC vazio; DODAC/ArC; DODAC/2-AEH<sub>2</sub>F comparando-os com o grupo controle, esperando-se a obtenção de valores de dose resposta e verificação de possíveis viabilidades terapêuticas dos compostos, através dos seguintes ensaios laboratoriais:

- Avaliar a composição do extrato SC-1640 por CG/MS
- Determinar a atividade citotóxica (IC<sub>50</sub>%) pelo ensaio colorimétrico MTT;
- Determinar a formação dos produtos da peroxidação de lipídios polissaturados;
- Analisar as fases do ciclo celular por citometria de fluxo;
- Analisar as alterações morfológicas das mitocôndrias por microscopia confocal a laser com marcação pelo fluorocromo MitoRed;
- Analisar o potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo;
- Analisar a expressão dos marcadores de controle e progressão do ciclo celular, por citometria de fluxo;
- Ensaio de migração celular;
- Analisar a morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Analisar a morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Analisar a morfologia por microscopia de luz;
- Análises estatísticas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Conselho de Ética em Pesquisa

A metodologia do presente trabalho foi submetida e aprovada nos conselhos de ética em pesquisa do Instituto Butantan e da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo do departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres como segue:

Instituto Butantan em 01 de fevereiro de 2021 - CEUAx N 8524061120

FMVZ-USP em 21 de março de de 2021 - CEUAx N 3931020321

### 4.2. Extrato de *Baccharis dracunculifolia*

Foram coletadas amostras de *Baccharis dracunculifolia* alecrim-do-campo, predominantemente das folhas frescas, em 01 de março de 2020, proveniente do município São Sebastião da Gramma, inserido no bioma Mata Atlântica, na região hidrográfica do Rio Paraná.

As amostras foram submetidas ao processo de extração pelo método supercrítico em câmara de CO<sub>2</sub>. Antes do processo de extração pelo método supercrítico, as amostras em sua forma bruta, foram congeladas entre -20 °C e -8° C, para a obtenção de estabilidade física. O material ainda congelado, foi triturado em processador. Após a trituração, o material fragmentado passou pelo equipamento de extração, induzindo no material variações nos parâmetros de pressão e temperatura em atmosfera de CO<sub>2</sub> obtendo-se uma massa bruta do extrato. Esse procedimento foi realizado pela empresa BioativosGroup<sup>®</sup>, detentora do processo de patente.

**BioativosGroup<sup>®</sup>** Empresa fornecedora do extrato, situada na Rua José Roberto de Camargo Toledo, 563 - Galpão 03 - Chácaras São Luís, Santana de Parnaíba - SP, 06504-150.

#### 4.2.1 Caracterização e identificação de *Baccharis dracunculifolia*

A caracterização da espécie *Baccharis dracunculifolia*, foi feita para efeitos de obtenção de imagens macroscópicas e microscópicas.

A identificação do vegetal foi realizada com o auxílio do Prof. Dr. José Rubens Pirani, Curador do Herbário SPF do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo. Após a confirmação da espécie,

um ramo contendo folhas foi coletado nos arredores do prédio do ICB-I, USP. As imagens macroscópicas foram feitas com câmara reflex e lente macro. Para microscopia de luz, foram examinadas as folhas *in natura*, obtendo-se as imagens diretamente do microscópio. Para a microscopia eletrônica de varredura, duas folhas foram retiradas do ramo, lavadas em série etanólica e secas no sistema ponto crítico. Posteriormente foram levadas ao processo de deposição metálica *Sputtering*, e levadas ao microscópio de varredura.

### **4.3. Conservação e análise do extrato**

A amostra foi recebida em frasco de vidro, com conteúdo pesando em torno de 5g, possuindo uma característica pastosa de cor amarelada com uma tonalidade mais próxima do âmbar, com odor semelhante à uma mistura de própolis com um fundo herbáceo. A amostra foi armazenada em temperatura de -20 °C ao abrigo da luz através do envolvimento do frasco em papel alumínio.

#### **4.3.1. Análise do extrato por Cromatografia Gasosa**

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), é uma técnica analítica que combina a separação de compostos orgânicos, com identificação através da biblioteca virtual NIST14 acoplada *in tandem* ao equipamento. A CGMs fornece por meio de associações baseadas em algoritmos, as possíveis nomenclaturas dos compostos, bem como, as fórmulas e os pesos moleculares relacionados. A partir desses dados, foram realizadas pesquisas na plataforma PubChem mantida pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), com a finalidade de obter-se o número CID e as estruturas químicas em 2D, para a comparação com os resultados obtidos na análise por GC-MS. As nomenclaturas foram mantidas na língua inglesa, com o objetivo de proceder uma rastreabilidade caso necessário, facilitando consultas posteriores, tendo como suporte o número CID.

#### **4.3.2. Espectrometria de massas**

Espectrometria de massas (EM) foi empregada nesta etapa, por ser muito utilizada em estudos e identificações de proteínas e análise de misturas complexas, por meio da relação massa/carga ( $m/z$ ) de íons formados a partir das moléculas ionizadas, por meio de ionização por *eletrospray*, produzindo um espectro de massas, determinando assim, as massas dos compostos contidos no

extrato, que já haviam sido analisados por cromatografia gasosa. Essa análise foi realizada no Instituto de Química da USP, na Central Analítica.

#### **4.4. Estudo das frações**

Uma amostra do extrato do alecrim-do-campo (ArC) pesando 60 mg foi submetida ao método HPLC para separação de frações referentes aos picos mais relevantes, obtendo-se nesse processo oito frações. Essas oito frações separadas, foram aplicadas em células para avaliar o valor de IC50, nas linhagens de origem murino, portanto, foram selecionadas para este ensaio, fibroblastos murino L929 e células de melanoma murino B16F10.

##### **4.4.1. Análise das frações**

Outra amostra de 60 mg do extrato ArC foi separada e enviada para o Laboratório de Desenvolvimento e Inovação, do Centro de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Butantan/SP sob coordenação da Dra. Ana Olímpia de Souza, para separação por HPLC de frações isoladas do extrato, resultando em oito frações.

Essas frações foram separadas nos mesmos parâmetros descrito no item 4.4., com o objetivo de obtê-las novamente, porém, somente para análise no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Esta análise, foi realizada por cromatografia gasosa, CG-MS nos mesmos parâmetros utilizados para análise do extrato, conforme descrito no item 4.3.1.

##### **4.4.2 Relevância das análises**

Foram levados em consideração os maiores picos, e em determinados casos, o índice de similaridade (SI), teve relevância, conforme descrições no decorrer da explanação sobre as análises e resultados. Na análise do extrato foi levada em consideração a altura dos picos, identificação pela biblioteca NIST-14 e valores de SI. Conforme os casos, nas análises das frações, as alturas dos picos e a identificação dos compostos pela biblioteca NIST-14 foram mais relevantes que os valores de SI, porém estes também foram registrados, para efeito de referência.

#### 4.5. Preparação do extrato para utilização nos experimentos

A massa do extrato apresentou característica apolar, então, o processo de preparação consiste em adequar a amostra extraída pelo supercrítico para utilização nos experimentos com as células em meio aquoso.

Em tubo de vidro Pirex, foi colocada a massa 60 mg da pasta do extrato pesada em balança de precisão. Com a ajuda de uma espátula fina, a massa foi introduzida no fundo do tubo, sem que raspasse nas paredes superiores, de forma que o conteúdo permanecesse exatamente no fundo do tubo, para que todo o conteúdo pesado fosse dissolvido nas etapas abaixo descritas.

O tubo com a massa pesada, foi levado ao aparelho de ultrasson, onde foi mergulhado de forma adequada em suporte específico. Nessa situação, foi adicionado 400  $\mu$ l de etanol absoluto PA. Girando o tubo manualmente dentro da água do ultrasson até que a massa se mostrou total e visivelmente dissolvida, demorando este processo em torno de 15 minutos.

Com a massa dissolvida no etanol e o tubo ainda dentro do ultrasson, com o auxílio de uma pipeta P200, adicionou-se, 200  $\mu$ l de água *MiliQ*, colocando-se uma gota e esperando a dissolução dessa gota na solução etanólica. Após a dissolução da primeira gota, colocou-se a segunda aguardando a dissolução da mesma forma. Esse procedimento levou 20 minutos para completar a colocação dos primeiros 200 $\mu$ l. Esse procedimento foi repetido por quinze vezes de 15 minutos cada, sendo que, após a décima vês, o volume foi aumentado para 500  $\mu$ l com a utilização de uma pipeta P1000. Após este período, a água *MiliQ* foi colocada sem critério específico (por já estar mais aquosa nesta etapa), até completar 20ml, então, a solução hidroalcoólica ficou à 2% e na proporção extrato/solvente de 3mg/ml, denominada para efeitos do presente trabalho de solução estoque. Todo esse procedimento foi realizado em temperatura ambiente.

Após esse procedimento, a solução foi filtrada em filtro seringa de 0,22 $\mu$ m em ambiente estéril e posteriormente, armazenada em geladeira e ao abrigo da luz.

#### **4.5.1 Concentração da solução de ArC para os testes de viabilidade celular**

Pesquisa com o extrato ArC é uma inovação, portanto, não se encontra na literatura científica, referências ao composto ou concentração a ser utilizada nos tratamentos das células. Assim, a solução descrita no item 4.5, foi aplicada em uma placa de 96 poços com células tumorais B16F10 na concentração de  $1 \times 10^5$  células por ml. Foram realizadas 20 diluições da solução estoque, com concentração inicial em 14mg/ml. A coluna 1 da placa foi mantida vazia para ajuste do leitor de Elisa, a coluna 2 ficou como controle, o tratamento iniciou-se na coluna 3 nas fileiras A, B, C e D até a coluna 12, perfazendo dez diluições, continuando na coluna 3 nas fileiras E, F, G e H, completando 20 diluições ao todo. Foi aplicada a metodologia MTT descrita no item 4.9 para avaliação da citotoxicidade e a placa foi lida em leitor de Elisa no comprimento de onda de 540nm. Dessa forma, chegamos a uma concentração para aplicação inicial nos tratamentos de 3 mg por ml.

#### **4.6. Preparação dos quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel**

A dacarbazina foi adquirida no mercado farmacêutico, sob a nomenclatura Fauldacar<sup>®</sup> na forma em pó de coloração branca estéril, acondicionado em um frasco âmbar com peso molecular de 182,18 g/mol, fechado com tampa de elastômero própria para a introdução de agulha de seringa.

Assim, foi introduzida uma agulha acoplada a uma seringa de 20 ml contendo 19,7 ml de água Mili-Q com a finalidade de reconstituir e solubilizar o conteúdo em pó, obtendo-se um volume final de 20 ml. Após este procedimento, o conteúdo foi extraído utilizando-se uma seringa, e distribuído em 20 frascos com tampa de rosca no volume de um ml cada um, sendo embalados um a um com papel alumínio para proteção da luz. Os frascos foram armazenados em uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , como solução estoque a 55 mM. Para uso nos experimentos, o conteúdo do frasco a ser utilizado foi diluído na concentração de 13,75 mM.

O quimioterápico paclitaxel foi adquirido no mercado farmacêutico solubilizado na concentração de 84  $\mu\text{M}$ .

#### 4.6.1 Cálculo das concentrações molares utilizadas

As soluções dos fármacos utilizadas foram armazenadas em solução denominadas de soluções estoques diluídas conforme características de cada composto.

Para cálculo da massa molar dos compostos com a finalidade da aplicação nos tratamentos celulares, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$mM = \frac{m}{mM \times V}$$

As soluções para uso calculadas conforme acima descritas, foram diluídas para aplicação nos ensaios utilizando-se a fórmula para cálculo da concentração por volume como segue abaixo:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Os compostos diluídos dessa forma, foram aplicados aos tratamentos.

#### 4.7. Preparação do carreador DODAC vazio e das formulações lipossomais

O cloreto dioctadecildimetilamônio (DODAC) Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos, foi pesado em balança de precisão em 0,1173 gramas para 20 ml de água MiliQ, para perfazer uma concentração final de 10 mM, outras concentrações estão referenciadas no Apêndice D.

A amostra pesada resuspendida em 10ml de água MiliQ, posteriormente foi homogeneizada em vórtex e depois por ultrassom, posteriormente foi mantida em banho por 20 minutos à 45 °C. Após este procedimento, à solução foi adicionado 10 ml de água MiliQ faltantes para perfazer o volume final de 20 ml.

Essa solução final foi colocada em tubo de vidro e levada ao sonicador com ponta de titânio na tensão de  $\cong 70$  mV . Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas para a retirada das partículas de titânio provenientes da ponta do sonicador, e esterilizadas por filtração utilizando-se um filtro de seringa 0,22  $\mu$ m.

#### 4.7.1 Preparação dos lipossomas de DODAC/ArC

O ArC e o DODAC (Sigma-Aldrich Cód.40167) foram dissolvidos em diclorometano, solvente pouco polar, na proporção de 120 mg de DODAC e 12 mg de ArC, para a obtenção da concentração 10 mM de DODAC e 2 mM de ArC, para um volume final de 20 ml, outras concentrações estão referenciadas no Apêndice D. Esse procedimento foi realizado em tubo de vidro, pois o solvente reage com tubos plásticos. Dessa forma, sítios de ligação entre o extrato ArC pouco polar e o DODAC, são formados como preparação para as etapas seguintes.

Essa solução DODAC/ArC foi seca em Argônio evaporando o solvente por completo. O material seco foi resuspendido em 10 ml de água MilliQ.

A solução com as dispersões de DODAC/ArC foi colocada em banho maria a 45°C por 20 minutos. Após este processo, as amostras foram agitadas no vortex até a completa homogeneização e em seguida sonicadas utilizando um ultrasonicador com ponta de titânio. Experimentos anteriores, mostraram resultados favoráveis em um equipamento Braun Sonic 1510, utilizando um recipiente cilíndrico de vidro de 15 mL com 2,5 cm de diâmetro. A tensão selecionada de  $\cong 70$  mV, por 3 a 4 minutos, foi adequada para essa fase. Durante a sonicação as amostras foram mantidas em temperatura aproximada de 60°C. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas para a retirada de partículas de titânio provenientes da ponta do sonicador, e esterilizadas por filtração utilizando-se um filtro de seringa 0,22  $\mu$ m.

O mesmo procedimento foi utilizado para a dispersão de DODAC , 2AEH<sub>2</sub>F e ArC.

#### 4.8. Cultura celular

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co.) suplementado com 24 mM de bicarbonato de sódio, 0.01% de antibióticos e 10% de soro fetal bovino (Cultilab). Foram acondicionadas em frascos de cultura celular e mantidas em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, a uma temperatura de 37°C. As culturas foram mantidas até atingir confluência em uma única camada aderida ao fundo do frasco.

Para os ensaios de MTT descrito em 4.9, as células foram soltas com a utilização de tripsina, e durante o procedimento de contagem, foram avaliadas quanto a sua viabilidade, pelo método de exclusão de Azul de Tripán.



Células de melanoma murino B16F10; fibroblastos murino normais L929; células de melanoma humano SKmel-28, foram adquiridos de American Type Culture Collection (ATCC® CRL 6475), e as células de fibroblastos humanos, FN1 foram obtidas por procedimento realizado por Prof.Dr. Durvanei Augusto Maria, conforme descrito em 3.9.1. Estas linhagens fazem parte do banco de células do Laboratório de Desenvolvimento e Inovações do Instituto Butantan. As células serão utilizadas para a avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo e demais ensaios descritos no decorrer deste estudo.

#### 4.8.1. Células utilizadas

Quadro 1: Informações sobre as células utilizadas neste estudo

<p><b>FN1</b> Fibroblastos normais obtidos através de procedimento realizado pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria provenientes de blefaroplastia de pálpebra . Espécie : Humana Características: Aderente Morfologia : Fibroblastos Meio de cultura : RPMI 1640 + 10% Soro Fetal Bovino Acondicionamento: Estufa 37°C + 5% de CO<sub>2</sub></p>	<p><b>L929</b> Fornecedor: ATCC Espécie : Murino <b>Tecido : Tecido conectivo subcutâneo, Adiposo</b> Características: Aderente Morfologia : Fibroblastos Meio de cultura : RPMI 1640 + 10% Soro Fetal Bovino Acondicionamento: Estufa 37°C + 5% de CO<sub>2</sub></p>
<p><b>SK-MEL-28</b> Fornecedor: ATCC Espécie : <i>Homo sapiens</i>, Tipo celular: melanócito <b>Tecido : Pele</b> Características: Aderente Morfologia : Poligonal Doença: Melanoma maligno Meio de cultura : RPMI 1640 + 10% Soro Fetal Bovino Acondicionamento: Estufa 37°C + 5% de CO<sub>2</sub></p>	<p><b>B16F10</b> Fornecedor: ATCC Espécie : murino Tipo celular: melanócito <b>Tecido : Pele</b> Características: Aderente Morfologia : mistura de células fusiformes e epiteliais Doença: Melanoma maligno Meio de cultura : RPMI 1640 + 10% Soro Fetal Bovino Acondicionamento: Estufa 37°C + 5% de CO<sub>2</sub></p>

#### 4.9. Avaliação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT

Alíquotas de células obtidas da cultura celular foram distribuídas e cultivadas em placa de 96 orifícios na proporção de  $1 \times 10^5$  por poço. Após 24 horas de cultivo em estufa a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, onde espera-se de 70 a 80 % de confluência e adesão, foram tratadas com os compostos DODAC vazio, DODAC/ArC, DODAC/ArC/2-AEH<sub>2</sub>F, ArC sem a formulação lipossomal,

dacarbazina e paclitaxel. A coluna 1 das placas, foi deixada em branco para ajuste do leitor de ELISA, na coluna dois, ficou definido como controle sem tratamento, e na coluna 3, colocou-se a concentração inicial, para posterior diluição seriada. As concentrações iniciais dos compostos foram: ArC 10 mM ou de 3mg/ml; 2-AEH<sub>2</sub>F 100mM; dacarbazina 13,75 mM; paclitaxel 84µM. Essas concentrações foram definidas em ensaios anteriores, realizados por nosso grupo. A definição da concentração de ArC, foi realizada conforme descrito no item 4.6.1. Para os lipossomas, foi utilizada a concentração do carreador, no caso DODAC 10 Mm.

Para os ensaios com lipossomas, foi utilizado o tempo de 24 horas para os tratamentos, visto que as células, neste período, desprenderam-se do fundo das placas.

Para os demais compostos, foram utilizados os tempos de 24, 48 e 72 horas. Após decorrido os tempos de tratamento, foi adicionado 5 mg/ml de MTT. Após 3 horas em estufa a 36°C no escuro, o meio de cultura contendo a solução de MTT foi descartada e os cristais de formazan foram solubilizados com a adição de metanol. Após este procedimento, a placa foi analisada em equipamento apropriado com um comprimento de onda de 540 nm.

A citotoxicidade foi expressa em IC<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50% do crescimento celular) determinando uma curva dose-resposta em função da concentração.

Em conjunto à esse procedimento, foram observados os aspectos morfológicos de lise e a formação de *debris* celular no sobrenadante. Posteriormente foram fotodocumentados, em microscópio invertido.

#### **4.10. Avaliação do efeito farmacológico sinérgico**

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de MTT onde foram determinados os valores de dose resposta para inibição de 50% da população celular, foram elaboradas duas placas de 96 poços para avaliação da interação entre os fármacos/compostos para cada tipo celular FN1; L929; SKmel28 e B16F10.

As placas foram confeccionadas com a concentração de  $1 \times 10^5$  células por ml, e distribuídas em um volume de 100µl por poço utilizando-se o meio RPMI descrito acima, e mantidas em estufa em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% em temperatura

de 37°C. Após 24 horas, verificou-se a adesão, confluência e morfologia das células, constatando a viabilidade das células, procedeu-se o ensaio.

O ensaio foi previamente elaborado calculando-se o volume a ser utilizado nas placas levando-se em consideração a relação concentração x volume. Uma fileira de cada uma das placas foi mantida com o meio de cultura RPMI como controle negativo, os poços subsequentes tiveram o meio de cultura retirado em sua totalidade e posteriormente, foi colocado 50µl de meio de cultura com o fármaco/composto na concentração do IC50 previamente obtido, denominado aqui de tratamento fixo na coluna “Fixo valor do IC50” da tabela 1. Os outros 50 µl, foram colocados diluindo-se o fármaco/composto nas concentrações descritas na coluna “Diluições em mM” colocados ponto a ponto nos poços e designados na coluna “Composto diluído”. Esses tratamentos estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Placa 1

Fixo valor da IC50	Diluições em mM	Composto diluído
ArC	13,75 - 6,87 - 3,44 - 1,719 - 0,859 - 0,430 - 0,215	Dacarbazina
Dacarbazina	10 - 5 - 2,5 - 1,125 - 0,562 - 0,281 - 0,141	ArC
ArC	200 - 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125	2AEH <sub>2</sub> F
2AEH <sub>2</sub> F	10 - 5 - 2,5 - 1,125 - 0,562 - 0,281 - 0,141	ArC

Tabela 1: Distribuição dos tratamentos relativos aos compostos com concentração fixa e variada.

Placa 2

Fixo valor da IC50	Diluições em mM	Composto diluído
Dacarbazina	200 - 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125	2AEH <sub>2</sub> F
2AEH <sub>2</sub> F	13,75 - 6,87 - 3,44 - 1,719 - 0,859 - 0,430 - 0,215	Dacarbazina
Paclitaxel	10 - 5 - 2,5 - 1,125 - 0,562 - 0,281 - 0,141	ArC
ArC	0,084 - 0,042 - 0,021 - 0,0105 - 0,00262 - 0,00131 - 0,00065	Paclitaxel

Tabela 2: Distribuição dos tratamentos relativos aos compostos com concentração fixa e variada.

Após 24 horas de tratamento, para avaliar e quantificar a viabilidade celular, foi aplicado o teste colorimétrico MTT. Após 3 horas em estufa à 37°C, as placas foram lidas em leitor de ELISA. Os resultados das leituras foram avaliados no programa *GraphPad Prism 5*. Os resultados foram submetidos à análise *in silico*, pela plataforma *SynergyFinder* (versão 2.0) para a análise interativa, visualização de dados, e perfil de combinação de drogas.

#### 4.10.1. Análise da combinação farmacológica entre compostos e medicamentos

Foi realizada a avaliação das relações concentração-efeito em sistemas biológicos, derivada do princípio fundamental da lei da ação em massa. Essa análise foi obtida pela equação de Índice de Combinação (CI) e Equação de Índice de Redução de Dose Resposta (DRI) pelo programa “Compusyn”, sendo:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} \quad (DRI)_n = \frac{(D_x)_n}{(D)_n}$$

Onde  $CI < 1$ ,  $= 1$  e  $> 1$  indicando possível efeito farmacológico sinérgico, aditivo ou antagônico.

O efeito da análise combinatória está descrito na tabela de pontuação farmacológica (Tabela 3).

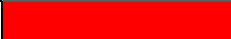










Índice Combinatório (IC)	Pontuação de Sinergia	Descrição	
<0,1	>30	Sinergismo muito forte	
0,1-0,3	20-30	Sinergismo forte	
0,3-0,7	10-20	Sinergismo	
0,7-0,85	5-10	Sinergismo moderado	
0,85-0,90	2-5	Sinergismo fraco	
0,90-1,10	(-2)-2	Efeito aditivo	
1,10-1,20	(-5)-(-2)	Antagonismo fraco	
1,20-1,45	(-10)-(-5)	Antagonismo moderado	
1,45-3,3	(-20)-(-10)	Antagonismo	
3,3-10	(-30)-(-20)	Antagonismo forte	
>10	<(-30)	Antagonismo muito forte	

Tabela 3: Demonstra a relação entre o valor do Índice Combinatório e Pontuação de Sinergia e a descrição com as cores representativas dos gráficos.

#### 4.11. Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados

A quantificação da peroxidação de lipídeos é baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), predominantemente o malondialdeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Os sobrenadantes das culturas celulares utilizadas para a metodologia

do MTT foram recolhidos antes do teste de citotoxicidade MTT e mantidos congelados em  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para a realização do ensaio, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente.

Utilizando-se microtubos, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra e 250  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético - TCA 20% (Sigma-Aldrich) e em outro, adicionados 250  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico – TBA 0,86% (Sigma-Aldrich, Cat.: T550-0). Os microtubos foram previamente identificados e colocados em banho- maria a  $100^{\circ}\text{C}$  por 20 min, seguido de resfriamento a  $0^{\circ}\text{C}$  por 20 min, centrifugação a 8000 rpm por 4 min e o sobrenadante utilizado para a quantificação das TBARS. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm. O Cálculo dos resultados foi feito no programa *GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*.

#### **4.12. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo**

As células tumorais e normais foram submetidas ao tratamento com DODAC vazio, formulação DODAC/ArC e ArC isolado, por um período de 24 horas. Após esse período, as células tratadas e dos grupos controles foram tripsinizados e centrifugados a 1400 rpm por 10 min. Em seguida, o “pellet” foi recolocado em suspensão em solução de álcool 70<sup>o</sup> e álcool RNase e armazenado no freezer -  $20^{\circ}\text{C}$  por 24 h. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão Fac’s, 20  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), foram mantidas por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período as amostras foram transferidas para tubos de citometria e levadas para análise em citômetro de fluxo FACS calibur (BD) na intensidade de fluorescência FL2H. Os histogramas adquiridos pelo programa Cell-Quest - BD foram analisados no programa ModFit.

#### **4.13. Avaliação da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo**

Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das suspensões de células tumorais B16F10 e SKmel- 28 previamente cultivadas em placas de 24 poços, foram separados os grupos tratados e controle, e foram incubadas por 12 h a  $27^{\circ}\text{C}$ , com os marcadores específicos envolvidos nas vias de morte celular e proliferação, como, BAX, BAD,

uPA, BCL2, Caspase 3, PCNA, TNF-DR<sub>4</sub>, Citocromo C, mTOR e p53 (*Santa Cruz, Biotechnology*).

Após este período as células foram centrifugadas a 1200 rpm e lavadas com PBS gelado e 0,2% de BSA por 2 vezes. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso em 200 µL de Tampão Fac’s Flow contendo 0,1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão dos receptores na superfície celular das células foram realizadas em citômetro de fluxo FAC Canto (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

#### **4.14. Marcação das mitocôndrias com o fluorocromo MitoRed para análise em microscópio confocal a laser.**

Alíquotas das culturas celulares tumorais e normais, foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas com meio de cultura RPMI a 10% de SFB mantida em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 h. As amostras dos grupos controle e tratadas com ArC, Dacarbazina, DODAC/ArC, DODAC/2AEH<sub>2</sub>F, DODAC/ArC/2AEH<sub>2</sub>F, tiveram o meio de cultura removido e foram lavadas com o próprio meio RPMI. Em seguida, foi acrescentado 10 µL de *MitoRed* para marcação de mitocôndrias e DAPI para marcação do núcleo (*Molecular Probes, USA*), durante 15 min no escuro a 37°C. Após a incubação, o excesso de MitoRed foi removido e as células lavadas com meio de cultura. As lamínulas foram colocadas em lâminas para observação ao microscópio de fluorescência Confocal a Laser (*Fluoview™ 300*), as imagens foram fotodocumentadas e analisadas.

#### **4.15. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo**

A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas. As amostras das células normais (fibroblastos) humano e murino, e das células tumorais (melanoma) humano e murino, foram tratadas com ArC, Dacarbazina, 2AEH<sub>2</sub>F, Paclitaxel. As células foram centrifugadas a 1800 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 5 µl de Rh-123 (5 mg/mL<sup>-1</sup> diluídos em etanol) (*Molecular Probes, EUA*). Em seguida, as amostras foram mantidas em

estufa 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 30 min. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet será ressuspenso em 100 µL de tampão Fac's Flow. A leitura e análise da marcação da Rh-123 nas células foi realizada em citômetro de fluxo FACS canto (BD) em intensidade de fluorescência FLH- 1 e os histogramas adquiridos foram analisados em programa Cell-Quest - BD.

#### **4.16. Ensaio de migração celular**

O ensaio de migração celular tem por finalidade avaliar a característica das células mantidas nas mesmas condições dos ensaios anteriores, de migrarem para uma área aberta propositalmente frente aos tratamentos e comparadas a ao grupo controle. Para este ensaio, foi utilizado como base o protocolo proposto por LIANG *et al.* (2007), porém, com modificações e adequando a metodologia para este estudo, conforme descrito a seguir:

Foram utilizadas placas de 24 poços, com diâmetro de 16,25mm por cada poço. A suspensão celular foi de  $2 \times 10^5$  células por ml, mantidas com meio de cultura RPMI 1640 suplementado de soro fetal bovino a 10% e mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 90-100% de confluência, foi realizado um corte transversal em cada poço das placas, utilizando-se uma ponteira estéril de micropipeta p200, de 200 µl. Após esse procedimento, cada poço foi lavado 2 vezes com a solução de PBS estéril e tendo o sobrenadante descartado, estes poços foram completados com o meio de cultura nas mesmas condições descritas acima. Esse foi considerado o momento zero, onde, em microscópio invertido utilizando-se uma objetiva de 2,5 vezes de aumento, para que a distância focal ficasse adequada para a obtenção das imagens e com o auxílio de uma câmara digital acoplada ao equipamento, através do "software" Opticam<sup>®</sup> OPTHD 3.7, realizou-se o início da sessão de fotos, sendo tempo zero, após 6 horas, após 24 horas e após 48 horas. Para que as imagens fossem obtidas do mesmo ponto, realizou-se uma marcação de referência na porção inferior da placa em seu lado externo. Dessa forma, as imagens obedeceram um padrão de distância focal, aumento e processamento.

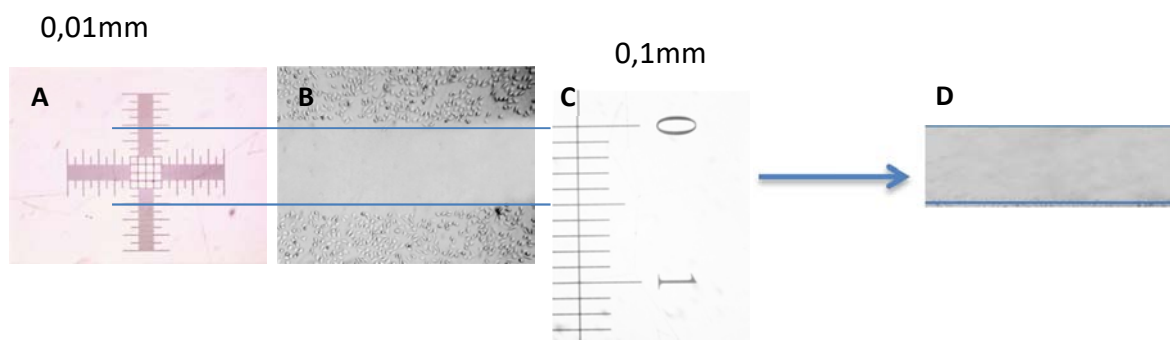
As células utilizadas nesse experimento foram os fibroblastos humanos FN1, os fibroblasto de origem murino L929, e as células tumorais de melanoma humano SKmel28 e de melanoma murino B16F10. Utilizando-se da fórmula

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ , calculou-se o volume de meio a ser retirado de cada poço, e completado pelo tratamento, levando-se em conta os valores obtidos de IC50% para cada situação célula/tratamento, mantendo-se os poços controle sem alterações. Os tratamentos utilizados foram; os quimioterápicos Dacarbazina e Paclitaxel, o extrato do alecrim do campo (ArC), o lipossoma vazio DODAC, lipossoma carregado com ArC (DODAC/ArC) nas concentrações 10/2, 10/4 e 10/8 mM, o lipossoma carregado com 2AEH<sub>2</sub>F e o extrato (DODAC/ArC/2AEH<sub>2</sub>F) na concentração 10/4/4 mM.

#### 4.16.1. Processamento das imagens para contagem das células

Primeiramente, foi obtida uma foto de uma lâmina com graduação microscópica, que acompanha o kit da câmara, para se determinar a área e obter o valor da largura da “ferida”. Com esse valor definido, as imagens obtidas tiveram um padrão definido por dois traços paralelos feitos em “software” de processamento de imagens, determinando o corte da imagem na área afetada pela “ferida” feita por meio da passagem da ponteira. Esta área da imagem foi recortada e salva separadamente para contagem das partículas (células) através do “software” gratuito Image J, metodologia ilustrada conforme figura 4.

Obs: as concentrações utilizadas neste ensaio foram referentes aos valores obtidos nos ensaios de MTT para a obtenção de IC50% .



**Figura 4: Para obtenção das áreas das fotomicrografias:** **A:** Imagem da lâmina de calibração , pequeno aumento; **B:** Imagem da cultura celular na área do corte, aumento 25x; **C:** outra região (diferente de “A”), da lâmina de calibração com divisões de 0,1mm, aumento 25X; **D:** Área da região do corte, recortada em *software* para edição de imagens, que foi utilizada para contagem de partículas no *ImageJ*.

Cada divisão da marcação da lâmina de calibração equivale a 0,1 mm (C), que representa 100µm, então, a região da abertura do corte, possui uma largura de 500µm por um comprimento de 1.575 µm de comprimento perfazendo uma área de 787,500µm<sup>2</sup> ou 0,79 mm<sup>2</sup>. OBS: para a realização deste ensaio a área não foi determinante e sim, a contagem direta das células aderidas, porém, a área pode ser utilizada como referência.



#### **4.17. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Dependendo dos valores obtidos de IC50% no ensaio de MTT, as concentrações de interesse dos respectivos tratamentos foram selecionadas para que sejam repetidas em placa de seis poços, respeitando o fator volume/concentração para cada poço dessa placa, em períodos de 2 a 6 horas de tratamento. As amostras das células tratadas, coletadas da placa, foram soltas pela ação da tripsina e centrifugadas, o pelet foi resuspenso em uma solução fixadora de glutaraldeído 5% e formaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 (por duas horas) a temperatura ambiente (25°C) e agitação constante (Karnovsky, 1965). Posteriormente foram fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 (por uma hora). Após a fixação, as amostras foram centrifugadas novamente. Após a centrifugação, foram levadas à suspensão com o tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 10 minutos, esse processo se repetiu por três vezes.

O material foi desidratado gradualmente em etanol, 70% e 90% uma vez, por 15 minutos e 100% por duas vezes de 15 minutos cada, e passado em óxido de propileno duas vezes por 15 minutos.

O material incluído em resina foi submetido ao tratamento com óxido de propileno/resina Epon® (2:1) por 3 horas, seguido de óxido de propileno/Resina Epon® (1:1) durante a noite, sendo que no dia seguinte foi colocado em resina pura por 2 horas, seguido de mais 2 horas em uma câmara de vácuo. Para a polimerização o material foi colocado em estufa a 60°C por 48 horas. Os cortes semi-finos e ultra-finos foram feitos no laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, bem com as análises das telas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906E (Zeiss, Germany), equipamento multi-usuário dessa instituição.

#### **4.18. Processamento para microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Neste processo, podemos analisar a dispersão dos lipossomas livres e os lipossomas incorporados e presentes na superfície celular. Essa técnica foi realizada no grupo de células tumorais, com o objetivo de avaliar as interações dos lipossomas na superfície celular. As células, foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de  $1 \times 10^5$ , contendo lamínulas redondas no fundo, após 24

horas para estabilização da cultura, procedeu-se os tratamentos com os lipossomas nas concentrações utilizadas nos tratamentos anteriormente definidos.

O procedimento para analisar os lipossomas livres, foi executado com o auxílio de uma micropipeta, colocando-se gotas de 10 $\mu$ l em lamínulas redondas, sendo no máximo três aplicações por lamínula e secaram à temperatura ambiente dentro de placa de Petri, para evitar poeiras, após a secagem, foi fixado em Karnovsky, por três horas.

Para as células nas placas, o meio foi retirado e substituído pelo fixador, por 3 horas, após, foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (3 passagens de 15 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão, por uma hora. Seguirá nova lavagem no tampão por três vezes de 15 minutos. A limpeza foi acompanhada em lupa estereoscópica para avaliar possíveis detritos que poderiam estar presentes nas amostras; Após esse processo de limpeza no tampão, o material passou por desidratação em série etanólica.

As lamínulas contendo os materiais passaram pelo processo de secagem através do método de ponto crítico, que utiliza o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como fluido de transmissão, passando do estado líquido diretamente para o estado gasoso, em condições aproximadas de temperatura e pressão de 40°C e 73 atm. Foi utilizado para esse fim, o equipamento marca Leica modelo EM CPD 030, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

Após a passagem pelo equipamento de ponto crítico, as lamínulas contendo os materiais, foram adequadamente coladas com fita semicondutora dupla face em discos metálicos (*Stubs*), com diâmetro igual ao diâmetro das lamínulas. Os materiais montados nos *Stubs*, foram levados para o processo de metalização em equipamento *Sputtering*, que consiste em depositar uma fina camada de ouro, sobre o material a ser observado em microscopia eletrônica de varredura, através um processo que ocorre em uma câmara, onde o ar é substituído por uma atmosfera de argônio e por diferença de potencial, partículas de ouro são removidas do eletrodo e se depositam no material biológico, por intermédio do bombardeamento com íons de argônio. Para essa finalidade foi utilizado o equipamento da marca Leica modelo EM SCD 050. Após este processo, as amostras montadas nos *Stubs*, foram colocadas e observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura

– MEV da marca *FEI* modelo *Quanta250*, no método de alto vácuo, pertencente ao Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

#### **4.19. Análise em microscopia de luz**

Esse método foi utilizado para acompanhamento morfológico das células tumorais e normais, tratadas e controle. Para esse fim, as células foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro, após o período de crescimento e tratamento, foram separadas para visualização e fotodocumentação, em microscópio ótico. Para isso, as lamínulas selecionadas foram fixadas em paraformaldeído a 2%. Após secagem em chapa quente apropriada, as lamínulas foram coradas pelo método Papanicolaou.

##### **4.19.1. Coloração de Papanicolaou**

Essa técnica produz um resultado multicromático possibilitando a identificação de alterações morfológicas e cromáticas conforme variações no processo de viabilidade celular, para tanto, as células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro, previamente preparadas e esterilizadas para esse ensaio. Com as placas montadas com as lamínulas, procedeu-se o cultivo das células de forma a desenvolverem-se sobre estas lamínulas e após 24 horas de estabilização das culturas, realizou-se a colocação dos tratamentos.

Decorrido o tempo dos tratamentos, as lamínulas foram retiradas com o auxílio de uma agulha e uma pinça, e colocadas numa placa de Pétri para serem levadas à bateria de coloração pelo método Papanicolaou conforme metodologia proposta pelo fabricante do kit (Laborclin-Produtos para Laboratório Ltda.).

Esse processo, já contempla fixação, coloração e finalização para montagem permanente em lâminas, e é composta por um corante nuclear, a hematoxilina e dois citoplasmáticos o Orange G e o EA-36.

A hematoxilina é um corante natural básico, portanto acidófilo corando estruturas ácidas como o núcleo. O Orange G é um corante ácido monocromático corando estruturas básicas presentes no citoplasma. O EA-36 também é um corante ácido, derivado da combinação do verde luz e eosina amarela, atuando na coloração do citoplasma de células metabolicamente ativas.

A coloração de Papanicolaou é considerada como padrão internacional de coloração cérvico-vaginal, podendo ser usada igualmente em outros materiais. No presente estudo, diante dos resultados, foi levado em conta alterações morfológicas, de forma a identificar células metabolicamente ativas e células apoptóticas, entre outras alterações.

#### **4.20. Análises estatísticas**

Todos os valores obtidos dos ensaios das células de origem humana e murino, foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e após a obtenção dos valores individuais de cada linhagem celular tratada e controle, os resultados foram tabelados e analisados no programa *Graphpad, Version 5.0*. (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada pelas comparações de dois ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de *TUKEYKRAMER* considerando como nível crítico para significância valores de  $p < 0.05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  ou ns= não significativo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Alecrim-do-campo *Baccharis dracunculifolia*

#### 5.1.1. Obtenção do extrato de *Baccharis dracunculifolia*

A coleta do alecrim-do-campo, foi realizada por pessoal especializado da empresa BioativosGroup® em 01 de março de 2020, em área rural do município São Sebastião da Gramma, (Latitude: 21° 42' 54" Sul, Longitude: 46° 49' 24" Oeste) no estado de São Paulo, região pertencente à bacia hidrográfica do Rio Pardo, irrigado pelos rios Fartura, São Domingos e Anhumas, em altitude de 945 metros. Um estudo do ciclo das chuvas no período de três meses anteriores à data da coleta, foi realizado pela empresa ClimaTempo A *StormGeo Company* (Fonte CIIAGRO), conforme Apêndice A, com a finalidade de se entender o ciclo das chuvas e condições climáticas no período da coleta, visto que, esses fatores podem alterar a composição química dos vegetais. Essas informações podem ser úteis para estudos comparativos futuros e serão mantidos como histórico em nosso arquivo.

A empresa BioativosGroup® é detentora do processo de patente, para obtenção do extrato pelo método supercrítico em câmara de CO<sub>2</sub>.

#### 5.1.2. Caracterização e identificação de *Baccharis dracunculifolia*

Para a realização das imagens, foi utilizado um exemplar identificado por especialista conforme descrito no item 3.2.1 em "Materiais e métodos".

As imagens macroscópicas foram realizadas por meio de câmara fotográfica reflex marca Nikon modelo D-5300, com lente macro de 150mm. As imagens foram obtidas no próprio local, revelando folhas pequenas de 3 a 5 mm de comprimento, com bordas serrilhadas. As imagens foram obtidas em fevereiro de 2023 e não havia floração.

Para os ensaios de microscopia, as folhas foram lavadas em série etanólica e secas à temperatura ambiente, posteriormente, foram colocadas no microscópio óptico, obtendo-se as imagens *in natura*, sem corantes, revelando estruturas como, estômatos, tricoma flagelado, tricoma bisseriado. Os estômatos se distribuíam na porção inferior da folha. Na porção superior,

observou-se outras estruturas, como distribuição celular do tecido foliar, e os tricomas.

Para a microscopia eletrônica de varredura, após os procedimentos de secagem, as amostras foram montadas em *stubs*, sobre a aderência de fita adesiva semicondutora de dupla face, sendo que em uma dessas amostras, foi feito um corte sagital, ficando estas amostras, dispostas de modo que o interior da folha pudesse ser analisado pelo feixe eletrônico do microscópio. Após esses procedimentos de montagem, os stubs foram para a deposição metálica e posterior análise ao microscópio.

Essas imagens revelaram as ultraestruturas foliares, como os estômatos, os tricomas, os tricomas bisseriados e as células. O interior foliar revelou um complexo estrutural denominado de mesofilo, responsável pela realização da fotossíntese, sendo este, composto por dois tipos principais de tecido, o parênquima paliçádico e o parênquima lacunoso.

O parênquima paliçádico está localizado na parte superior do mesofilo, próximo à superfície superior da folha. É formado por células alongadas, dispostas verticalmente em uma organização compacta. Essas células contêm cloroplastos, responsáveis pela absorção da luz durante a fotossíntese.

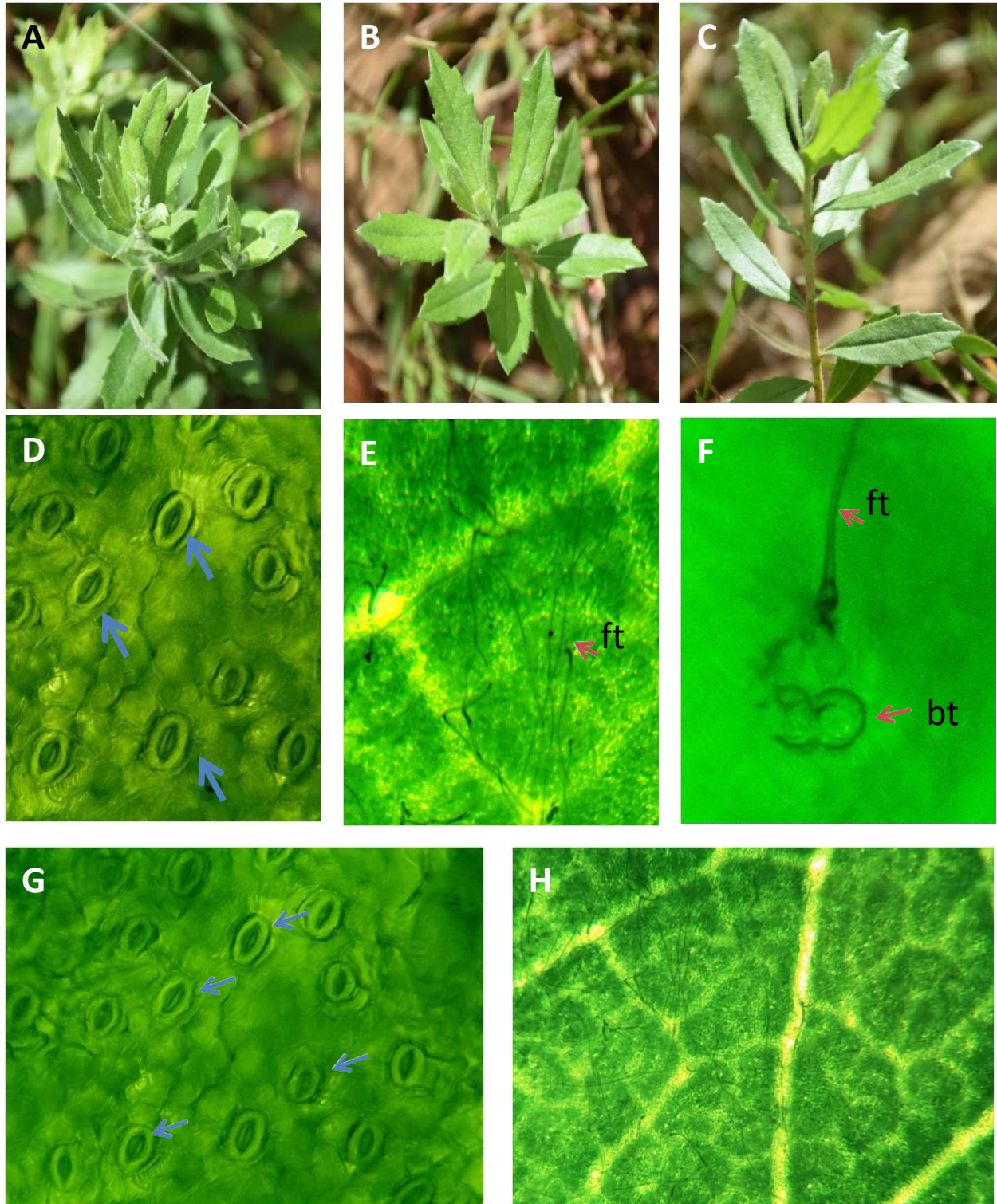
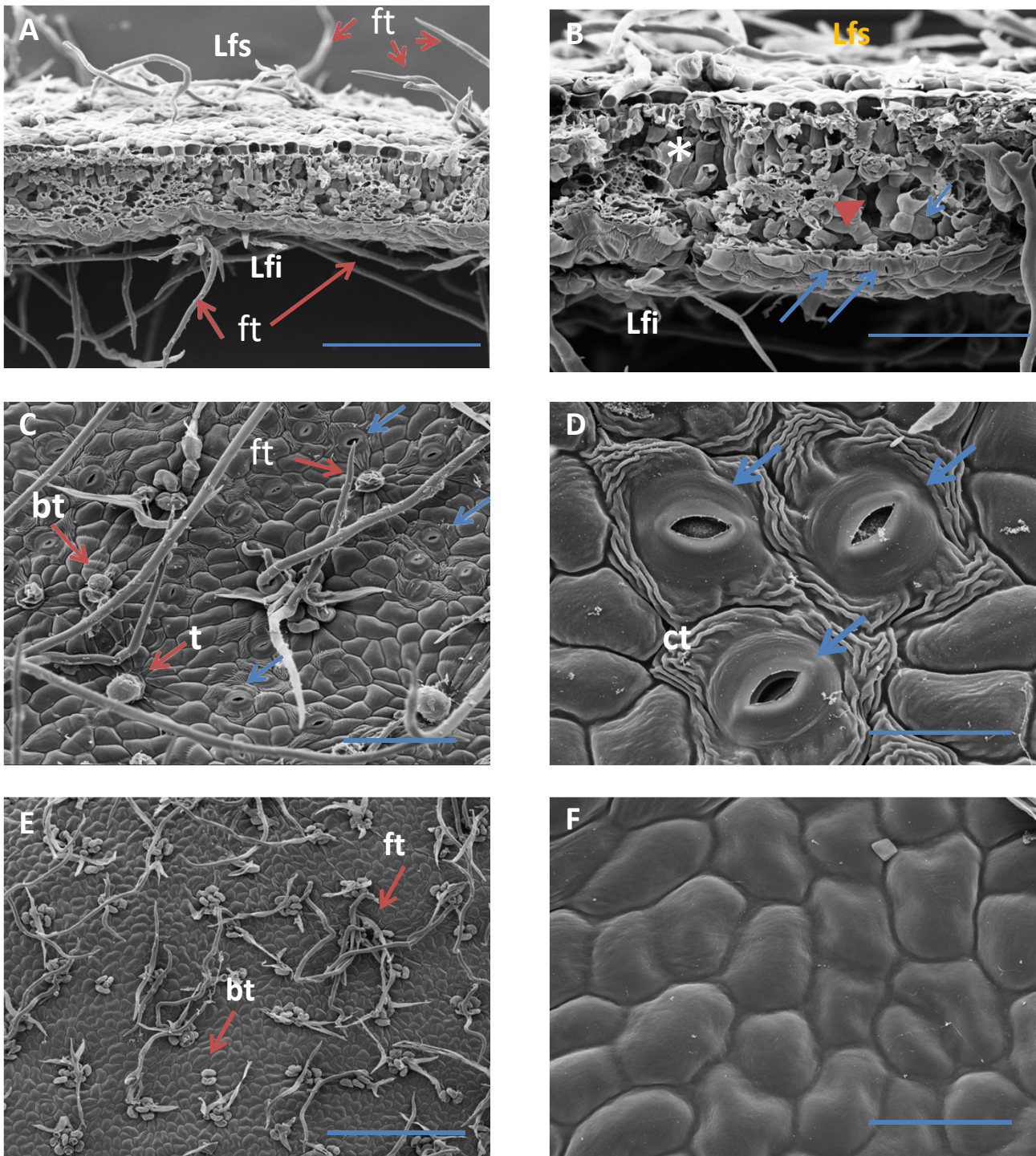


Figura 5. Imagens realizadas em espécime encontrada no campus da Universidade de São Paulo, proximidades do prédio do ICB I, identificada por especialista, Curador do Herbário SPF, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo. **A, B e C:** Imagens macroscópicas de *Baccharis dracunculifolia* DC. **D, E e F:** imagens em microscópio ótico sem corantes. **D:** Região inferior da lâmina foliar, estômatos (setas) aumento 500x; **E:** Região superior da lâmina foliar, tricoma flagelado (ft), aumento 200x; **F:** Região superior da lâmina foliar, tricoma flagelado (ft), tricoma bisseriado (bt), aumento 500x. **G e H:** Imagens de porção inferior e superior da lâmina foliar, em **G** região inferior, ocorre presença de estômatos (setas) e em **H**, região superior da lâmina foliar, ausência de estômatos, aumento 500x. Imagens macroscópicas: Câmera Nikon D5300. Fotomicrografias: Microscópio Zeiss Universal.



**Figura 6.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura. **A e B**, corte transversal da folha para visualização da composição interna (asterisco) **A**: Região superior da lâmina foliar (Lfs), região inferior da lâmina foliar (Lfi), tricoma flagelado (ft), aumento 457 x, barra 200  $\mu$ m e **B**: Região superior da lâmina foliar (Lfs), Região inferior da lâmina foliar (Lfi), observa-se células que compõe o interior foliar (c), e região intersticial (cabeça de seta), estômatos (setas), parênquima paliçádico, composto por células alongads (asterisco), aumento 959x, barra 100  $\mu$ m; **C e D**, Região inferior da lâmina foliar, em **C**: tricoma flagelado (ft), tricoma (t), tricoma bisseriado (bt), 678x, barra 100  $\mu$ m e **D**: Estômatos (setas), cutícula (ct), 2.850x, barra 30  $\mu$ m; **E e F**, região superior da lâmina foliar, em **E**: Tricoma bisseriado (bt), tricoma flagelado (ft), aumento 295x, barra 300  $\mu$ m e **F** Detalhe da região superior da lâmina foliar , aumento 2.346x , barra 40  $\mu$ m. Microscópio eletrônico: FEI Quanta (Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan).



## 5.2. Cromatografia Gasosa para análise do extrato

Para análise de compostos integrantes na amostra, em abril de 2021, foi separada uma quantidade de 6mg e enviada para a Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com a finalidade de avaliação dos compostos constituintes da amostra através de Cromatografia Gasosa (CG) em equipamento marca *Shimadzu* modelo GC-MS-QP 2020. A nomenclatura dos compostos foi obtida por biblioteca através do programa NIST14 (NIST 14 *Library & Search Program, Multiformat/Shimadzu Version*). Os resultados obtidos por meio desta biblioteca, foram submetidos à avaliação *in silico* através do banco de dados de moléculas da plataforma *PubChem* mantido pelo *National Center for Biotechnology* (NCBI), para coleta de parâmetros como: estrutura química 2D; fórmula molecular; peso molecular; número do CID e o nome sugerido pelo programa NIST14 e seus sinônimos. Os gráficos representativos resultantes dessas análises estão no Apêndice A.

Cada composto identificado pelo *software* NIST 14, é gerado um valor para o grau de similaridade “Similarity Index” SI, onde, valores acima de 90, definem elevado grau de similaridade. Para este trabalho, foram considerados valores acima de 90, por possuírem maior grau de similaridade, algum composto com valor abaixo de 90 pode ser considerado caso contenha alguma fonte importante de dados ou alguma referência considerada relevante. A nomenclatura foi mantida na língua inglesa, para efeito de rastreabilidade na plataforma *Pub Chem*, com a finalidade de se proceder a conferência dos dados, diminuindo assim possíveis variáveis de nomenclatura.

### 5.2.1. Parâmetros para ajuste do equipamento

Os seguintes parâmetros foram utilizados para ajuste do equipamento de cromatografia gasosa: Temperatura do coluna: 60°C; Temperatura da injeção: 280°C; Modo de injeção : Split; Modo de controle de fluxo: Velocidade Linear; Pressão: 111.5 kPa; Fluxo Total: 13.8 mL/min; Fluxo da coluna : 1.8 mL/min; Velocidade linear: 48.9 cm/seg.; Fluxo do purgador: 3. mL/min; Relação da divisão: 5.0.

Gráfico referente aos picos nos tempos de retenção de 13.004 a 22.207. A descrição detalhada dos resultados obtidos está no Apêndice A.

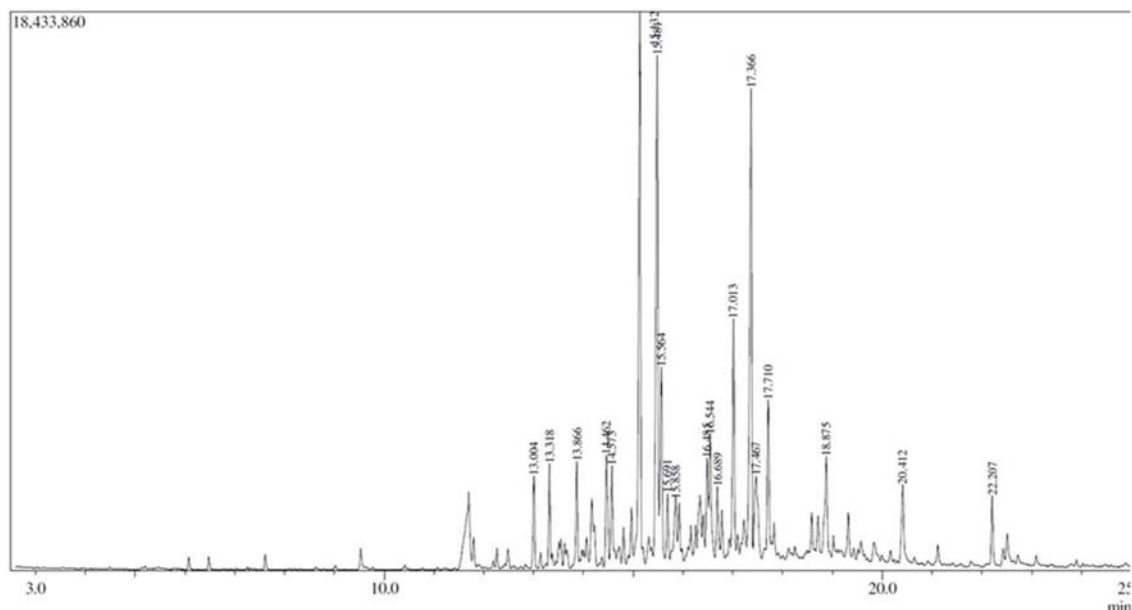


Figura 7: Cromatograma da varredura por CG/MS picos referente aos tempos de retenção entre 13.004 e 22.207.

Picos	R Time	% h	SI	NOME	PUB Chem CID	Formula	P. Mol
01	13.004	2.77	95	Bicyclo[7.2.0] undec-4-ene,4,11,11-trimethyl-8-methylene	5452236	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
02	13.318	3.05	93	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene	91753588	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
03	13.866	3.07	93	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)	101708	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
04	14.462	3.33	94	gamma- Muurolene	12313020	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
05	14.573	2.73	90	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8 a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)	101708	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
06	15.132	16.63	95	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)	5284507	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	254
07	15.481	15.47	95	(-)-Spathulenol	13854255	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220
08	15.564	5.87	88	Kauran-18-al, 17-(acetyloxy)-, (4.beta.)	536366	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	346
09	15.691	2.00	95	1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl	6432543	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
10	15.858	1.70	94	Ledol # 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol	6432561	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
11	16.485	2.82	82	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)	5284507	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
12	16.544	3.62	87	.alpha.-Cadinol#4-Isopropyl-1,6-dimethyl-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1-naphthalenol	519662	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
13	16.689	2.18	83	7-Oxabicyclo[4.1.0] heptane, 1-methyl-4-(2-methyloxiranyl)	232703	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	168
14	17.013	7.09	89	(1R,7S,E)-7-Isopropyl-4,10-dimethylenecyclodec-5-enol	13304974	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220
15	17.366	14.24	90	4-Hexen-1-ol,2-ethenyl-2,5-dimethyl	549543	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154
16	17.467	2.40	83	(-)-Spathulenol	13854255	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220
17	17.710	4.54	83	1-((1S, 3 a R,4R,7S,7 aS)-4-Hydroxy-7-isopropyl-4-methyloctahydro-	539857	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	238
18	18.875	2.22	92	Neophytadiene #7,11,15-Trimethyl-3-methylenhexadec-1-ene \$S 1-Hexadecene, 7,11,15-trimethyl-3-methylene	10446	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	278
19	20.412	2.16	95	n-Hexadecanoic acid # Hexadecanoic acid	985	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256
20	22.207	2.09	97	Phytol 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- \$	5280435	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296

Tabela 4: compostos identificados pela biblioteca NIST 14 nos tempos de retenção entre 13.004 até 22.207. Pico: número sequencial dos picos obtidos; R Time: tempo de retenção; %h: Percentual da altura do pico; SI: Índice de similaridade; NOME: Referente ao nome identificado pela biblioteca NIST-14; PUB Chem CID: Número de identificação de compostos; Fórmula: Fórmula química; P. Mol: peso molecular do composto em g/mol.

Gráfico referente aos picos nos tempos de retenção de 27.148 a 39.742.  
Adescrição detalhada dos resultados obtidos está no Apêndice A.

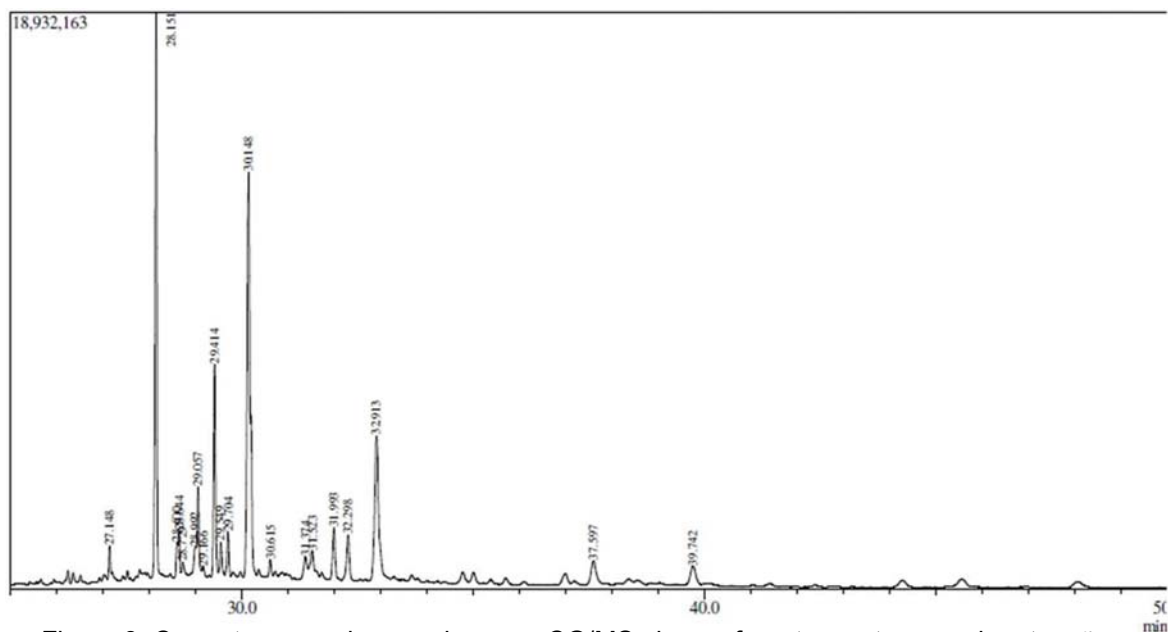


Figura 8: Cromatograma da varredura por CG/MS picos referente aos tempos de retenção entre 27.148 e 39.742.

Picos	R Time	% h	SI	NOME	PUB Chem CID	Formula	P. Mol
01	27.148	1.65	74	9-Methyltricyclo[4.2.1.1(2,5)]deca-3,7-diene-9,10-diol	539160	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	178
02	28.151	30.64	96	Heneicosane	12403	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	296
03	28.600	1.89	74	Aciphyllyl alcohol; 2-(3,8-Dimethyl-1,2,4,5,6,7,8,8a-octahydro-5-azulenyl)-2-propen-1-ol	565770	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220
04	28.644	2.47	71	Decahydronaphtho[2,3]furan-2-one,	3732226	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	343
05	28.729	0.67	75	Decahydronaphtho[2,3]furan-2-one,	3732226	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	343
06	28.992	1.45	76	3-Phenylpropanoic acid	561994	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314
07	29.057	4.78	97	Heneicosane; n-Heicosane	12403	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	296
08	29.166	0.56	86	2-Phenethyl-beta-phenylpropionate	520360	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	254
09	29.414	11.57	96	Supraene	638072	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	410,7
10	29.549	1.87	66	11-Hydroxy-DELTA 9-tetrahydrocannabinol	644022	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330
11	29.704	2.42	96	2-methyloctacosane	519147	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	408
12	30.148	21.96	96	Tetratetracontane## n-Tetratetracontane	23494	C <sub>44</sub> H <sub>90</sub>	618
13	30.615	0.90	90	Oxirane, 2,2-dimethyl -3-(3,7,12,16,20-pentametamethyl-3,7,11,15,19-heneicosapenta	5366020	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	426
14	31.374	1.07	93	Tetratetracontane ; n-Tetratetracontane	23494	C <sub>44</sub> H <sub>90</sub>	618
15	31.523	1.18	88	Pectolinarigenin	5320438	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314
16	31.993	2.79	95	Octacosanal; n-Octacosanal	3084376	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub> O	408
17	32.298	2.38	96	2-methyloctacosane	519147	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	408
18	32.913	7.71	96	Tetratetracontane; n-Tetratetracontane	23494	C <sub>44</sub> H <sub>90</sub>	618
19	37.597	1.15	87	Chondrillasterol; Stigmasta-7,22dien-3-ol, (3.beta.,5.alpha.,22E,24R	5283663	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	412
20	39.742	0.91	87	24-Norusa-3,12-diene	91735342	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub>	394

Tabela 5: compostos identificados pela biblioteca NIST 14 nos tempos de retenção 27.148 a 39.742 . Pico: número sequencial dos picos obtidos; *R Time*: tempo de retenção; %h: Percentual da altura do pico; SI: Índice de similaridade; NOME: Referente ao nome identificado pela biblioteca NIST-14; PUB Chem CID: Número de identificação de compostos; Fórmula: Fórmula química; P. Mol: peso molecular do composto em g/mol.

### 5.3. Análise do extrato por cromatografia líquida

Para obtenção dos valores das massas contidas no extrato, foi realizada análise por cromatografia líquida, no Laboratório de Espectrometria de Massas da Central Analítica do Instituto de Química, por meio do equipamento Espectrômetro de massas: Amazon Speed ETD – Bruker, com a finalidade de avaliar as massas dos compostos contidos no extrato. Os gráficos representativos resultantes dessas análises estão no Apêndice 1.

#### 5.3.1. Parâmetros para ajuste do equipamento

A análise foi realizada em espectrômetro de massas marca *Amazon Speed ETD – Bruker* e ajustado nos seguintes parâmetros:

Nebulizer: 29 Psi; Dry gas: 7 L/min; Temp: 325°C; HV: 4500V; ESI alternado com MS5.

Acoplado ao HPLC marca *Shimadzu* modelo CBM-20A- bombas modelo LC-30AD *Shimadzu*; Detector: SPD-20A - *Shimadzu*; Forno: CTO-20A - *Shimadzu*; Autoinjeter: SIL 30AC - *Shimadzu*.

As amostras foram preparadas com os seguintes solventes: solvente A: H<sub>2</sub>O 0,1% ácido fórmico (AF); Solvente B: metanol (MeOH); Coluna: Ascentis C18 250 x 2,1 mm - 5µm; Temperatura do forno: ambiente; Fluxo: 1 ml/min.

Resultados obtidos por espectrômetro de massas marca *Amazon Speed ETD – Bruker*, revelando picos de massas entre 254,87 e 395,96.

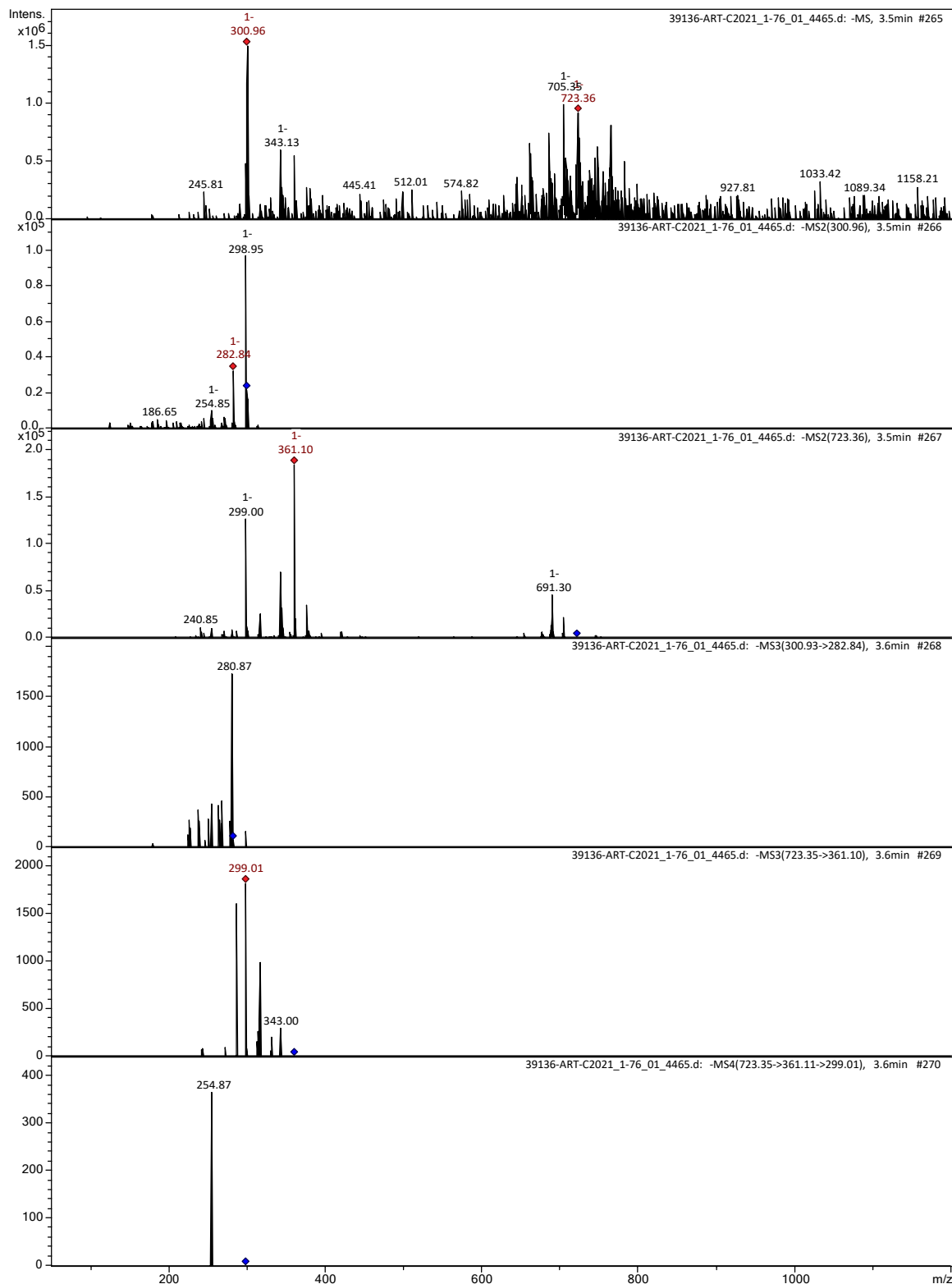


Figura 9: Varredura em massas representativos por infusão direta em espectro Espectrômetro de massas: Amazon Speed ETD – Bruker; Nebulizer: 29 Psi; Dry gas: 7 L/min; Temp: 325°C; HV: 4500V; ESI alternado com MS5; HPLC: Controladora: CBM-20A-Shimadzu; Bombas: LC-30AD Shimadzu; Detector: SPD-20A – Shimadzu Forno: CTO-20A – Shimadzu.

#### 5.4. Análise das frações

Foi separada uma porção do extrato ArC de 60mg e enviada para o Laboratório de Desenvolvimento e Inovação, do Centro de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Butantan, sob supervisão da Dra. Ana Olívia de Souza, com o objetivo de realizar uma análise prévia e posterior separação de frações provenientes do extrato ArC, por meio de HPLC, conforme 4.4.1. Esse processo de separação, produziu oito frações, denominadas de Fração 1 (Fr1), Fração 2, Fração 3 (Fr3), Fração 4 (Fr4), Fração 5 (Fr5), Fração 6 (Fr6), Fração 7 (Fr7) e Fração 8 (Fr8). Essas frações foram analisadas na Central Analítica do Instituto de Química USP, por cromatografia gasosa CG/MS nos mesmos parâmetros utilizados para análise do extrato ArC, descrito em 4.2, cujo resumo dos resultados está demonstrado em 4.4.2., os gráficos representativos resultantes dessas análises estão no Apêndice B.

Com essas frações separadas, foram realizados testes de viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT, em células de fibroblastos normais L929 e células de melanoma B16F10, conforme 4.4.3. Comparando os resultados entre as células fibroblastos e de melanoma, todos indicaram efeitos mais protetivos para os fibroblastos do que para as células de melanoma, exceto a fração 4 que gerou um resultado não significativo, e para as demais frações, produziram valores de  $p < 0,001$  e para a fração 3, produziu um valor de  $p < 0,01$ , segundo análise estatística ANOVA e Tukey-Kramer, conforme descrito no item 4.4.4.

Dados obtidos pela análise no processo de separação das frações por HPLC, os picos cromatográficos representam as frações identificadas em tempos de retenção entre a fase estacionária e fase móvel (Figura 10).

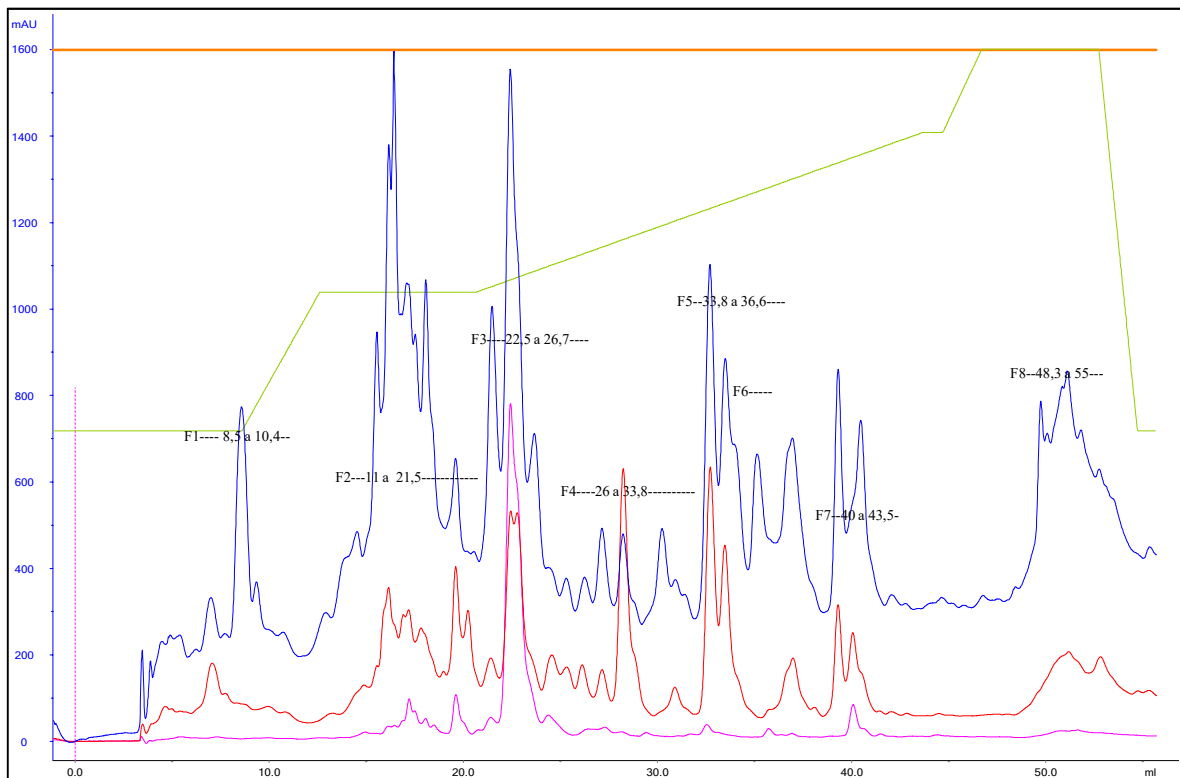


Figura 10. obtido por análise em HPLC da separação dos oito picos no extrato ArC. Fração 1 (F1) intervalo entre 8,5-10,4; Fração 2 (F2) intervalo entre 11-21,5; Fração 3 (F3) intervalo entre 22,5-26,7; Fração 4 (F4) intervalo entre 26-33,8; Fração 5 (F5) intervalo entre 33,8-36,6; Fração 6 (F6) intervalo entre 37- 39,8; Fração 7 intervalo entre 40-43,5; Fração 8 (F8) intervalo entre 48,3-55.

As frações separadas conforme descrição em 4.4, foram analisadas por cromatografia gasosa e foram identificados 14 compostos descritos na tabela 6. Os gráficos obtidos nessa análise estão contemplados no Apêndice B.

FRAÇÕES	R Time	% h	NOME	PUB Chem CID	Fórmula	P. Mol g/mol	No Extrato
01	81.187	90,65	Disiloxane, 1,3-dihexadecyl-1,1,3,3-tetramethyl	<a href="#">584030</a>	C <sub>36</sub> H <sub>78</sub> OSi <sub>2</sub>	583,2	N
02	38.510	49,87	Oplopanone; (-)-Oplopanone; Oplopanon	<a href="#">146157819</a>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	238,37	N
03	68.785	9,45	3-Phenylpropionic acid, 8-chlorooctyl ester	<a href="#">91703272</a>	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> ClO <sub>2</sub>	296	N
03	69.480	18,30	Squalene; 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-	<a href="#">638072</a>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	410	S
04	69.480	12,41	Squalene; 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-	<a href="#">638072</a>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	410	S
05	43.537	7,01	4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)] dodecane-2,9-diol	596186	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	238	N
05	47.505	9,09	Pentadecanoic acid, ethyl ester; Ethyl pentadecanoate; n-Pentadecanoic acid ethyl ester	<a href="#">38762</a>	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	N
05	53.592	8,94	Octadecanoic acid, ethyl ester; Stearic acid, ethyl ester; Ethyl n-octadecanoate; Ethyl octadecanoate; Ethyl stearate; Radia 7185	<a href="#">8122</a>	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	312	N
05	61.225	7,62	Phenol, 2,4-bis(1-methyl-1-phenylethyl); 2,4-Bis(dimethylbenzyl) phenol; 2,4-Bis(1-methyl-1-phenylethyl) phenol.	<a href="#">76013</a>	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O	330	N
06	66.222	15,61	Oxirane,2,2-dimethyl-3-(3,7,12,16,20-pentamethyl-3,7,11,15,19-heneicosapentaenyl), (all-E); 2,2-Dimethyl-3-[(3E,7E,11E,15E)-3,7,12,16,20	693	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	426,7	N
07	47.492	18,96	Pentadecanoic acid, ethyl ester; Ethyl pentadecanoate; n-Pentadecanoic acid ethyl ester	38762	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270,5	N
07	53.686	18,90	Tetradecanoic acid, ethyl ester; Myristic acid, ethyl ester; Ethyl myristate; Ethyl tetradecanoate; Ethyl ester of tetradecanoic acid; Ethyl	31283	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256,42	N
07	61.211	18,54	Phenol, 2,4-bis(1-methyl-1-phenylethyl); 2,4-Bis(dimethylbenzyl) phenol; 2,4-Bis(1-methyl-1-phenylethyl) phenol	76013	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O	330,5	N
08	47.513	30,12	n-Hexadecanoic acid; Hexadecanoic acid; n-Hexadecanoic acid; Palmitic acid; Pentadecanecarboxylic acid; 1-Pentadecanecarboxylic acid	985	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256,42	S

Tabela 6: Compostos identificados pela biblioteca NIST 14 em tempos de retenção específico para cada fração. Frações: número referente à Fração; *R Time*: tempo de retenção; %h: Percentual da altura do pico; SI: Índice de Similaridade; NOME: Referente ao nome identificado pela biblioteca NIST-14; PUB Chem CID: Número de identificação de compostos; Fórmula: Fórmula química; P. Mol: peso molecular do composto em g/mol; No Extrato: Referente à detecção do composto no extrato, conforme tabelas 4 e 5.



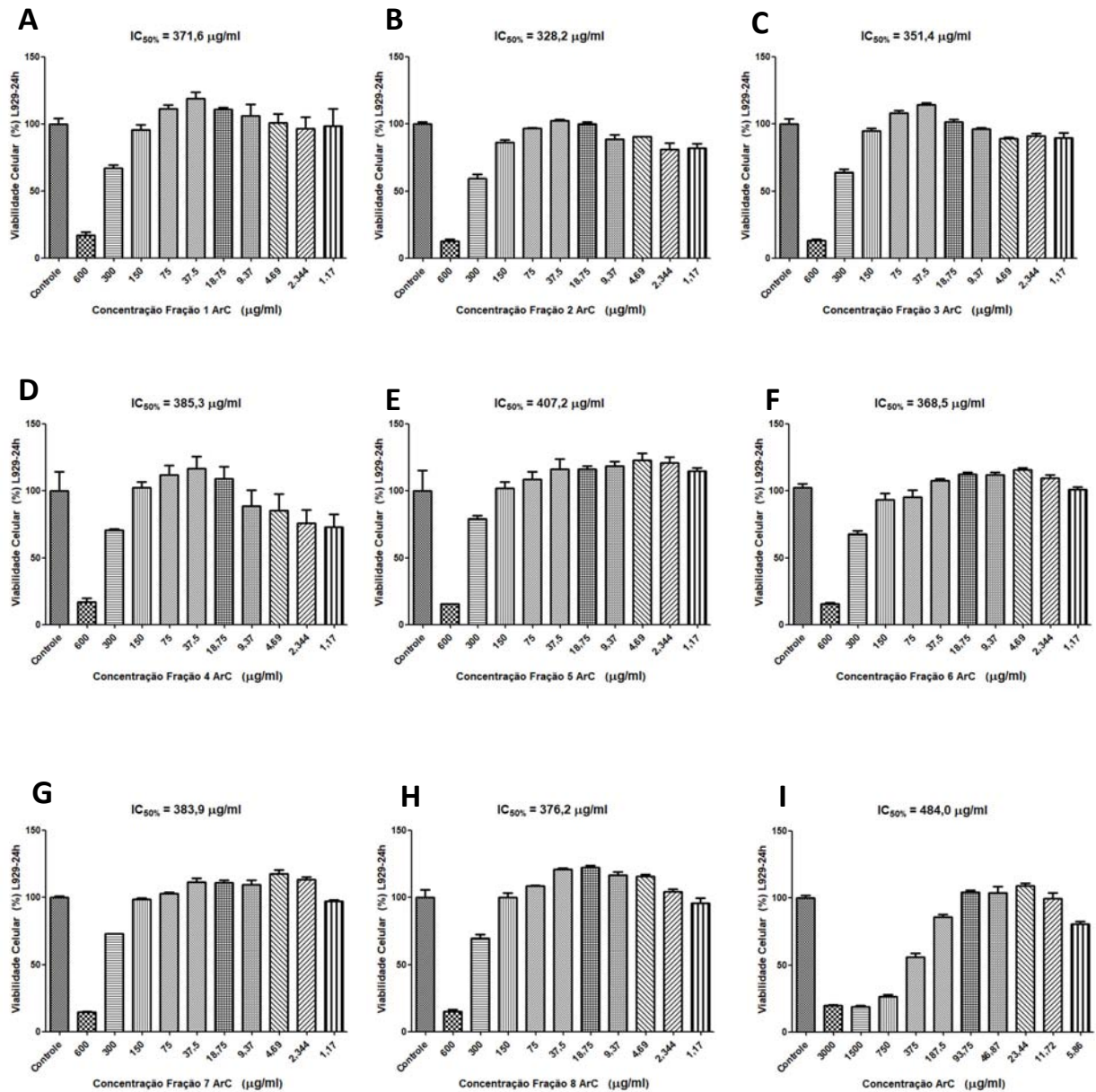


Figura 11: Determinação da citotoxicidade das frações nas células fibroblastos murinos normais L929, pelo método colorimétrico MTT, representadas por gráficos de barras expressos por média  $\pm$ DP. **A:** Fr1,  $IC_{50}$  de 371,6  $\mu\text{g/ml}$ ; **B:** Fr2,  $IC_{50}$  de 328,2  $\mu\text{g/ml}$ ; **C:** Fr3,  $IC_{50}$  de 351,4  $\mu\text{g/ml}$ ; **D:** Fr4,  $IC_{50}$  de 385,3  $\mu\text{g/ml}$ ; **E:** Fr5,  $IC_{50}$  de 407,2  $\mu\text{g/ml}$ ; **F:** Fr6,  $IC_{50}$  de 368,5  $\mu\text{g/ml}$ ; **G:** Fr7,  $IC_{50}$  de 383,9  $\mu\text{g/ml}$ ; **H:** Fr8,  $IC_{50}$  de 376,2  $\mu\text{g/ml}$ ; **I:** Extrato ArC,  $IC_{50}$  de 484  $\mu\text{g/ml}$ . As células foram tratadas com as frações a partir de uma concentração inicial de 600 $\mu\text{g/ml}$  e em ArC pela concentração inicial de 3000  $\mu\text{g/ml}$ , por um período de 24 horas.

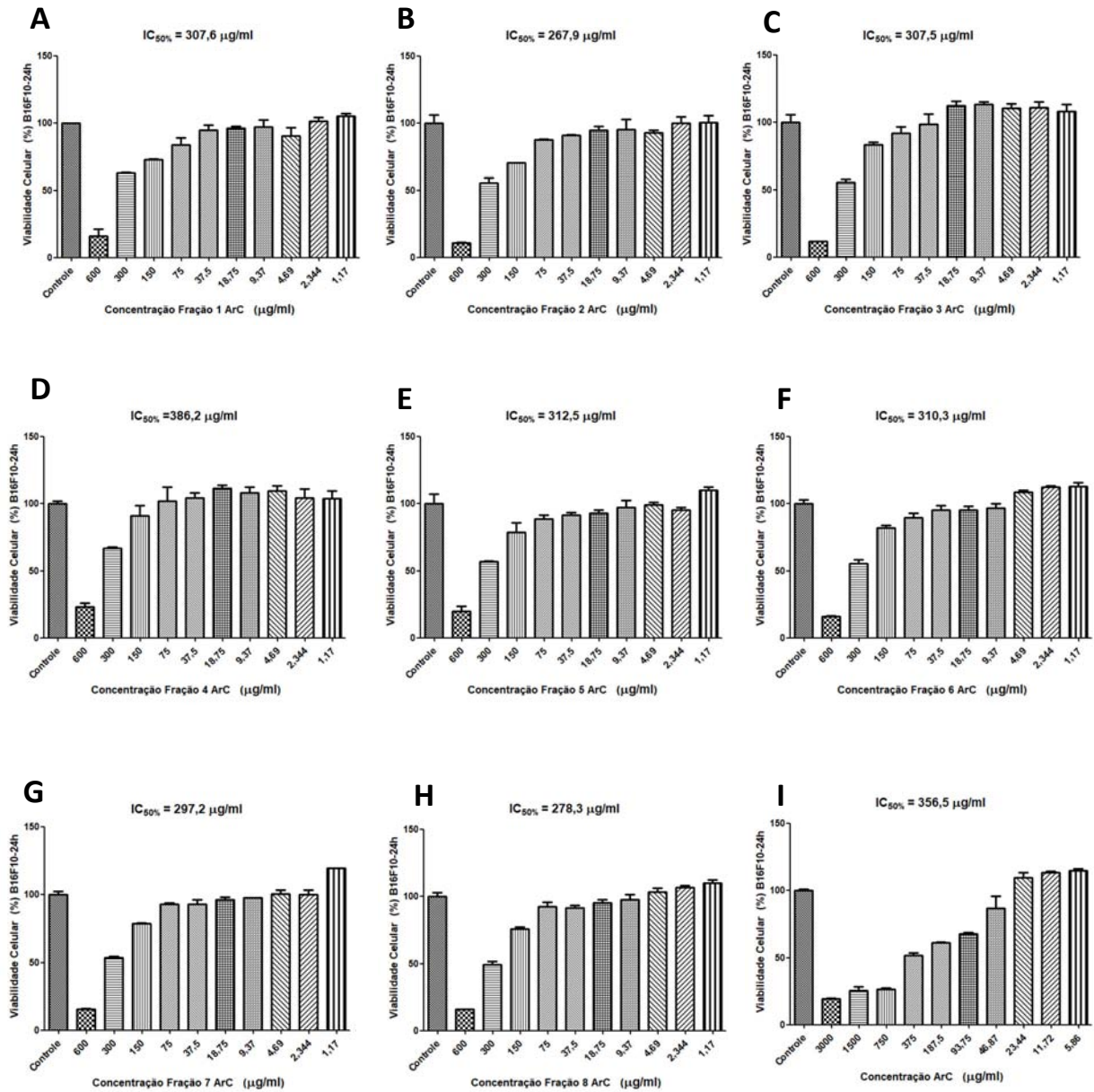


Figura 12: Determinação da citotoxicidade das frações nas células de melanoma murino B16F10, pelo método colorimétrico MTT, representadas por gráficos de barras expressos por média  $\pm$ DP. **A:** Fr1,  $IC_{50}$  de 307,6  $\mu\text{g/ml}$ ; **B:** Fr2,  $IC_{50}$  de 267,9  $\mu\text{g/ml}$ ; **C:** Fr3,  $IC_{50}$  de 307,5  $\mu\text{g/ml}$ ; **D:** Fr4,  $IC_{50}$  de 386,2  $\mu\text{g/ml}$ ; **E:** Fr5,  $IC_{50}$  de 312,5  $\mu\text{g/ml}$ ; **F:** Fr6,  $IC_{50}$  de 310,3  $\mu\text{g/ml}$ ; **G:** Fr7,  $IC_{50}$  de 297,2  $\mu\text{g/ml}$ ; **H:** Fr8,  $IC_{50}$  de 278,3  $\mu\text{g/ml}$ ; **I:** Extrato ArC,  $IC_{50}$  de 356,5  $\mu\text{g/ml}$ . As células foram tratadas a partir de uma concentração inicial de 600  $\mu\text{g/ml}$  e em ArC pela concentração inicial de 3000  $\mu\text{g/ml}$  por um período de 24 horas.

FRAÇÃO	L929	B16F10	% Ratio	Valor de $p$	Sumário
F1 $\mu\text{g/ml}$	371,6	307,6	21	<0.001	***
F2 $\mu\text{g/ml}$	328,2	267,9	23	<0.001	***
F3 $\mu\text{g/ml}$	351,4	307,5	14	<0.01	**
F4 $\mu\text{g/ml}$	385,3	386,2	-	-	n.s.
F5 $\mu\text{g/ml}$	407,2	312,5	30	<0.001	***
F6 $\mu\text{g/m}$	368,5	310,3	19	<0.001	***
F7 $\mu\text{g/ml}$	383,9	297,2	29	<0.001	***
F8 $\mu\text{g/ml}$	376,2	278,3	35	<0.001	***
ArC $\mu\text{g/ml}$	484	356,5	35	<0,001	***

Tabela 7. Valores de IC50% expressos em  $\mu\text{g/ml}$ . Ratio %: percentual da diferença entre fibroblastos L929 e melanoma B16F10. Valores de  $p$  conforme teste de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer.  $p < 0,05$  \*;  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,001$  \*\*\*; não significativo = ns.

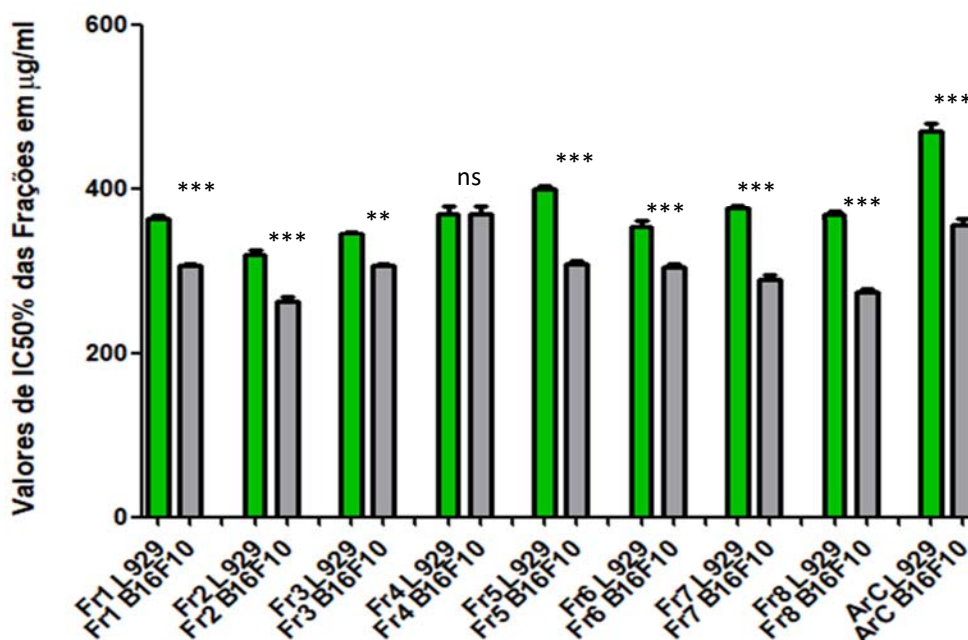


Figura 13. Análise dos resultados obtidos através dos ensaios de viabilidade celular MTT nas frações de ArC. As células foram tratadas com as frações isoladas nos valores de IC50% por um período de 24 horas. **A:** Tabela dos resultados obtidos nos experimentos. **B:** Gráfico de barras mostrando a diferença entre os fibroblastos murino L929 e as células de melanoma murino B16F10, por meio da aplicação do teste ANOVA e Tukey-Kramer.  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*;  $p < 0.001$  \*\*\*; não significativo = ns.

## 5.5. Formulação lipossomal

Com os compostos preparados e analisados, foram delineadas as formulações lipossomais de DODAC vazio, DODAC/ArC em três diferentes concentrações e DODAC/2-AEH<sub>2</sub>F/ArC. A avaliação da carga de superfície da formulação lipossomal DODAC foi realizada no dia da produção dos lipossomas. O potencial zeta foi inferido com o objetivo de verificar a influência do meio dispersante e do ArC na dissociação de espécies iônicas presentes nas camadas lipossomais entre as regiões anfífilas do DODAC representando a relação entre as cargas.

Para uma primeira análise, a concentração de DODAC vazio utilizada foi de 10 mM, obtendo-se um diâmetro médio de 74,77 nm e um potencial zeta de 71,0 mV. Após quatro meses, com os lipossomas armazenados a temperatura ambiente, o diâmetro médio foi de 91,31 nm.

Os lipossomas carregados com 2-AEH<sub>2</sub>F em duas concentrações diferentes, DODAC a 10 mM e o 2-AEH<sub>2</sub>F na concentração de 4 mM apresentaram um diâmetro médio de 80,58 nm e na concentração de DODAC a 4 mM e 2-AEH<sub>2</sub>F a 4 mM com diâmetro médio de 68,51 nm. Em um intervalo de tempo de cinco meses, a formulação lipossomal DODAC/2-AEH<sub>2</sub>F na concentração 10/4 mM apresentou uma pequena variação no diâmetro de 3,89%, sendo de 80,13 nm medido em fevereiro de 2022 e de 83,38 nm obtido em medição realizada em julho de 2022. Nessas condições, a formulação lipossomal carregada com 2-AEH<sub>2</sub>F, proporcionou maior estabilidade dimensional em comparação com o DODAC vazio.

Na formulação DODAC com ArC, em três concentrações diferentes, sendo DODAC a 10 mM e o ArC variando de 2, 4 e 8 mM, resultou em diâmetros de 80,55 nm; 79,30 nm e 97,21 nm, respectivamente e o potencial zeta variou de 54,1 mV, 51,9 mV e 40,6 mV, respectivamente.

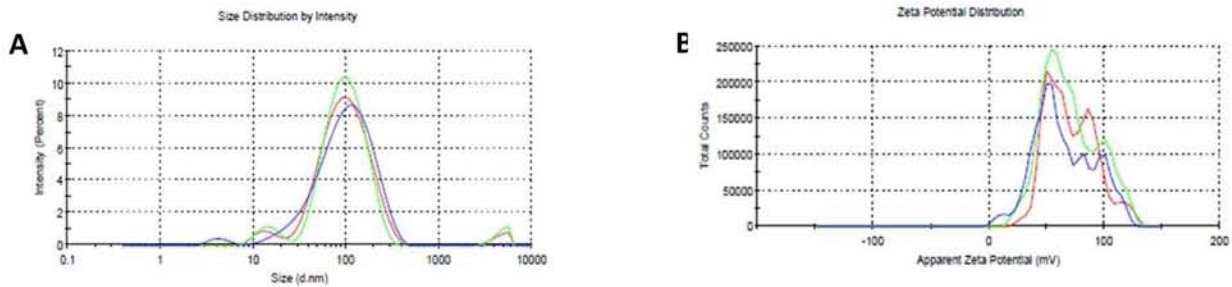
A condutividade dos lipossomas vazios em comparação com os incorporados com o ArC aumentou de 0,00870 para 0,0474 miliSiemens por cm (mS/cm). A condutividade é o inverso da resistência, que neste caso, corrobora com a eficácia do processo de incorporação. A avaliação da eficácia da

incorporação, foi realizada, pela análise da suspensão lipossomal em comparação com a solução de ArC sem lipossomas.

Os resultados tanto para o potencial zeta como para a avaliação dos diâmetros foram obtidos em equipamento de espelhamento de luz dinâmico (DLS) Malvern Panalytical, modelo *Mastersizer 3000*.

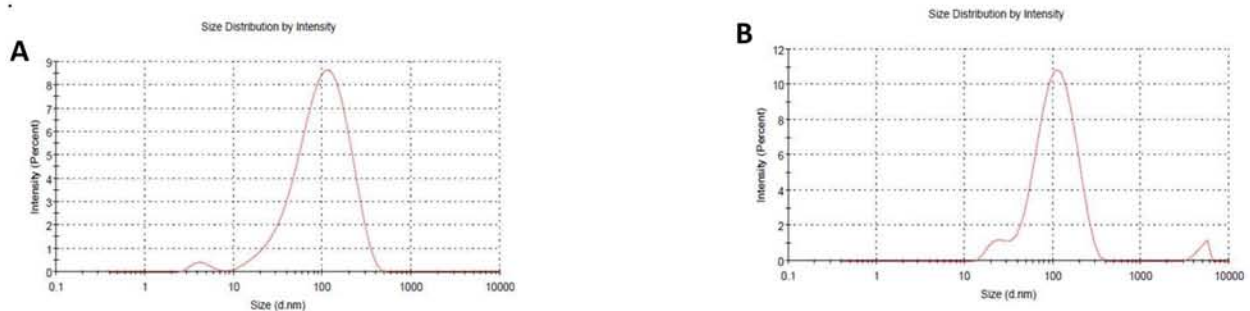
Outra metodologia utilizada para a verificação do processo de incorporação lipossomal, foi por meio da utilização de espectrofotômetro marca Agilent Technologies modelo 8453 UV, onde, foram analisadas amostras em quatro situações diferentes e comparadas com uma solução salina considerada como uma referência neutra. Assim, foi obtida as medições de ArC diluído em etanol na proporção de 16 mg por ml sem a formulação lipossomal. Outra solução, foi obtida através da centrifugação da suspensão contendo lipossomas incorporados com o extrato ArC, a 1000g que passaram por filtro membrana marca Millipore modelo Centricon Plus-20 para utilização em centrífuga, o material filtrado por esse processo foi analisado no espectrofotômetro. Foi analisado também a suspensão de lipossomas vazios a 10 mM e outra solução de lipossomas DODAC/ArC na proporção 10/8 mM, sendo 10mM para o DODAC e 8 mM para ArC. Todas essas soluções foram medidas no espectrofotômetro separadamente e comparadas com a solução salina, posteriormente, as curvas formaram um gráfico único através do programa do equipamento, representado na figura 23.

Análise do potencial zeta e dos diâmetros dos lipossomas por equipamento DLS demonstraram estabilidade



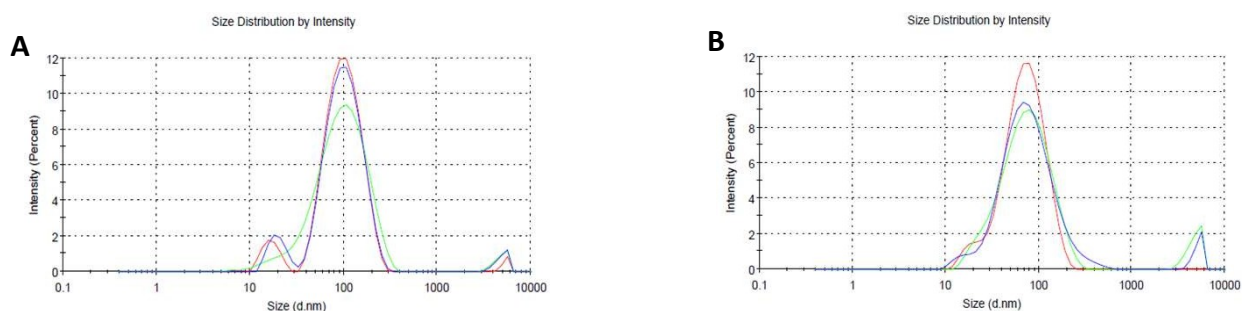
**Figura 14.** Gráficos representativos da avaliação dimensional e do potencial Zeta em lipossomas DODAC/Vazio na concentração de 10mM **A:** Diâmetro médio 74,77 nm; **B:** Potencial Zeta 71,0 mV.

As amostras demonstraram estabilidade estrutural através do período de cinco meses



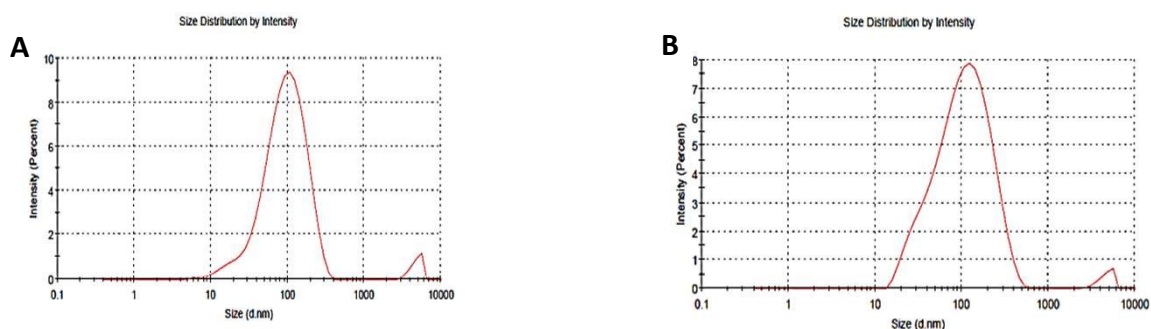
**Figura 15.** Formulação lipossomal DODAC vazio . **A:** diâmetro médio de 75,01 nm em fevereiro de 2022. **B:** diâmetro médio de 91,31 nm em julho de 2022. As amostras utilizadas foram as mesmas armazenadas à temperatura ambiente. Em 3 de fevereiro de 2022 representa a data da confecção dos lipossomas e 14 de julho de 2022 data da última análise. Análises feitas em equipamento marca Malvern Panalytical modelo Mastersizer 3000.

Os diâmetros dos lipossomas carregados com 2AEH<sub>2</sub>F apresentaram diâmetros médios diferentes dependentes das concentrações.



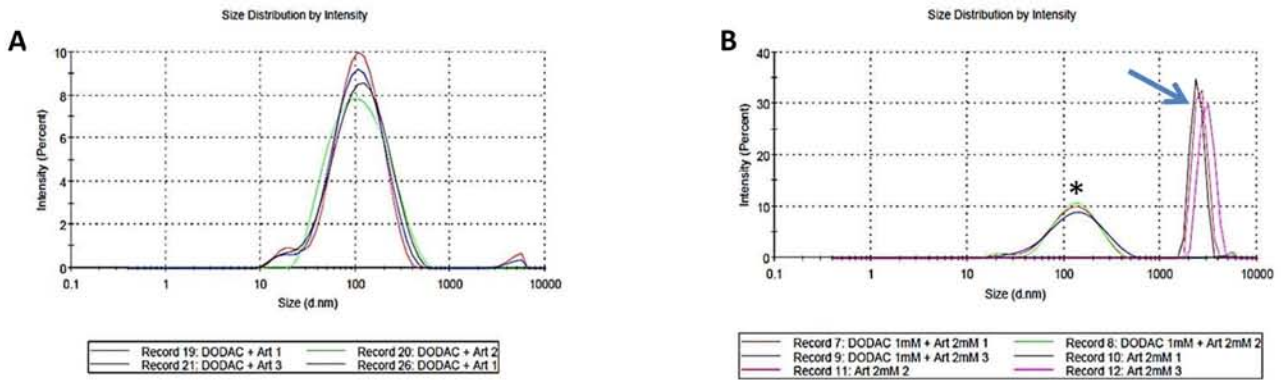
**Figura 16.** Gráficos representativos da avaliação dimensional em lipossomas DODAC/ 2-AEH<sub>2</sub>F na concentração de 10mM **A:** Análise DODAC 10 mM e 2-AEH<sub>2</sub>F 4 mM , diâmetro médio de 80,59nm; **B:** Análise DODAC 4 mM e 2-AEH<sub>2</sub>F a 4 mM, diâmetro médio de 68,51.

Análise da média do diâmetro dos lipossomas DODAC/2AEH<sub>2</sub>F em intervalo de tempo.



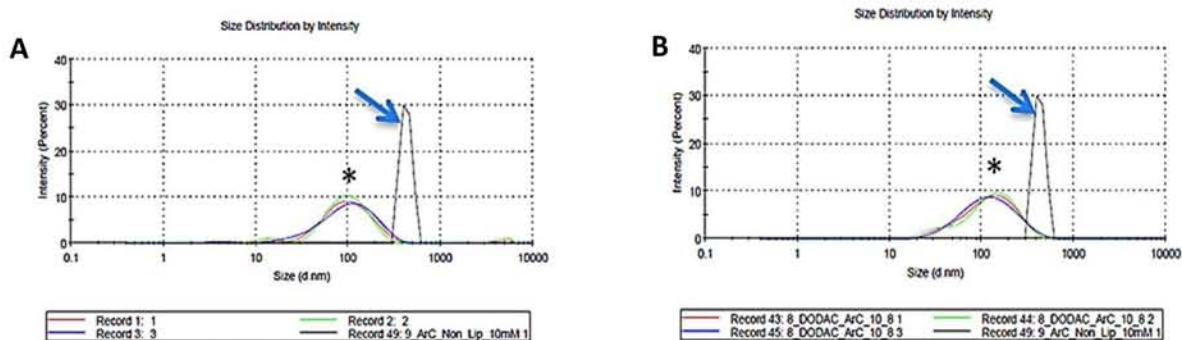
**Figura 17.** Formulação lipossomal carregada com 2AEH<sub>2</sub>F 10/4mM . **A:** diâmetro médio de 80,13 nm em fevereiro de 2022. **B:** diâmetro médio de 83,38 nm em julho de 2022. As amostras utilizadas foram as mesmas armazenadas à temperatura ambiente. Em 3 de fevereiro de 2022 representa a data da confecção dos lipossomas e 14 de julho de 2022 data da última análise. Análises feitas em equipamento marca *Malvern Panalytical* modelo *Mastersizer 3000*.

Diâmetro dos lipossomas carregados com ArC e comparação com a solução livre de lipossomas



**Figura 18** .Análise DODAC 10 mM e ArC 2 mM, em comparação com ArC livre da formulação lipossomal. **A:** Análise DODAC 10 mM e ArC a 2 mM, diâmetro médio 88.68 nm; **B:** DODAC 10 mM e ArC 2 mM (asterisco) pico de intensidade superior a 10 % representa ArC somente diluído (seta), sem a formulação lipossomal demonstrando a efetivação do processo de incorporação do composto aos lipossomas.

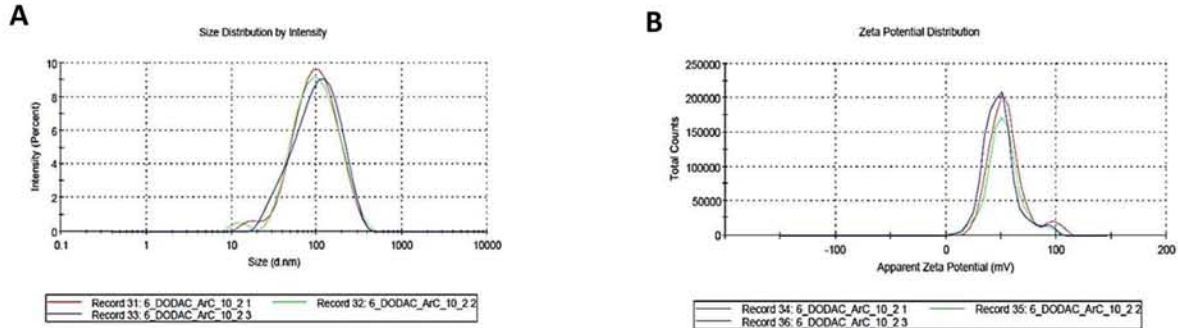
A verificação da incorporação do extrato ArC aos lipossomas por comparação das curvas resultantes das análises revelou diferença entra a solução contendo lipossomas e a solução livre de lipossomas.



**Figura 19.** Gráficos representativos demonstrando a relação entre as curvas obtidas por lipossomas carregados e vazios em comparação ao ArC livre da formulação lipossomal **A:** Lipossomas comparados com a curva gerada da leitura do DODAC vazio (asterisco) em comparação com ArC livre (seta); **B:** Gráfico comparativo entre DOAC carregado com ArC 10/8 mM (asterisco) com ArC livre (seta). Setas representam pico gerado pelo ArC livre. As formulações lipossomais apresentam uma curva de menor intensidade devido à distorção na análise causada pela presença do produto não incorporado ao lipossoma (asterisco) .

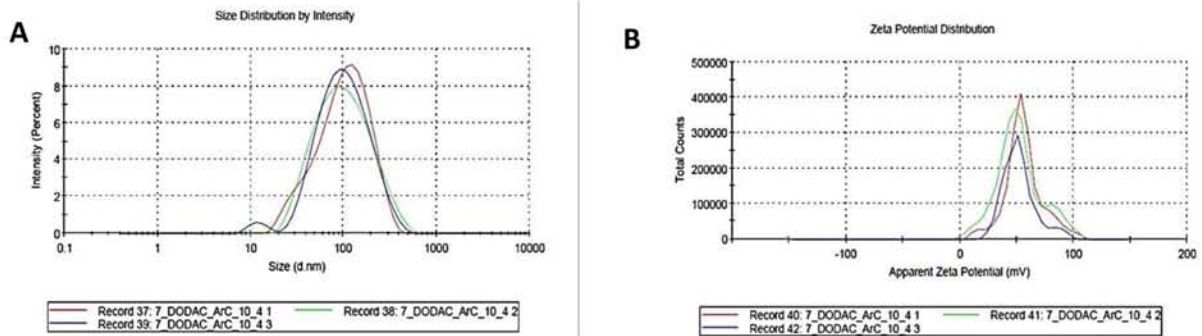


A avaliação dos diâmetros e do potencial Zeta de amostras DODAC/ArC 10/2, sendo a concentração do DODAC 10 mM e ArC 2 mM revelou estabilidade na curva relativa à distribuição do potencial zeta.



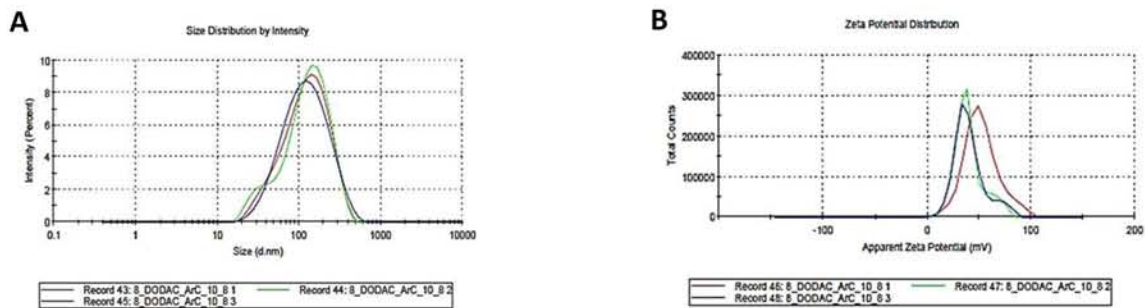
**Figura 20.** Gráficos representativos da avaliação dimensional e do potencial Zeta de lipossomas DODAC/ArC na concentração de 10mM para o DODAC e 2 mM para ArC. **A:** diâmetro médio de 80,55 nm; **B:** potencial zeta 54.1 mV.

A análise de diâmetro e potencial Zeta de amostras DODAC/ArC 10/4 sendo 10 mM para o DODAC e 4 mM para o ArC, revelou estabilidade na curva referente ao potencial zeta.



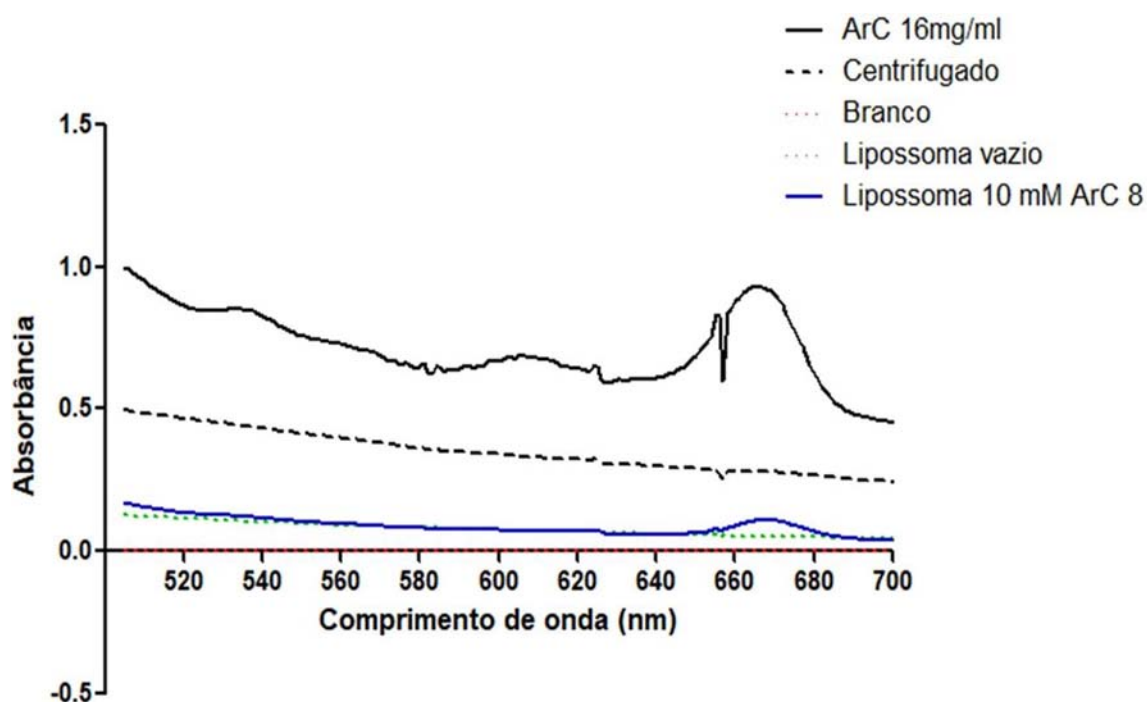
**Figura 21.** Gráficos representativos da avaliação dimensional e do potencial Zeta de lipossomas DODAC/ArC na concentração de 10mM para o DODAC e 4 mM para ArC. **A:** diâmetro médio de 79,30nm; **B:** potencial zeta 51.9 mV.

A análise de diâmetro e potencial Zeta de amostras DODAC/ArC 10/8 sendo 10 mM para o DODAC e 8 mM para o ArC, revelou estabilidade na curva referente ao potencial zeta.



**Figura 22.** Gráficos representativos da avaliação dimensional e do potencial Zeta de lipossomas DODAC/ArC na concentração de 10mM para o DODAC e 8 mM para ArC. **A:** diâmetro médio de 97,21 nm; **B:** potencial zeta 40.6 mV.

Pra avaliação da confirmação do processo de incorporação do extrato ArC aos lipossomas, foram realizadas através de espectrofotômetro, comparando-se soluções obtidas por diferentes processos, como segue: solução com suspensão lipossomal incorporada ao extrato ArC, foi filtrada por filtro próprio para centrifuga, marca Milipore, onde, a solução que passou pelo filtro após a centrifugação foi lida no espectrofotômetro, se houvesse ArC livre presente nessa solução filtrada, a curva da leitura seria semelhante quando comparada com a curva produzida pelo ArC livre; solução de ArC diluído em etanol na proporção 16g/ml, foi lida diretamente; outra solução contendo os lipossomas vazios, foi levada ao espectrofotômetro diretamente; solução de DODAC/ArC na proporção de 10 mM para o DODAC e 8 mM para o ArC foi lida diretamente no espectrofotômetro; outara, uma solução salina foi utilizada como controle. Todas essas soluções tiveram leituras independentes e as curvas dos resultados obtidos, foram comparadas conforme figura 23.



**Figura 23.** Amostras analisadas por espectrofotômetro marca Agilent Technologies modelo 8453 UV. **ArC 16mg/ml:** ArC diluído em etanol na proporção de 16 mg por ml sem a formulação lipossomal. **Centrifugado:** suspensão contendo lipossomas incorporados com o extrato ArC foi centrifugada a 1000g separados por filtro membrana marca Millipore modelo Centricon Plus-20 para utilização em centrifuga, o material filtrado foi analisado no espectrofotômetro.

**Branco:** Solução salina.

**Lipossoma Vazio:** lipossomas sem a incorporação do fármaco.

**Lipossoma 10 mM ArC 8:** Lipossomas incorporados ao ArC na proporção de 10mM para o DODAC e 8 mM para o ArC.

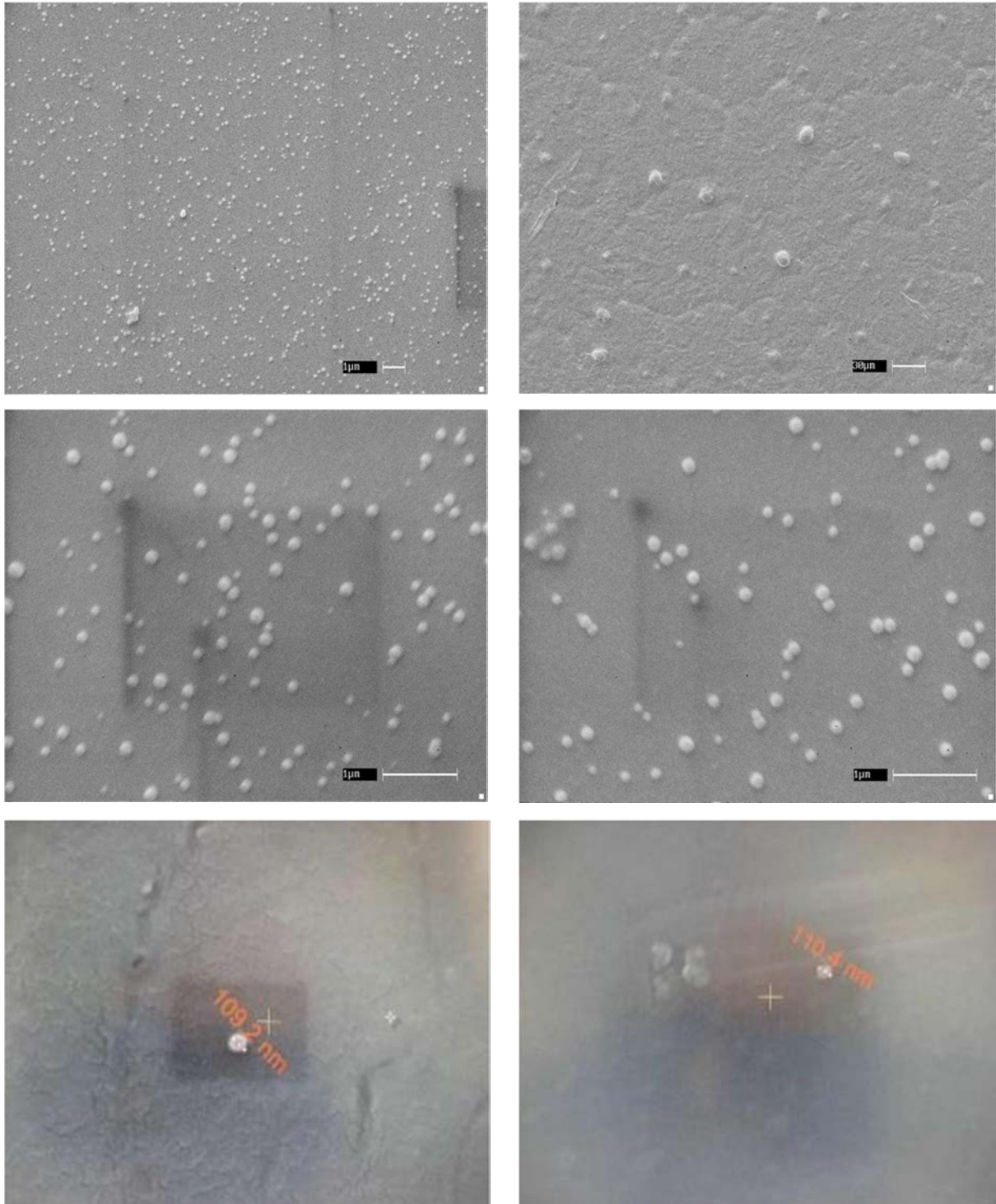
## 5.6. Caracterização morfológica dos lipossomas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Foram obtidas imagens em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Figura 21), com a finalidade verificar a morfologia e estruturação da dispersão das partículas. Esta análise forneceu um importante parâmetro do arranjo dos lipossomas, de forma a contribuir com os resultados obtidos nos ensaios físico-químicos por DLS.

Alterações na carga de superfície lipossomal, poderiam formar aglomerados, onde apareceriam nestas imagens, aderidos entre si e alterariam os resultados obtidos nos ensaios por DLS.

Os lipossomas vazios de DODAC na concentração de 10 mM apresentaram morfologia esférica e polidispersa, sem aglomerados. Os lipossomas carregados com 2AEH<sub>2</sub>F e com ArC apresentaram forma esférica e igualmente sem aglomerações. Nas imagens **E** e **F** foram realizadas medição por metodologia aplicada pelo próprio programa do equipamento LEO 1550 VP FESEM, obtendo-se dessa forma diâmetros de 109,2 nm e 110,4 nm, equivalente aos valores obtidos por DLS.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou lipossomas isolados e sem agregados lipossoamais.



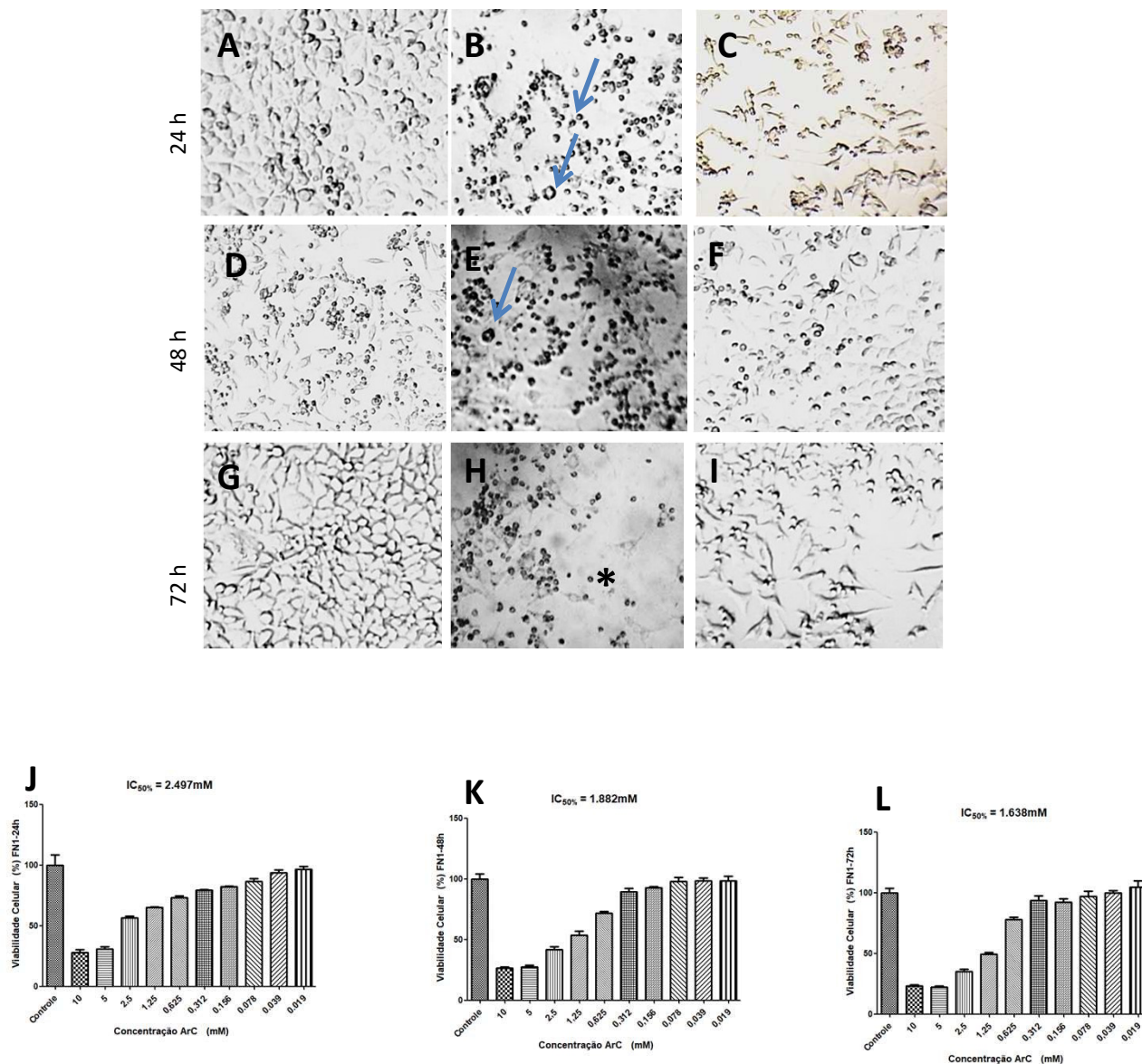
**Figura 24.** A: Lipossomas DODAC (barra 1µm); B: Lipossomas DODAC em maior aumento (barra 30µm); C Lipossomas DODAC /2AEH<sub>2</sub>F(barra 1µm); D Lipossomas DODAC /ArC(barra 1µm); E e F: Imagens com avaliação dimensional obtidas pelo “software” do microscópio. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura LEO 1550 VP FESEM.

### **5.7 Determinação da atividade citotóxica dos compostos pelo método colorimétrico MTT.**

A indução de toxicidade produzida pelos compostos, foi avaliada e fotodocumentada, com utilização de microscópio óptico invertido. As células fibroblastos de origem humana FN1 e de origem murino L929 e as células de melanoma humana SKmel-28 e murino B16F10 foram submetidas aos tratamentos descritos na Tabela 8, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Foram observadas alterações morfológicas, sendo possível observar células com aumento ou retração do volume citoplasmático, fragmentação celular e diminuição da densidade celular na cultura. Nas concentrações mais elevadas, as células apresentam maiores alterações morfológicas, em comparação com as concentrações próximas aos valores de IC50%.

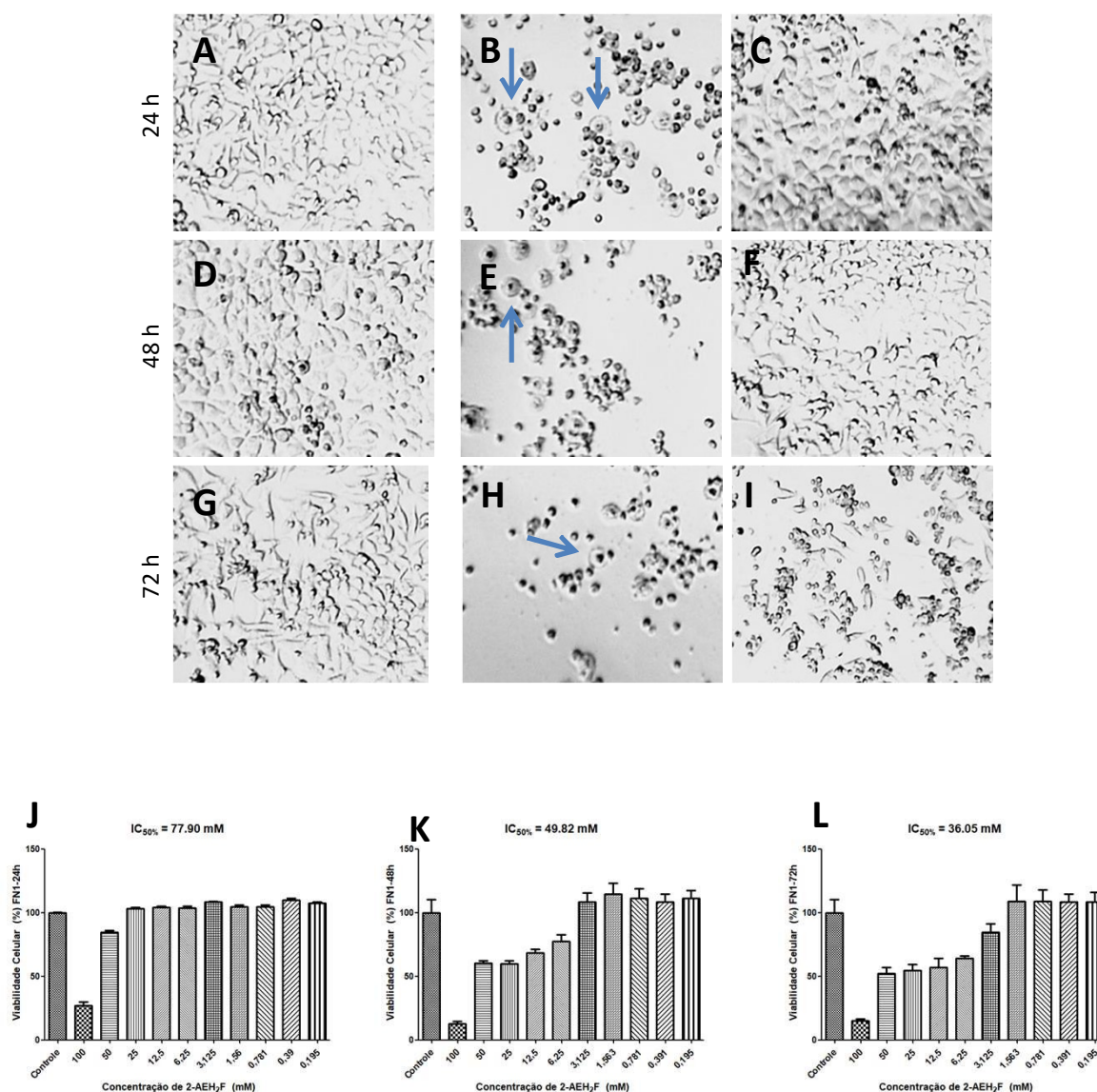
Os resultados de avaliação da viabilidade celular nas células normais FN1 e L929 e tumorais SKmel-28 e B16F10, demonstraram que houve na maioria dos casos um efeito mais protetivo aos fibroblastos do que nas células tumorais, melhor detalhado nos gráficos do estudo estatístico, representados na figuras 41 e 42.

Avaliação da atividade citotóxica em fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com ArC no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC<sub>50%</sub> de 2,497 mM; 1,88 mM e 1,64 mM respectivamente.



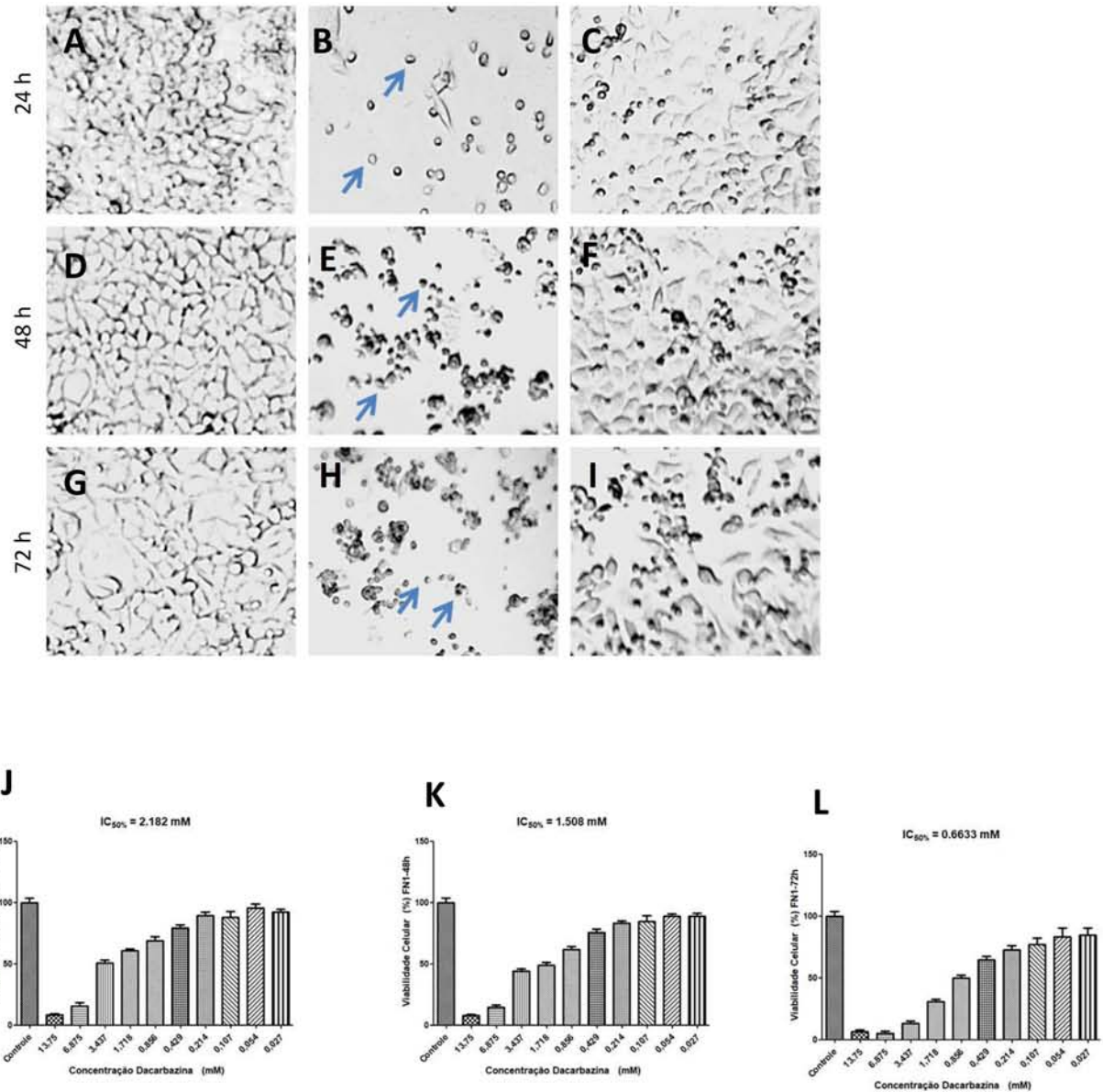
**Fig. 25.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com CS 1640 (ArC) em células fibroblastos normais de origem humana FN1. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 10 mM 24horas, alterações morfológicas (setas); **C:** Concentração 1,25 mM 24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 10 mM 48 horas, alterações morfológicas (setas); **F:** Concentração 1,25 mM 48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 10 mM 72 horas, células aparentando núcleo picnótico (asterisco); **I:** Concentração 1,25 mM 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 2.497 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 1.882 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 1.638 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com 2AEH<sub>2</sub>F no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC<sub>50</sub>% de 77 mM; 49,82 mM e 36,05 mM respectivamente



**Fig. 26** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com 2AEH<sub>2</sub>F em células fibroblastos normais de origem humana FN1. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 100 mM 24 horas; **C:** Concentração 25 mM 24 horas, células apresentando expansão citoplasmática (setas); **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 100 mM 48 horas, células apresentando expansão citoplasmática (setas); **F:** Concentração 25 mM 48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 100 mM 72 horas, células apresentando expansão citoplasmática (setas); **I:** Concentração 25 mM 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 77,90 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 49,82 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 36,5 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média ± DP de três experimentos independentes.

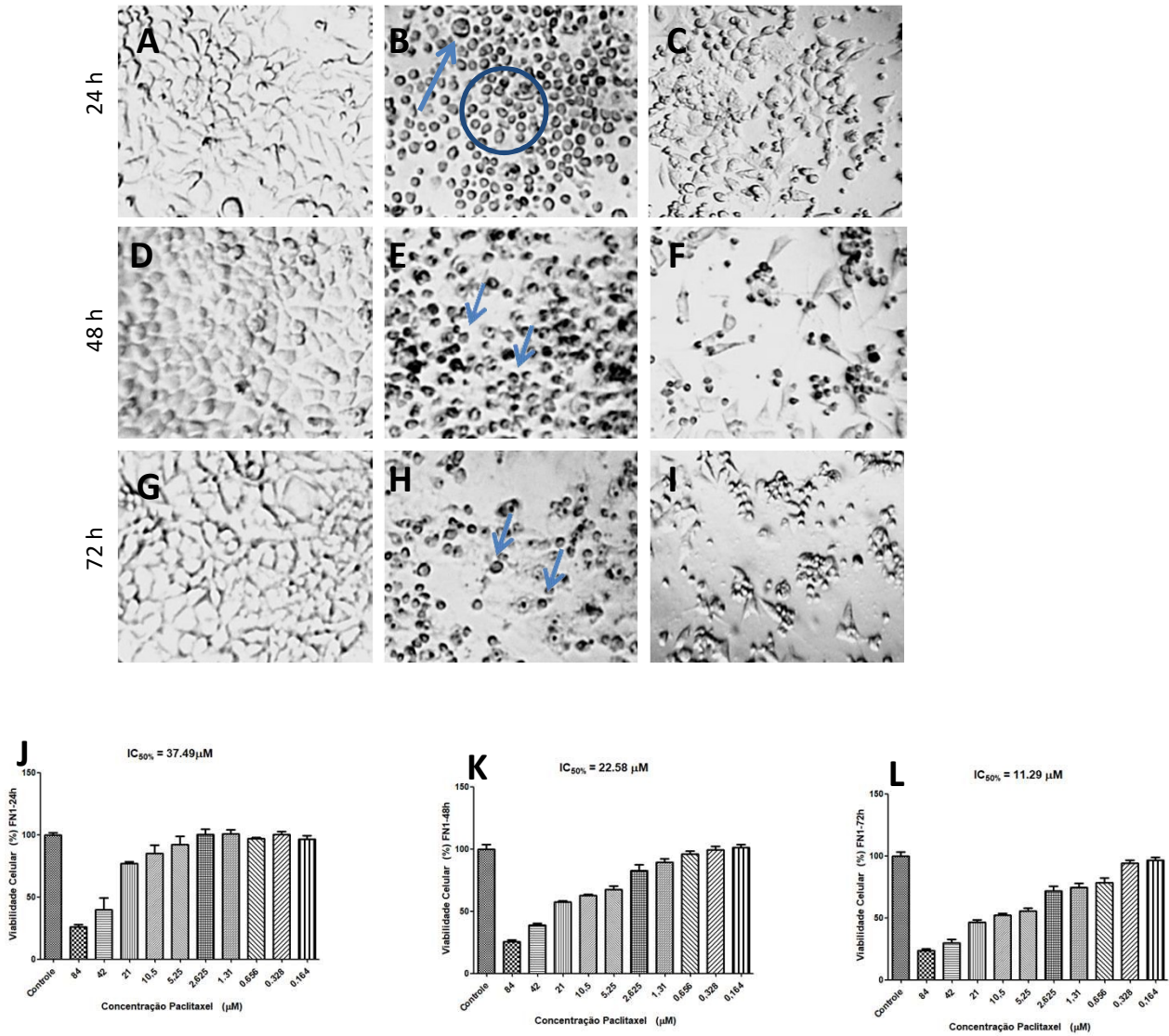
Avaliação da atividade citotóxica em fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com o quimioterápico dacarbazina no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC<sub>50%</sub> de 2,162 mM; 1,5 mM e 0,663 mM respectivamente.



**Fig. 27.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com Dacarbazina em células fibroblastos normais de origem humana FN1. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 13,75 mM 24horas, predomínio de células apresentando retração citoplasmática (setas); **C:** Concentração 1,718 mM 24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 13,75 mM 48 horas, predomínio de células apresentando retração citoplasmática (setas); **F:** Concentração 1,718 mM 48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 13,75 mM 72 horas, predomínio de células apresentando retração citoplasmática (setas); **I:** Concentração 1,718 mM 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 2,182 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 1,508 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 0,6633 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$ DP de três experimentos independentes.

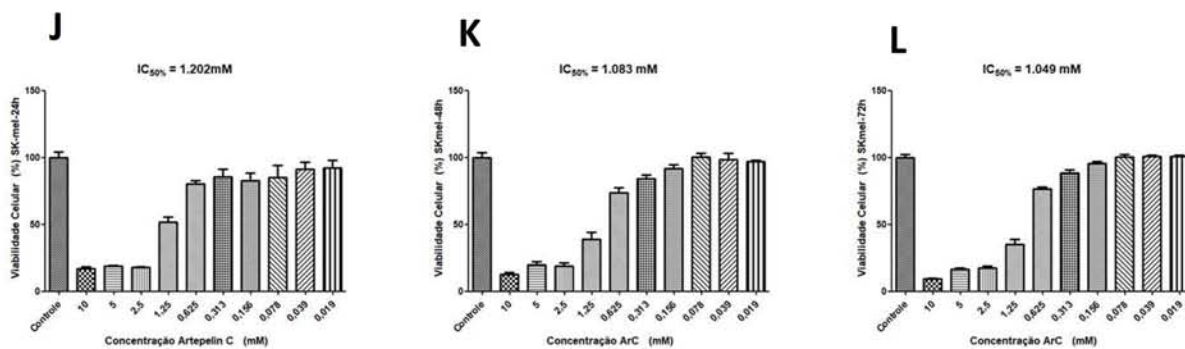
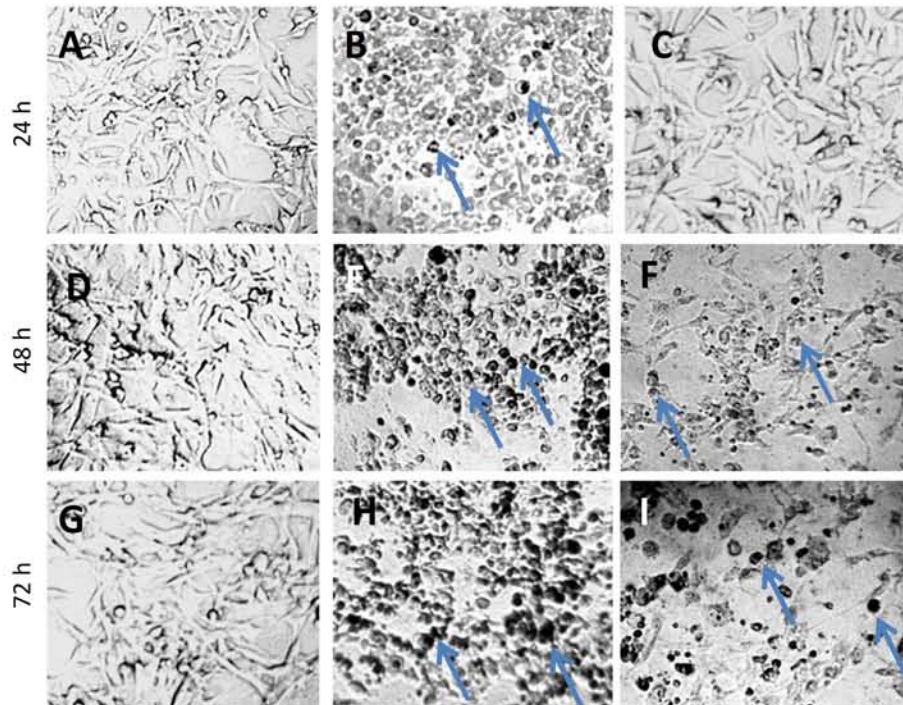


Avaliação da atividade citotóxica em fibroblastos humanos normais FN1 tratadas com o quimioterápico paclitaxel no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC<sub>50%</sub> de 37,49  $\mu$ M; 22,58  $\mu$ M e 11,29  $\mu$ M respectivamente.



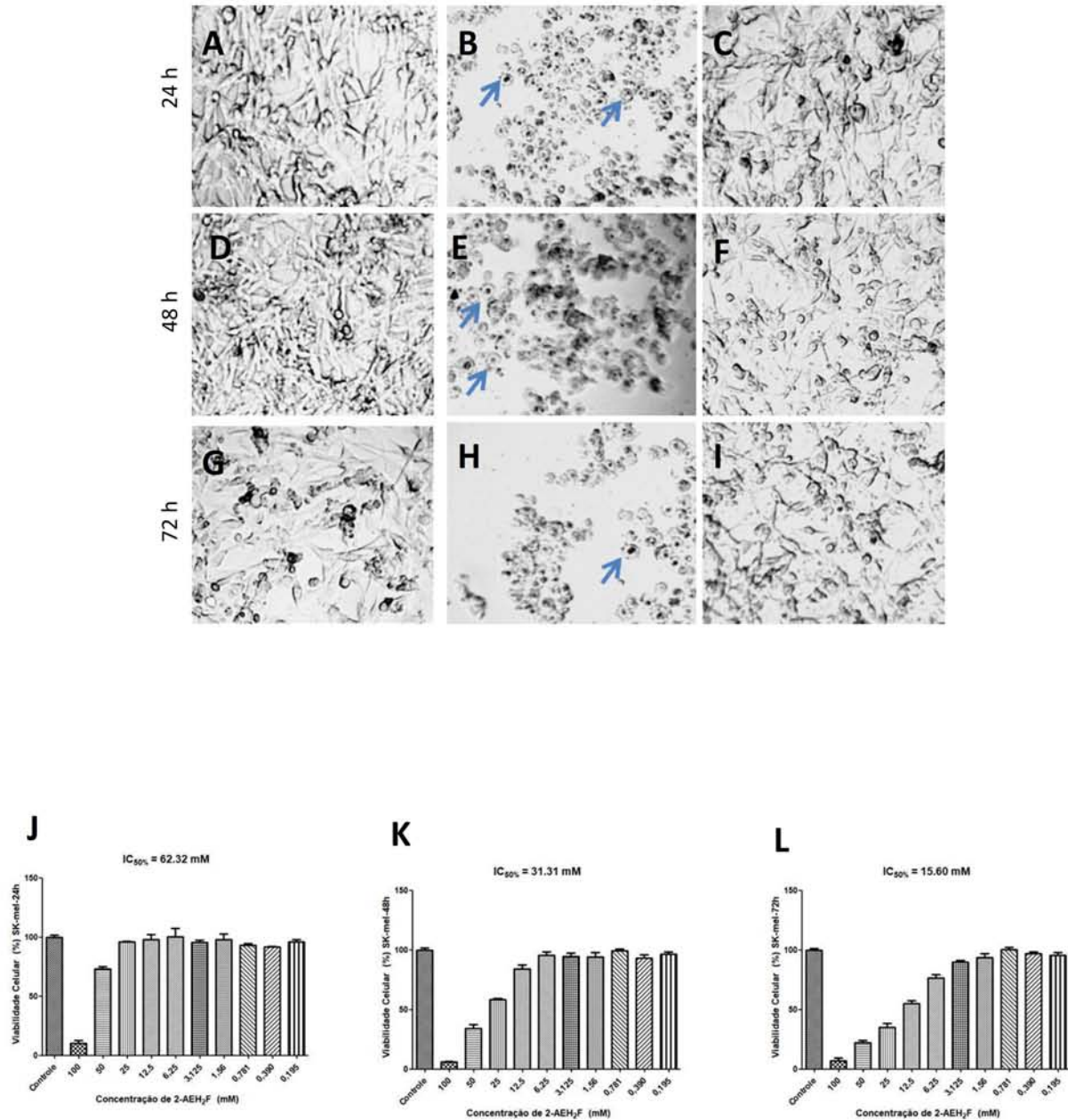
**Fig. 28.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com paclitaxel em células fibroblastos normais de origem humana FN1. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 84  $\mu$ M 24 horas, predomínio de células com retração citoplasmática (círculo), célula com expansão citoplasmática (seta); **C:** Concentração 5,25  $\mu$ M 24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 84  $\mu$ M 48 horas, células apresentando alterações morfológicas (setas); **F:** Concentração 5,25  $\mu$ M 48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 84  $\mu$ M 72 horas, células apresentando alterações morfológicas (setas); **I:** Concentração 5,25  $\mu$ M 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 37,49  $\mu$ M; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 22,58  $\mu$ M; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 11,29  $\mu$ M. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em melanoma humano Skmel-28 tratadas com o extrato ArC no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC50% de 1,2 mM; 1,08 mM e 1,05 mM respectivamente.



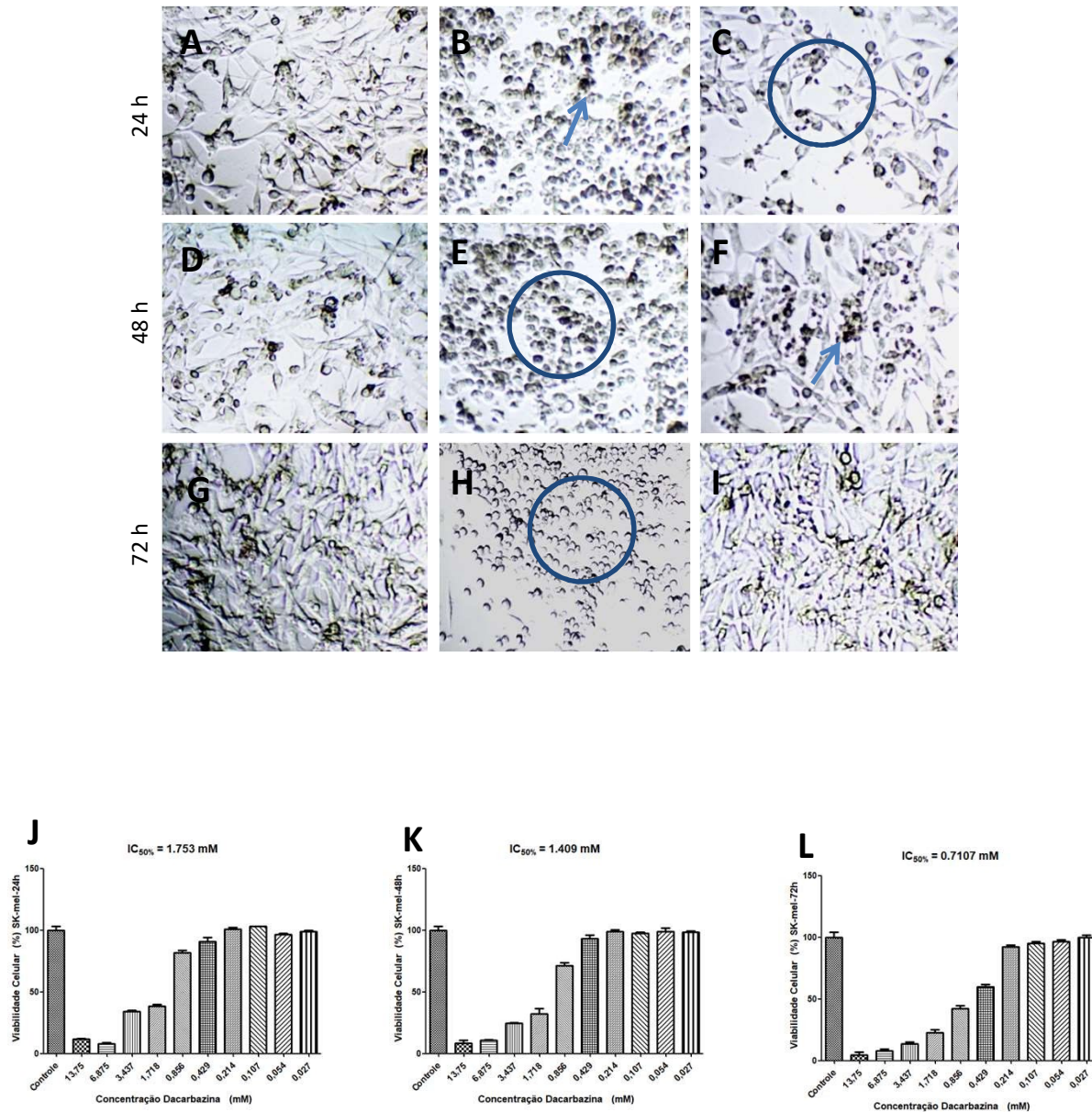
**Fig. 29.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com CS 1640 (ArC) em células de melanoma humano SKmel-28. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 10 mM 24 horas, células apresentando morfologia e condensação cromática alteradas (setas); **C:** Concentração 1,25 mM 24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 10 mM 48 horas, células apresentando morfologia e condensação cromática alteradas (setas); **F:** Concentração 1,25 mM 48 horas, células apresentando morfologia e condensação cromática alteradas (setas); **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 10 mM 72 horas, células apresentando morfologia e condensação cromática alteradas (setas); **I:** Concentração 1,25 mM 72 horas, células apresentando morfologia e condensação cromática alteradas (setas); **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 1,202 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 1,083 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 1,049 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em melanoma humano Skmel-28 tratadas com 2AEH<sub>2</sub>F no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC<sub>50</sub>% de 62,32 mM; 31,31 mM e 15,6 mM respectivamente.



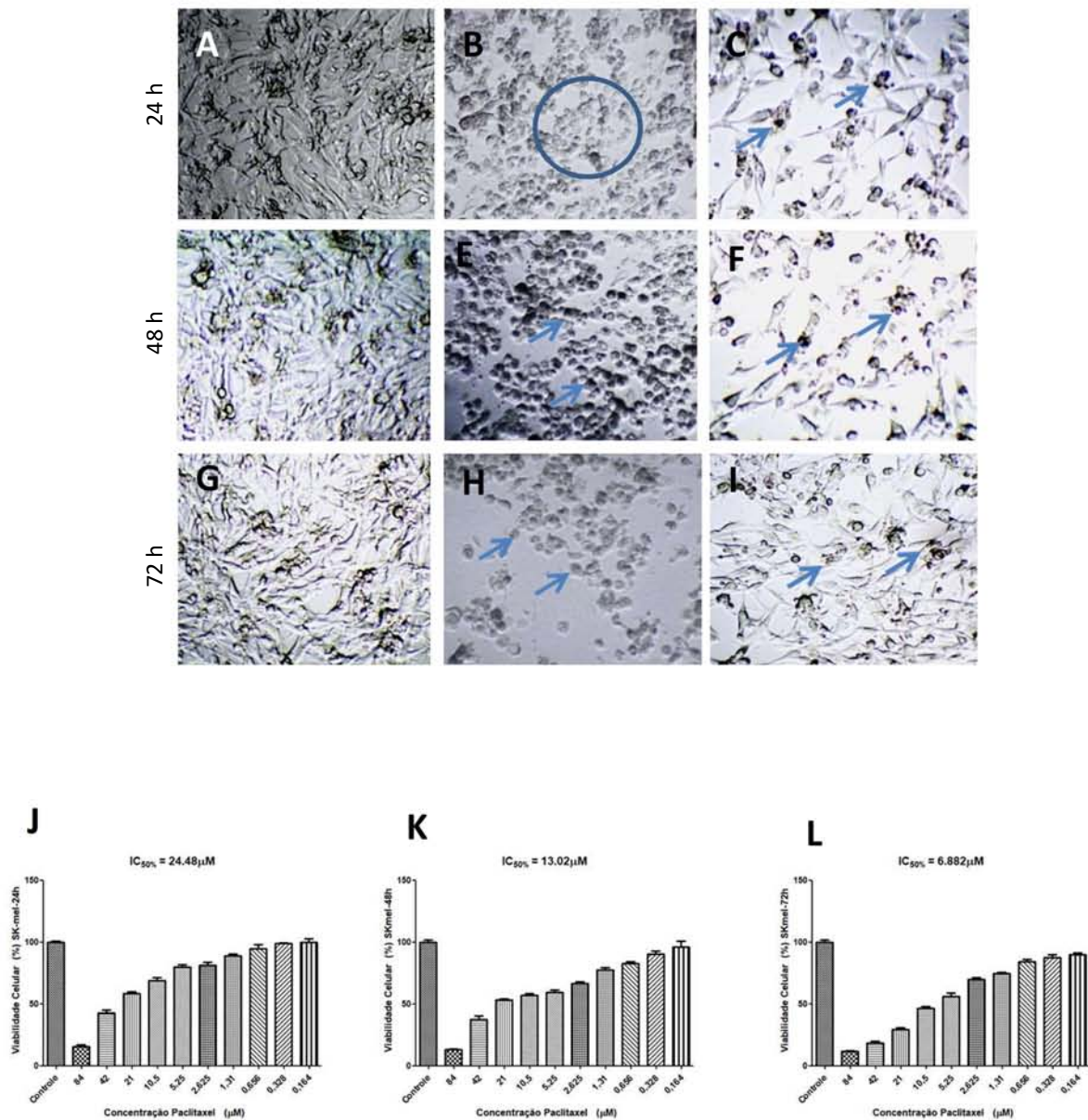
**Fig. 30.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com 2AEH<sub>2</sub>F em células de melanoma humano SKmel-28. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 100 mM 24horas, células com expansão citoplasmática (setas); **C:** Concentração 25 mM 24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 100 mM 48 horas, células com expansão citoplasmática (setas); **F:** Concentração 25 mM 48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 100 mM 72 horas, célula com expansão citoplasmática (seta); **I:** Concentração 25 mM 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 62,32 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 31,31 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 15,6 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em melanoma humano Skmel-28 tratadas com o quimioterápico dacarbazina no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC50% de 1,75 mM; 1,41 mM e 0,71 mM respectivamente.



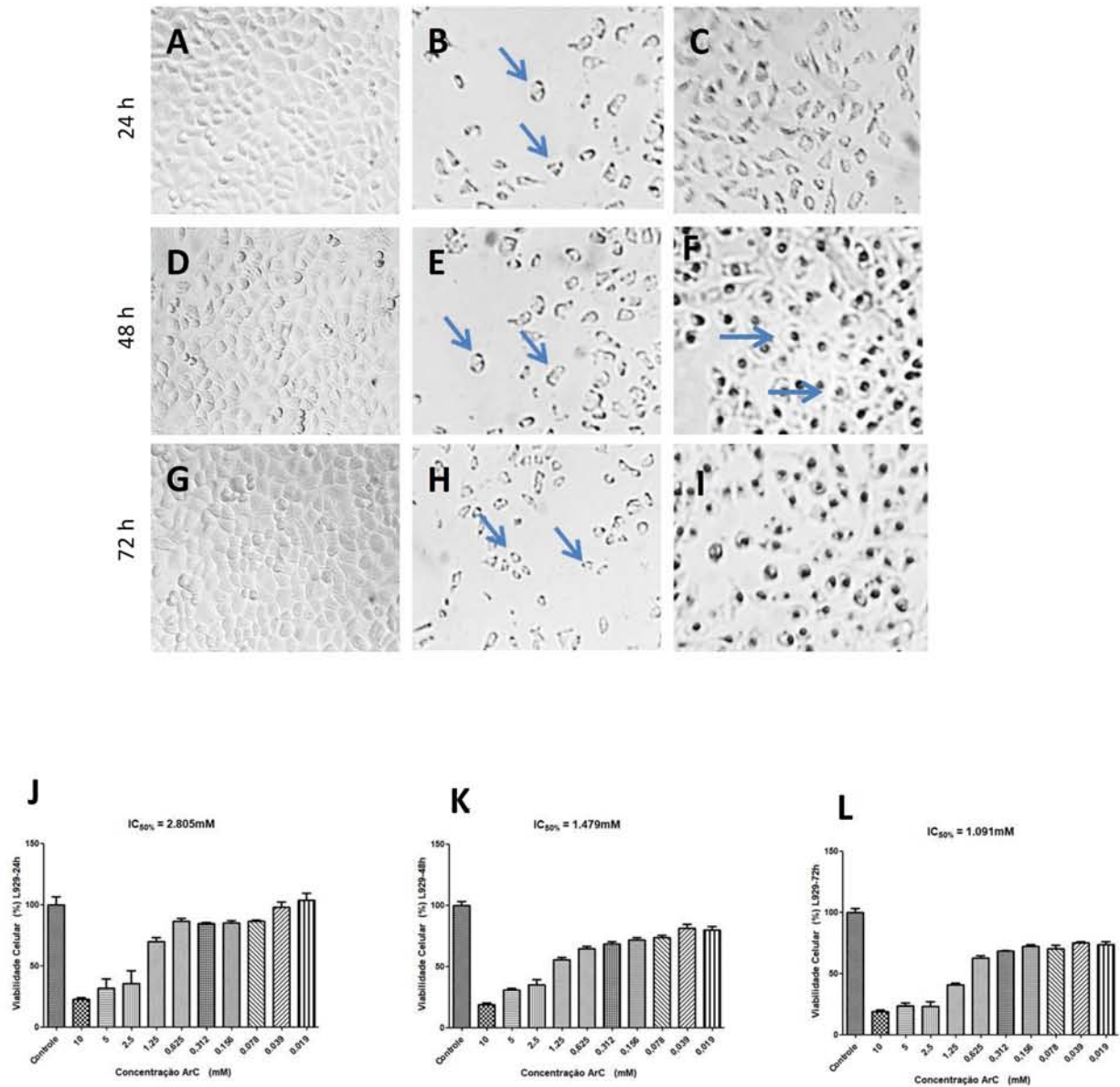
**Fig. 31.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com dacarbazina em células de melanoma humano SKmel-28. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 13,75 mM 24 horas, típica célula apresentando alteração morfológica (seta); **C:** Concentração 1,718 mM 24 horas, algumas células voltando à morfologia inicial, porém, em baixa concentração celular (círculo); **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 13,75 mM 48 horas, grupo de células aparentando alterações morfológicas (círculo); **F:** Concentração 1,718 mM 48 horas, célula apresentando elevada condensação cromática (seta); **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 13,75 mM 72 horas, células apresentando alterações morfológicas (círculo); **I:** Concentração 1,718 mM 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 1,753 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 1,409 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 0,7107 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em melanoma humano Skmel-28 tratadas com o quimioterápico paclitaxel no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC<sub>50%</sub> de 24,48  $\mu$ M; 13,02  $\mu$ M e 6,88  $\mu$ M respectivamente.



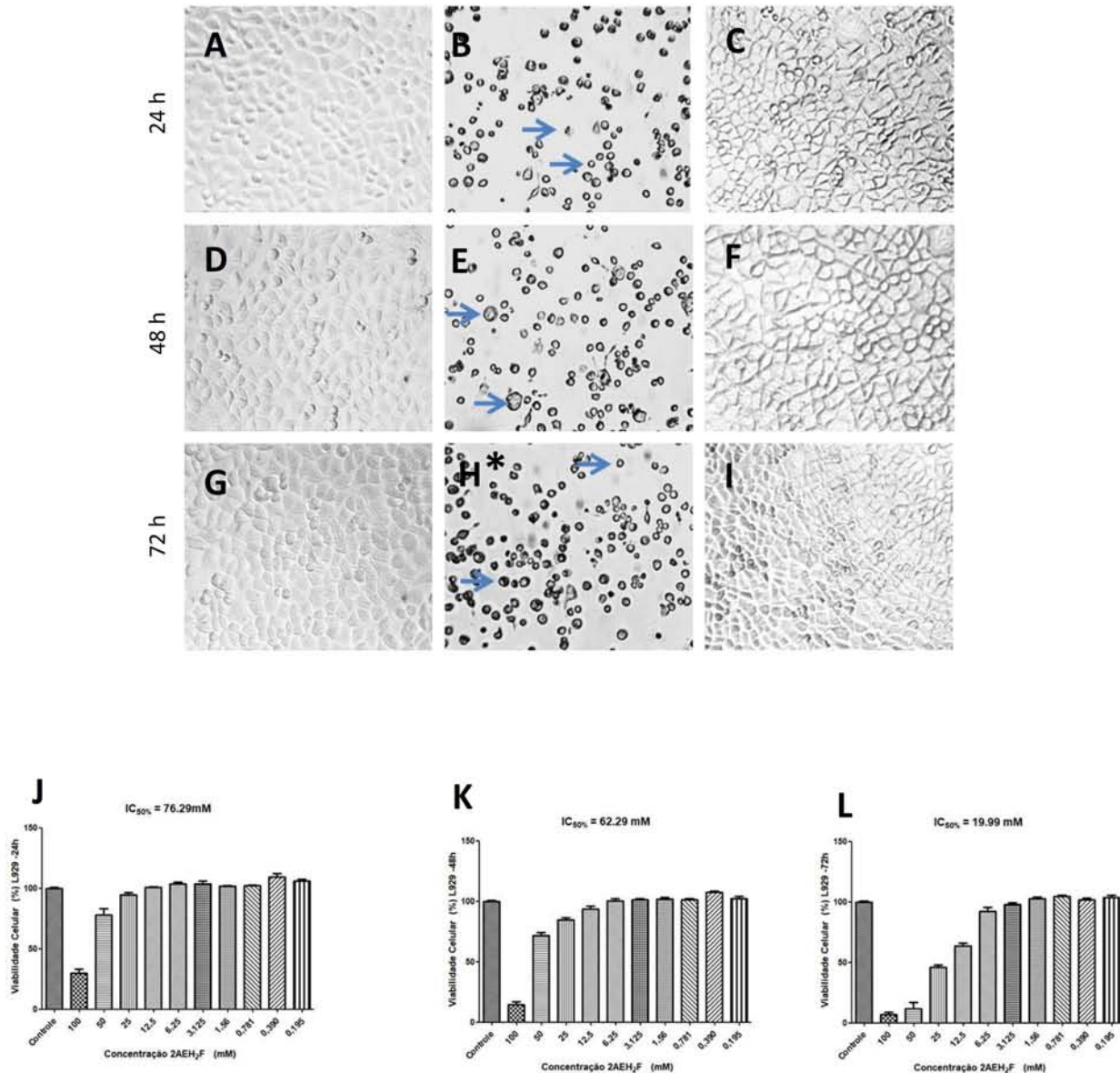
**Fig. 32.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com paclitaxel em células de melanoma humano SKmel-28. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 84  $\mu$ M 24 horas, característica das células apresentando alterações morfológicas (círculo); **C:** Concentração 5,25  $\mu$ M 24 horas, presença de células alteradas (setas); **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 84  $\mu$ M 48 horas, células demonstrando alterações morfológicas (setas); **F:** Concentração 5,25  $\mu$ M 48 horas, presença de células alteradas (setas); **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 84  $\mu$ M 72 horas, característica das células apresentando perda do contraste ou contorno do núcleo difuso (setas); **I:** Concentração 5,25  $\mu$ M 72 horas, presença de células alteradas (setas); **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC<sub>50%</sub> de 24,48  $\mu$ M; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC<sub>50%</sub> de 13,02  $\mu$ M; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC<sub>50%</sub> de 6,882  $\mu$ M. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em fibroblastos normais murino L929 tratados com o extrato ArC no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC50% de 2,80 mM; 1,48 mM e 1,10 mM respectivamente.



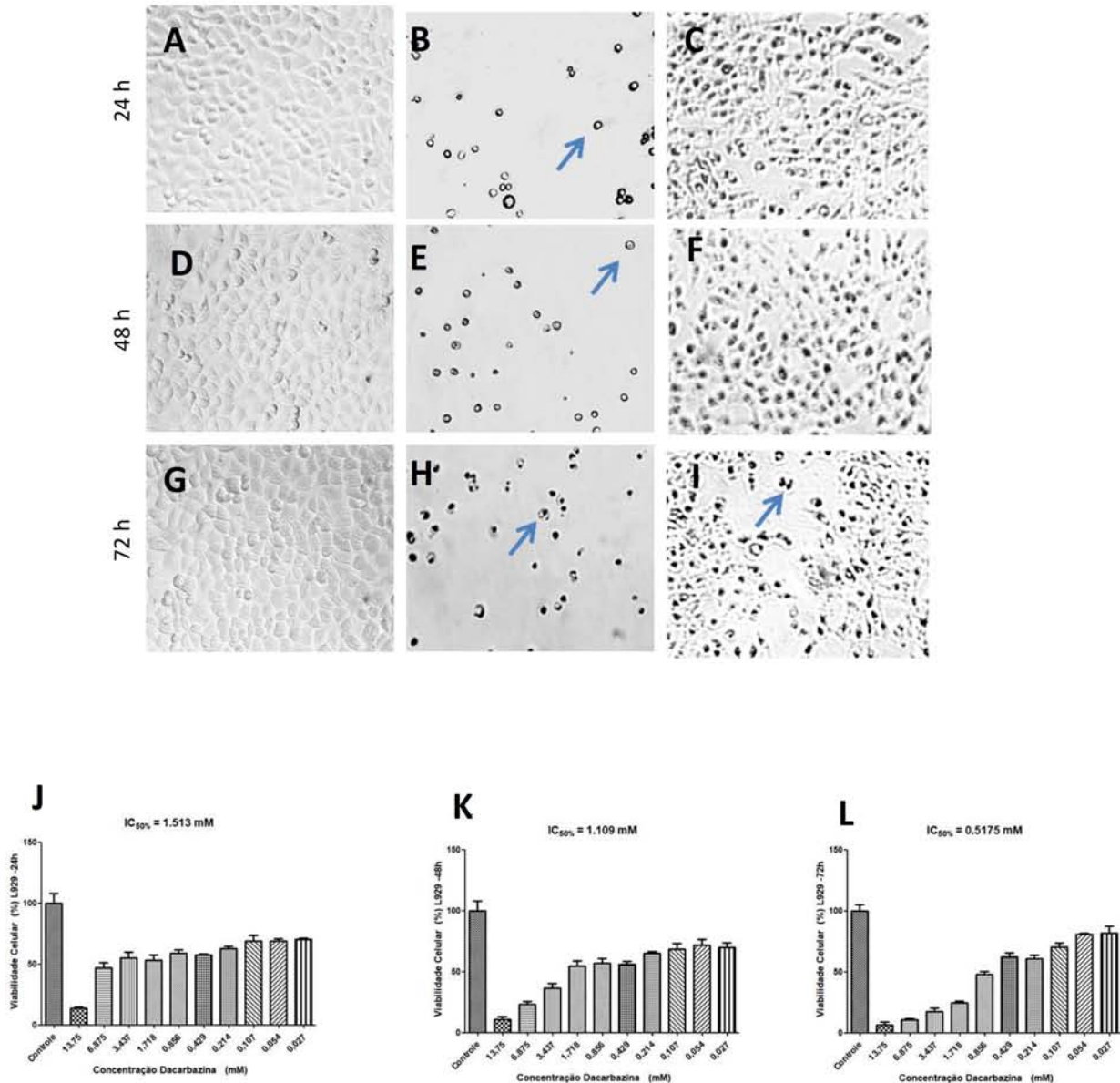
**Fig. 33.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com CS 1640 (ArC) em células fibroblastos normais murino L929. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 10 mM 24 horas, células apresentando alterações morfológicas (setas); **C:** Concentração 1,25 mM 24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 10 mM 48 horas, células apresentando alterações morfológicas (setas); **F:** Concentração 1,25 mM 48 horas, células apresentando expansão citoplasmática (setas); **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 10 mM 72 horas, células apresentando alterações morfológicas (setas); **I:** Concentração 1,25 mM 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 2.805 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 1.479 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 1,091 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em fibroblastos normais murino L929 tratados com 2AEH<sub>2</sub>F no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC<sub>50</sub>% de 76,30 mM; 62,29 mM e 19,99 mM respectivamente.



**Fig. 34.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com 2AEH<sub>2</sub>F em células fibroblastos normais murino L929. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 100 mM 24horas, células apresentando alterações morfológicas (setas); **C:** Concentração 25 mM 24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 100 mM 48 horas, células apresentando alterações morfológicas (setas); **F:** Concentração 25 mM 48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 100 mM 72 horas, células apresentando alterações morfológicas (setas); **I:** Concentração 25 mM 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 76,29 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 62,29 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 19,99 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média ± DP de três experimentos independentes.

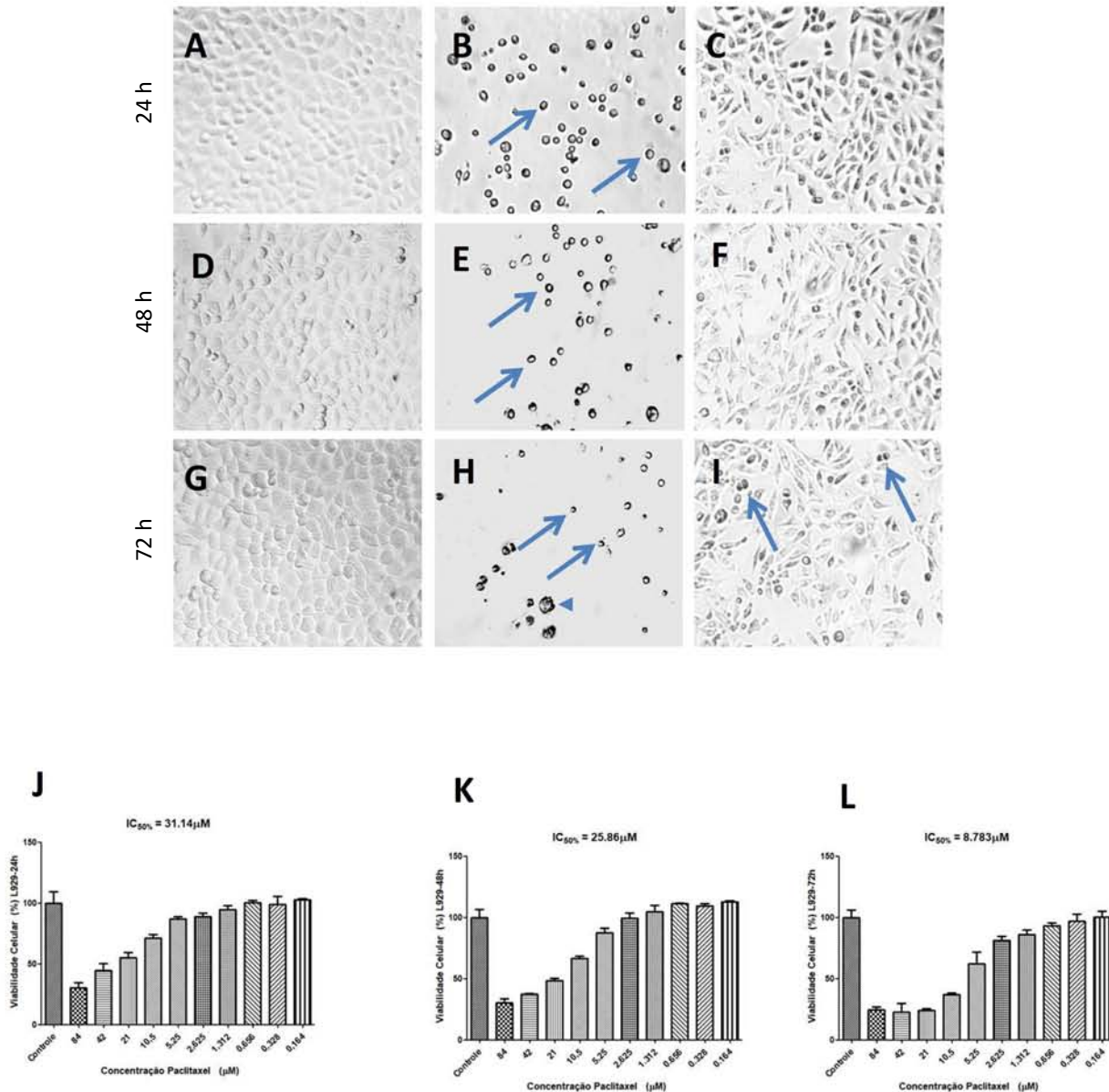
Avaliação da atividade citotóxica em fibroblastos normais murino L929 tratados com o quimioterápico dacarbazina no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC50% de 1,51 mM; 1,11 mM e 0,52 mM respectivamente.



**Fig. 35.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com dacarbazina em células fibroblastos normais de origem humana FN1. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 13,75 mM 24 horas, células apresentando características alteradas, contração citoplasmática (seta); **C:** Concentração 1,718 mM 24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 13,75 mM 48 horas, células apresentando características alteradas, contração citoplasmática (seta); **F:** Concentração 1,718 mM 48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 13,75 mM 72 horas, célula apresentando expansão citoplasmática (seta); **I:** Concentração 1,718 mM 72 horas, aparente célula em divisão, porém, com morfologia alterada, não retratando uma divisão normal (seta); **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 1,513 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 1,109 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 0,5175 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$ DP de três experimentos independentes.

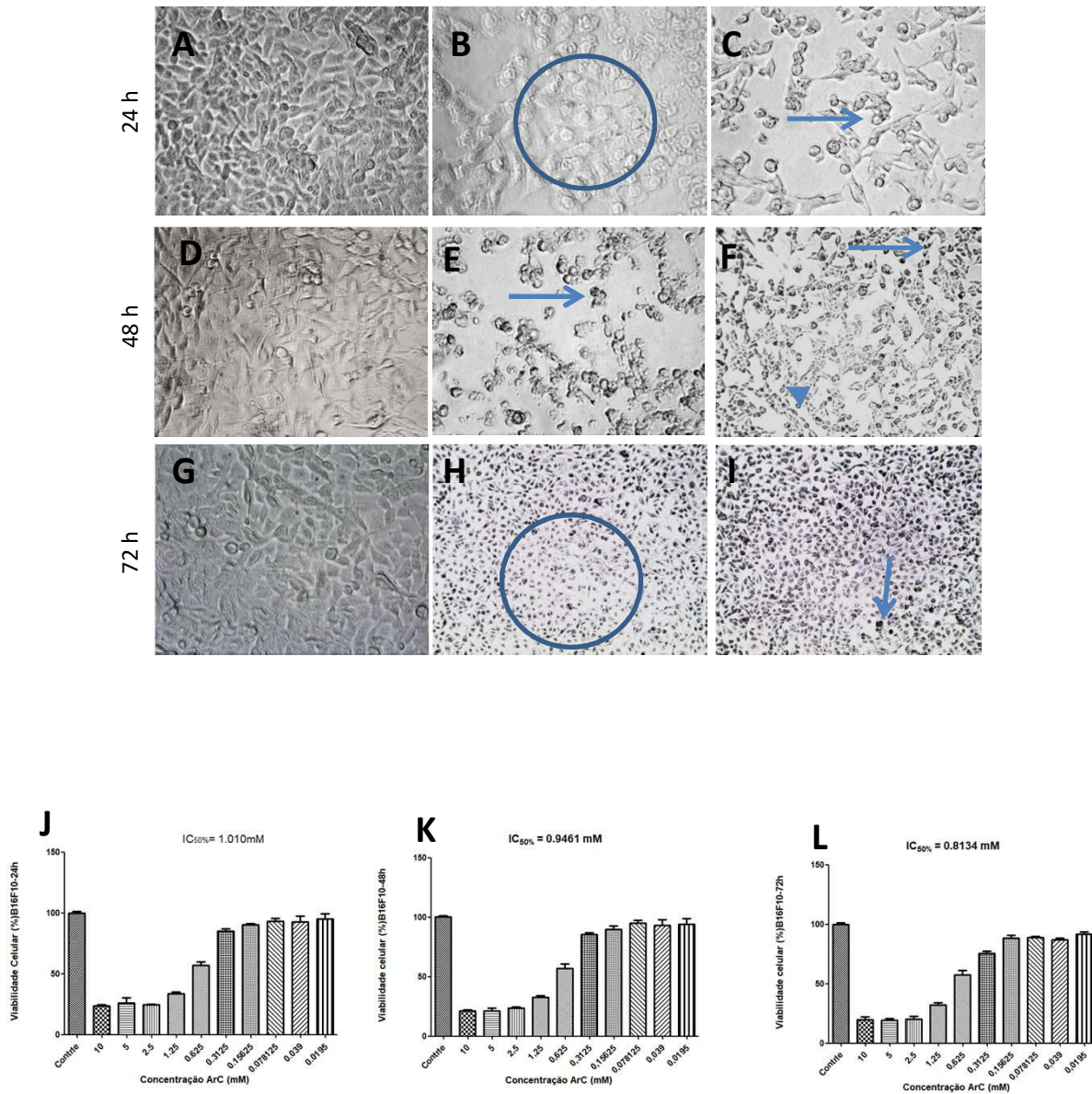


Avaliação da atividade citotóxica em fibroblastos normais murino L929 tratados com o quimioterápico paclitaxel no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC50% de 31,14  $\mu\text{M}$ ; 25,86  $\mu\text{M}$  e 8,78  $\mu\text{M}$  respectivamente.



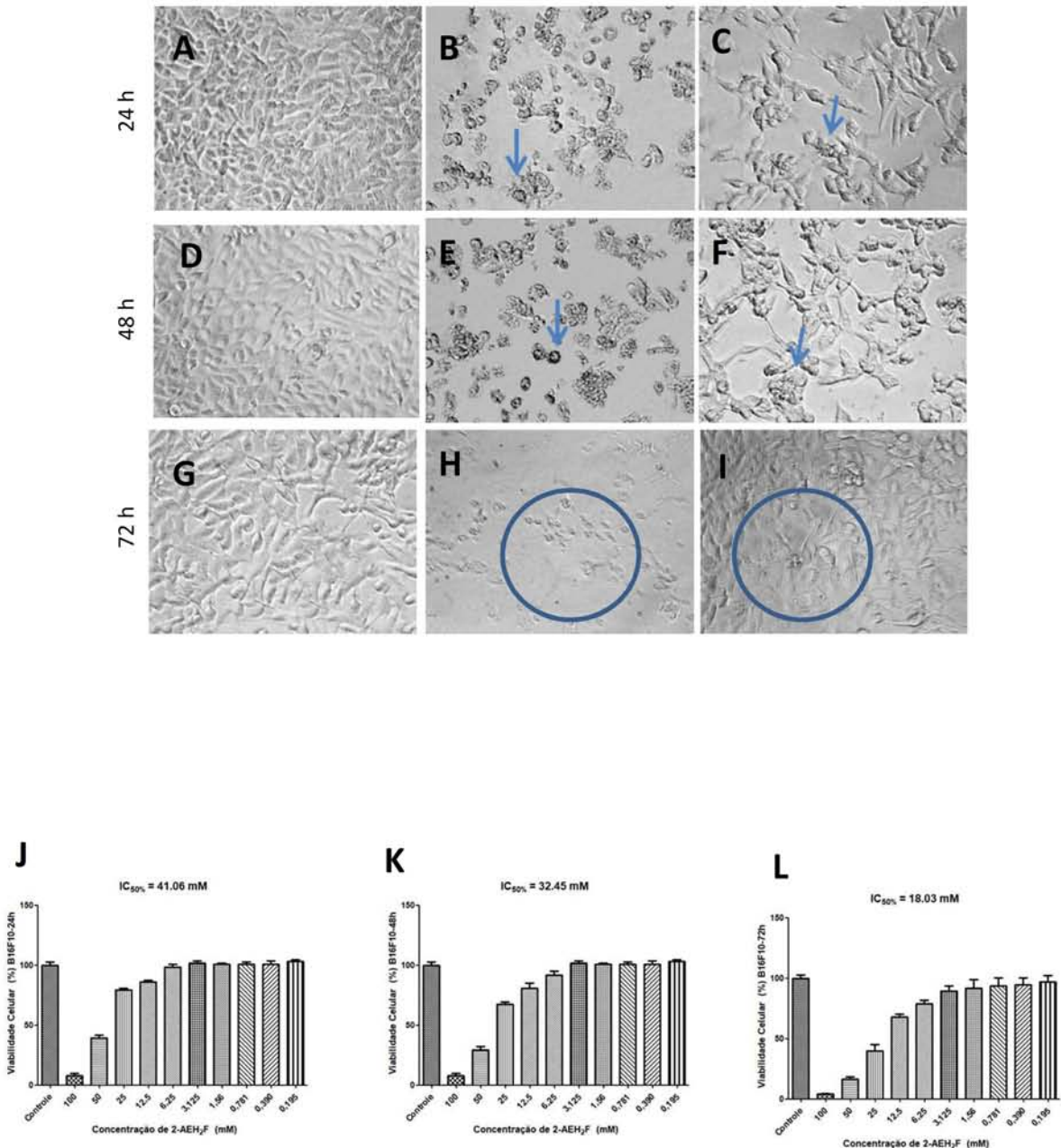
**Fig. 36.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com Paclitaxel em células fibroblastos normais murino L929. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 84  $\mu\text{M}$  24horas, células aparentando núcleo picnótico (setas); **C:** Concentração 5,25  $\mu\text{M}$  24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 84  $\mu\text{M}$  48 horas, células aparentando núcleo picnótico (setas); **F:** Concentração 5,25  $\mu\text{M}$  48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 84  $\mu\text{M}$  72 horas, células aparentando núcleo picnótico (setas), célula demonstrando condensação citoplasmática anormal (cabeça de seta); **I:** Concentração 5,25  $\mu\text{M}$  72 horas, provavelmente células em divisão, porém, em ambiente de baixa concentração celular (setas); **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 31,13  $\mu\text{M}$ ; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 25,86  $\mu\text{M}$ ; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 8,783  $\mu\text{M}$ . Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em células de melanoma murino B16F10 tratadas com o extrato ArC no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC50% de 1,01 mM; 0,95 mM e 0,81 mM respectivamente.



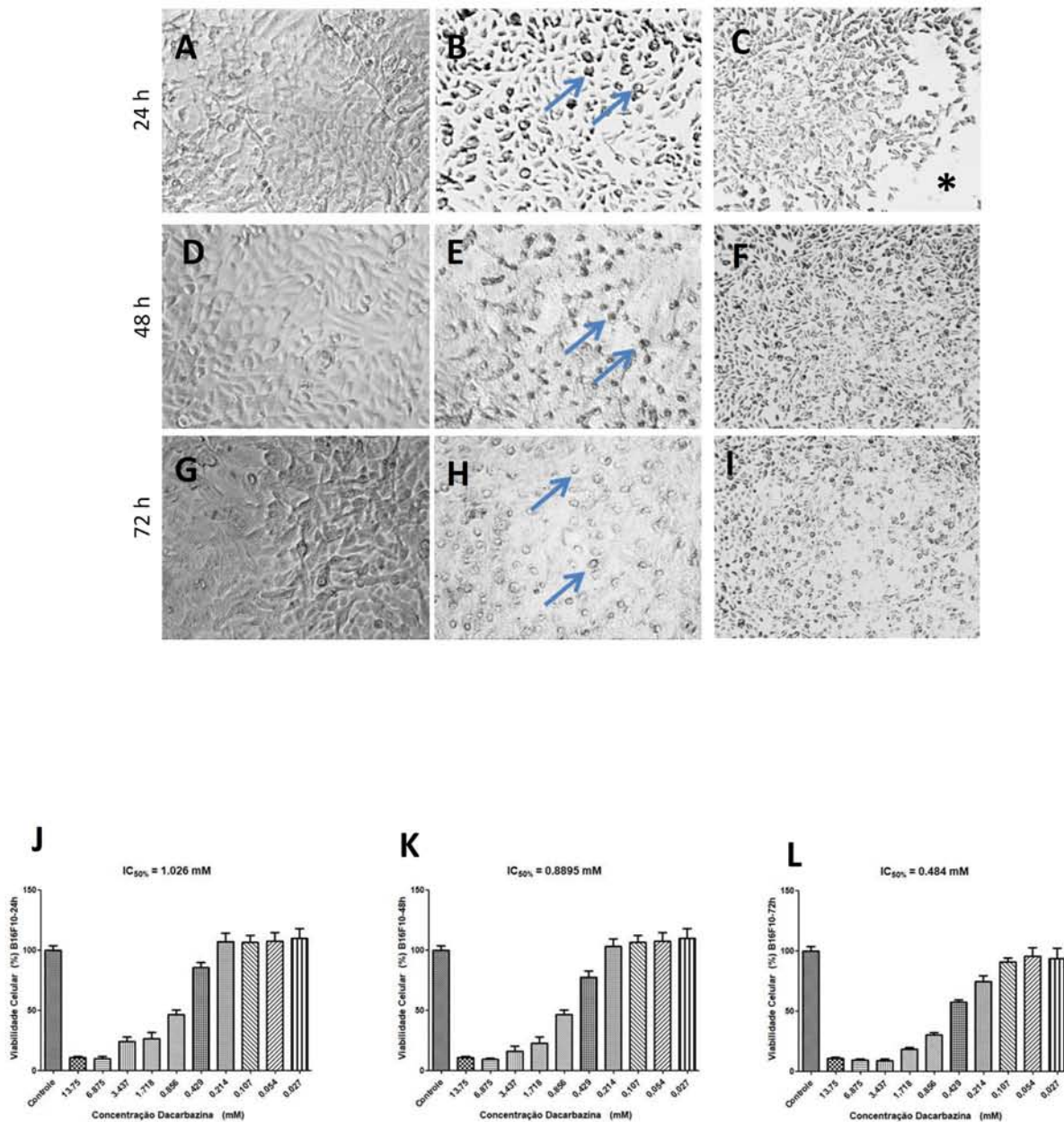
**Fig. 37.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com CS 1640 (ArC) em células de melanoma murino B16F10. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 10 mM 24 horas, características das células afetadas pelo tratamento (círculo); **C:** Concentração 1,25 mM 24 horas, célula apresentando alteração morfológica (seta); **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 10 mM 48 horas, alteração morfológica celular (seta); **F:** Concentração 1,25 mM 48 horas, célula apresentando alterações morfológicas (cabeça de seta), provável célula divisão (seta); **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 10 mM 72 horas, células apresentando retração citoplasmática (círculo); **I:** Concentração 1,25 mM 72 horas, células apresentando retração citoplasmática, célula com condensação cromática (seta); **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 1,010 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 0,9461 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 0,8134 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em células de melanoma murino B16F10 tratadas com 2AEH<sub>2</sub>F no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC<sub>50</sub>% de 41,06 mM; 32,45 mM e 18,03 mM respectivamente.



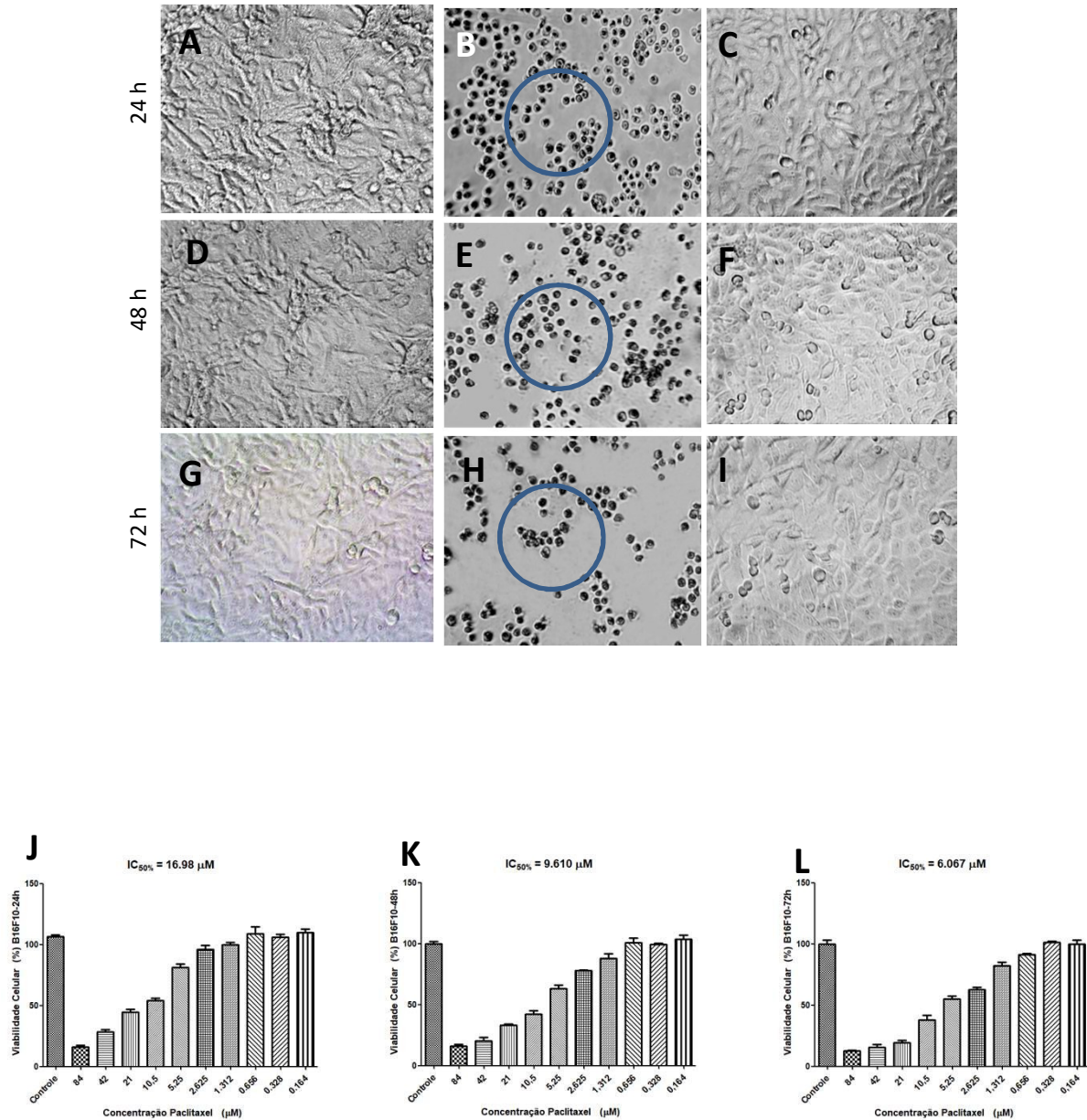
**Figura 38.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com 2AEH<sub>2</sub>F em células de melanoma murino B16F10. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 100 mM 24 horas, alteração morfológica celular (seta); **C:** Concentração 25 mM 24 horas, aglomerado celular amorfo (seta); **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 100 mM 48 horas, alteração morfológica celular (seta); **F:** Concentração 25 mM 48 horas, aglomerado celular amorfo (seta); **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 100 mM 72 horas, baixa concentração celular (círculo); **I:** Concentração 25 mM 72 horas, crescimento celular sem definições dos contornos citoplasmáticos (círculo); **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 41,06 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 32,45 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 18,03 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Avaliação da atividade citotóxica em células de melanoma murino B16F10 tratadas com o quimioteráico dacarbazina no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC50% de 1,03 mM; 0,89 mM e 0,48 mM respectivamente.



**Fig. 39.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com dacarbazina em células de melanoma murino B16F10. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 13,75 mM 24 horas, alterações morfológicas nas células (setas); **C:** Concentração 1,718 mM 24 horas, cultura com baixa confluência (asterisco); **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 13,75 mM 48 horas, alterações morfológicas padrão nas células (setas); **F:** Concentração 1,718 mM 48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 13,75 mM 72 horas, alterações morfológicas padrão nas células (setas); **I:** Concentração 1,718 mM 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 1,026 mM; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 0,8895 mM; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 0,484 mM. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$  DP de três experimentos

Avaliação da atividade citotóxica em células de melanoma murino B16F10 tratadas com o quimioterápico paclitaxel no período de 24, 48 e 72 horas, produzindo valores de IC<sub>50</sub>% de 16,98  $\mu$ M; 9,61  $\mu$ M e 6,09  $\mu$ M respectivamente.



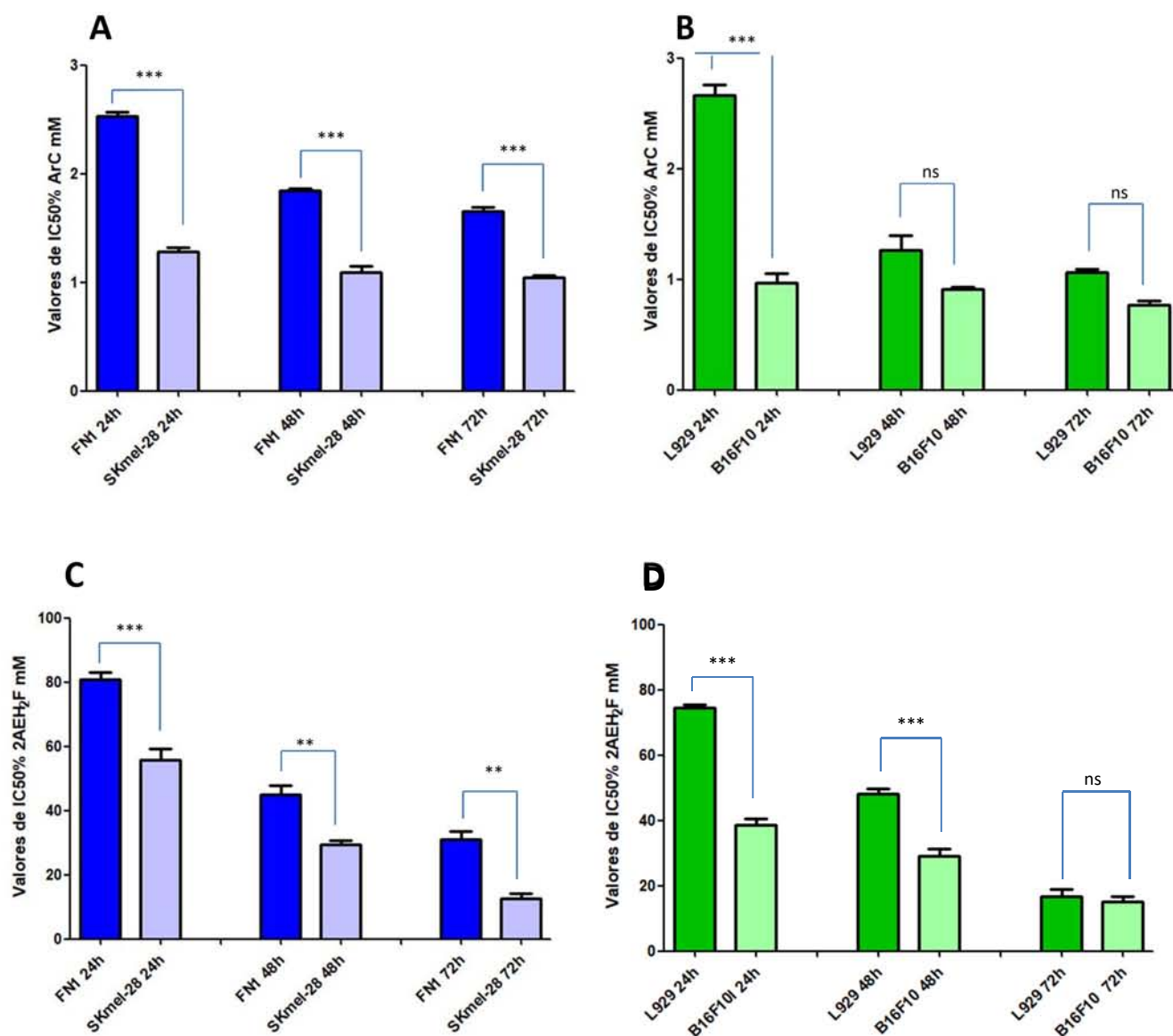
**Fig. 40.** Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos diferentes períodos, tratamento com paclitaxel em células de melanoma murino B16F10. **A:** Controle 24 horas; **B:** Concentração 84  $\mu$ M 24horas, células apresentando alterações morfológicas e baixa confluência (círculo); **C:** Concentração 5,25  $\mu$ M 24 horas; **D:** Controle 48 horas; **E:** Concentração 84  $\mu$ M 48 horas, células apresentando alterações morfológicas e baixa confluência (círculo); **F:** Concentração 5,25  $\mu$ M 48 horas; **G:** Controle 72 horas; **H:** Concentração 84  $\mu$ M 72 horas, células apresentando alterações morfológicas e baixa confluência (círculo); **I:** Concentração 5,25  $\mu$ M 72 horas; **J:** Gráfico 24 horas com valor de IC 50% de 16,98  $\mu$ M; **K:** Gráfico 48 horas com valor de IC 50% de 9,610  $\mu$ M; **L:** Gráfico 72 horas com valor de IC 50% de 6,067  $\mu$ M. Os gráficos mostram as correlações dos efeitos citotóxicos expressos em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

Tabela comparativa dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular nos períodos de 24, 48 e 72 horas expressos em valores de IC50% nos fibroblastos normais de linhagem humana e murino, comparadas com as células de melanoma de origem humana e murino, frente aos tratamentos com o extrato ArC, monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F e com os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel.

Células/Horas	Extrato mM	Dacarbazina mM	2AEH <sub>2</sub> F mM	Paclitaxel μM
<b>FN1-24hs</b>	2,497	2,182	77,90	37,49
<b>FN1-48hs</b>	1,882	1,508	49,82	22,58
<b>FN1-72hs</b>	1,638	0,6633	36,05	11,29
<b>SKmel-28-24hs</b>	1,202	1,753	62,32	24,28
<b>SKmel-28-48hs</b>	1,083	1,409	31,31	13,02
<b>SKmel-28-72hs</b>	1,049	0,7107	15,70	6,882
<b>L929-24hs</b>	2,805	1,513	76,29	31,14
<b>L929-48hs</b>	1,479	1,109	62,29	25,56
<b>L929-72hs</b>	1,090	0,5175	19,99	8,783
<b>B16F10-24hs</b>	1,010	1,026	41,06	16,98
<b>B16F10-48hs</b>	0,9461	0,8895	32,45	9,610
<b>B16F10-72hs</b>	0,8134	0,484	18,03	6,067

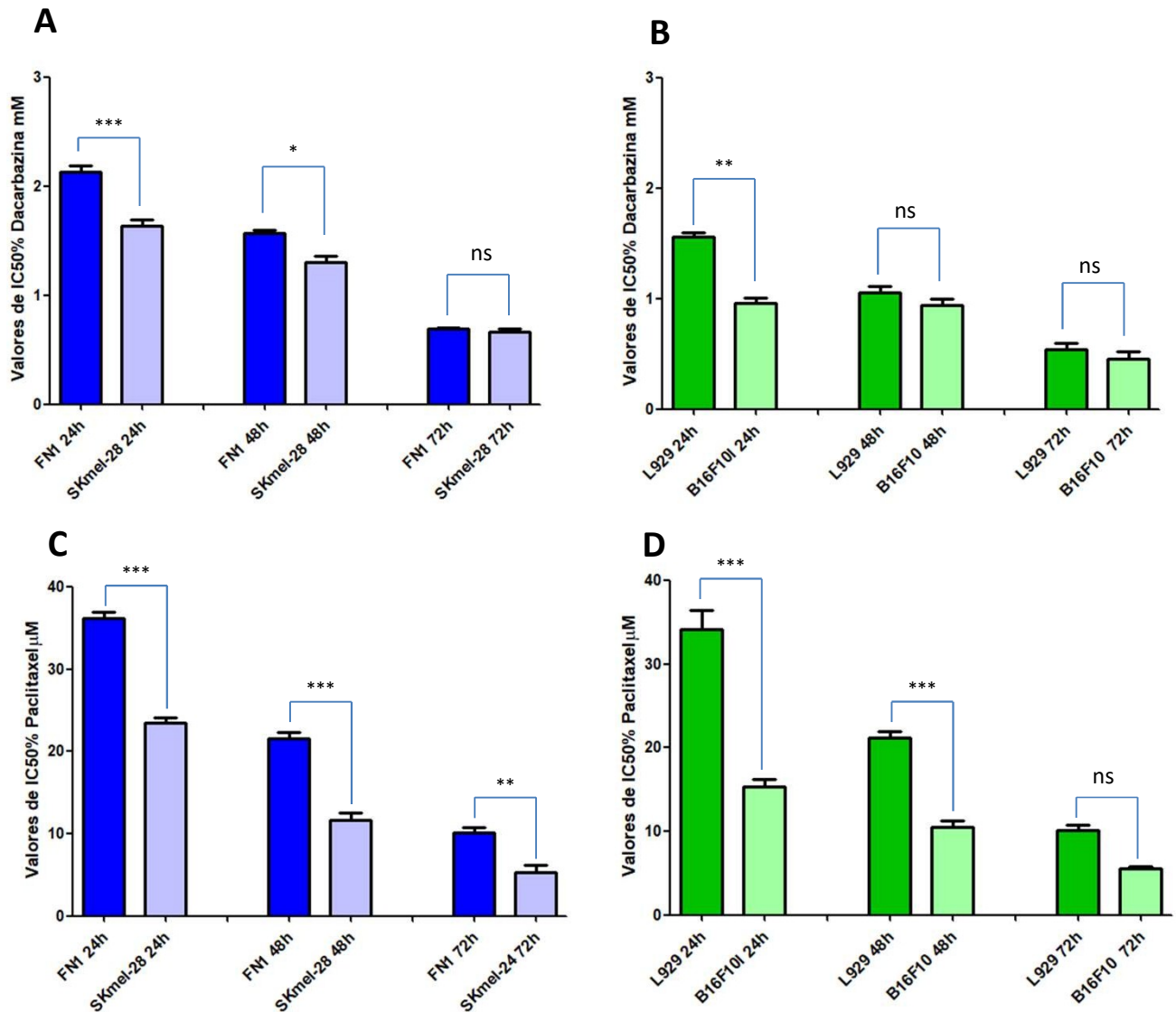
Tabela 8. Valores de IC50% obtidos após os tratamentos com compostos isolados nas linhagens de fibroblastos de origem humana FN1 e de origem murino L929 e nas células tumorais de melanoma humano SKmel-28 e de origem murino B16F10 pelos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Análises estatísticas dos resultados dos testes de viabilidade celular frente aos tratamentos com os compostos ArC e 2-AEH<sub>2</sub>F.



**Figura 41.** Gráficos comparativos entre pares e coluna dos valores de IC50% obtidos nos ensaios de MTT. **A:** comparação entre fibroblastos de origem humana FN1 e melanoma humano SKmel-28 tratados com ArC; **B:** comparação entre fibroblastos murino L929 e melanoma murino B16F10 tratados com ArC; **C:** comparação entre fibroblastos de origem humana FN1 e melanoma humano SKmel-28 tratados com 2AEH<sub>2</sub>F; **D:** comparação entre fibroblastos murino L929 e melanoma murino B16F10 tratados com 2AEH<sub>2</sub>F; análise estatística *one way* ANOVA e *Tukey-Kramer*. Valores:  $p < 0,05$  \*;  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,001$  \*\*\*; ns = não significativo.

Análises estatísticas dos resultados dos testes de viabilidade celular frente aos tratamentos com os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel.



**Figura 42.** Gráficos comparativos entre pares e coluna dos valores de IC50% obtidos nos ensaios de MTT, entre os quimioterápicos Dcarbазina e Paclitaxel. **A:** comparação entre fibroblastos de origem humana FN1 e melanoma humano SKmel-28 tratados com Dcarbазina; **B:** comparação entre fibroblastos murino L929 e melanoma murino B16F10 tratados com Dcarbазina; **C:** comparação entre fibroblastos de origem humana e melanoma humano SKmel-28 tratados com Paclitaxel; **D:** comparação entre fibroblastos murino L929 e melanoma murino B16F10 tratados com Paclitaxel; análise estatística *one way ANOVA* e *Tukey-Kramer*. Valores:  $p < 0,05$  \*;  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,001$  \*\*\*; ns = não significativo.



### **5.8. Determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) por citometria de fluxo.**

A avaliação do potencial elétrico mitocondrial, proporciona uma análise de uma possível via apoptótica, para tanto, os fibroblastos de origem humana FN1 e os de origem murino L929, bem como as células de melanoma humano SKmel-28 e murino B16F10, foram tratadas com os valores de IC50% com os compostos descritos na tabela 8 do item 5.7, no tempo de 24 horas. Para este ensaio, após o tratamento, as células foram marcadas através da sonda fluorescente MitoRed para leitura em citômetro de fluxo.

Os gráficos das dispersões, estão descritos na figura 43 e os resultados estão expressos nos gráficos na figura 44. Analisando o gráfico "A" da figura 44, as células FN1 tratadas com ArC, apresentaram diferença significativa na relação entre células do grupo controle e tratadas, gerando uma redução de células ativas em comparação ao grupo controle, de 37,6%, ao passo que, as células SKmel-28 frente ao tratamento ArC, verificou-se uma redução em relação ao grupo controle de 45%, porém, produzindo diferença significativa estatisticamente entre ativas e inativas no grupo tratado .

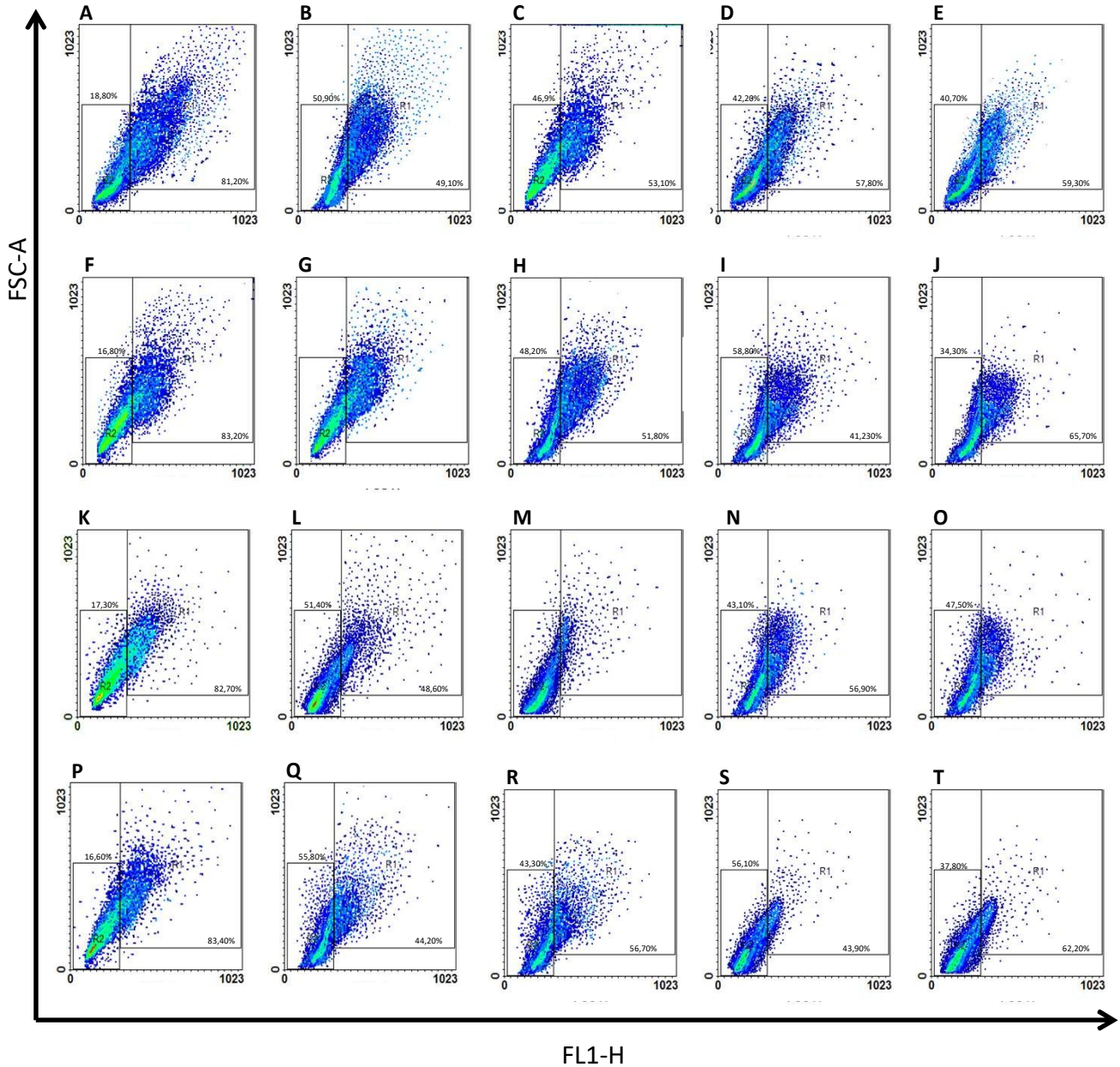
No grupo murino frente ao tratamento ArC, os fibroblastos L929 em comparação com o grupo controle, produziram uma redução de 37,8% de células ativas. No melanoma de origem murino, B16F10, houve uma redução de 47% de células ativas em relação ao grupo controle, demonstrando diferença estatística significativa entre as células ativas e inativas do grupo tratado, tanto para os fibroblastos como para as células de melanoma.

O tratamento com o quimioterápico paclitaxel, produziu efeito menor nas mitocôndrias em comparação com os outros tratamentos, principalmente na linhagem de melanoma humano SKmel-28. Nos fibroblastos FN1 tratados com paclitaxel, foi observada uma redução de 35% em relação ao controle. Para o melanoma humano SKmel-28, a redução das células com mitocôndrias ativas foi de menor, gerando uma redução de 22,21%, e produziu uma diferença significativa entre ativas e inativas nestas células, frente ao tratamento paclitaxel. No grupo murino, fibroblastos L929, o paclitaxel reduziu em 36,23% de células ativas e no grupo de melanoma B16F10, a redução foi de 33,31%, e a diferença entre as mitocôndrias ativas e inativas nos fibroblastos L929 tratados, foi significativa e nas células de melanoma B16F10, a diferença foi significativa com um valor de  $p < 0,001$ .

O tratamento com a dacarbazina, produziu uma diferença significativa entre ativas e inativas em fibroblastos normais de origem humana FN1, produzindo uma redução de 36,22% em relação ao controle, e em melanoma SKmel- 28, a redução foi de 38,65%. Na linhagem murino, em fibroblastos L929, a redução foi de 37,75% e para o melanoma B16F10, a redução foi de 35,52%. O quimioterápico dacarbazina também gerou diferença estatística significativa entre células ativas e inativas, em ambos os grupos, humano e murino, tanto em L929 como B16F10, bem como FN1 e SKmel-28, significando portanto, que a quantidade de mitocôndrias inativas, aumentou em relação ao grupo controle.

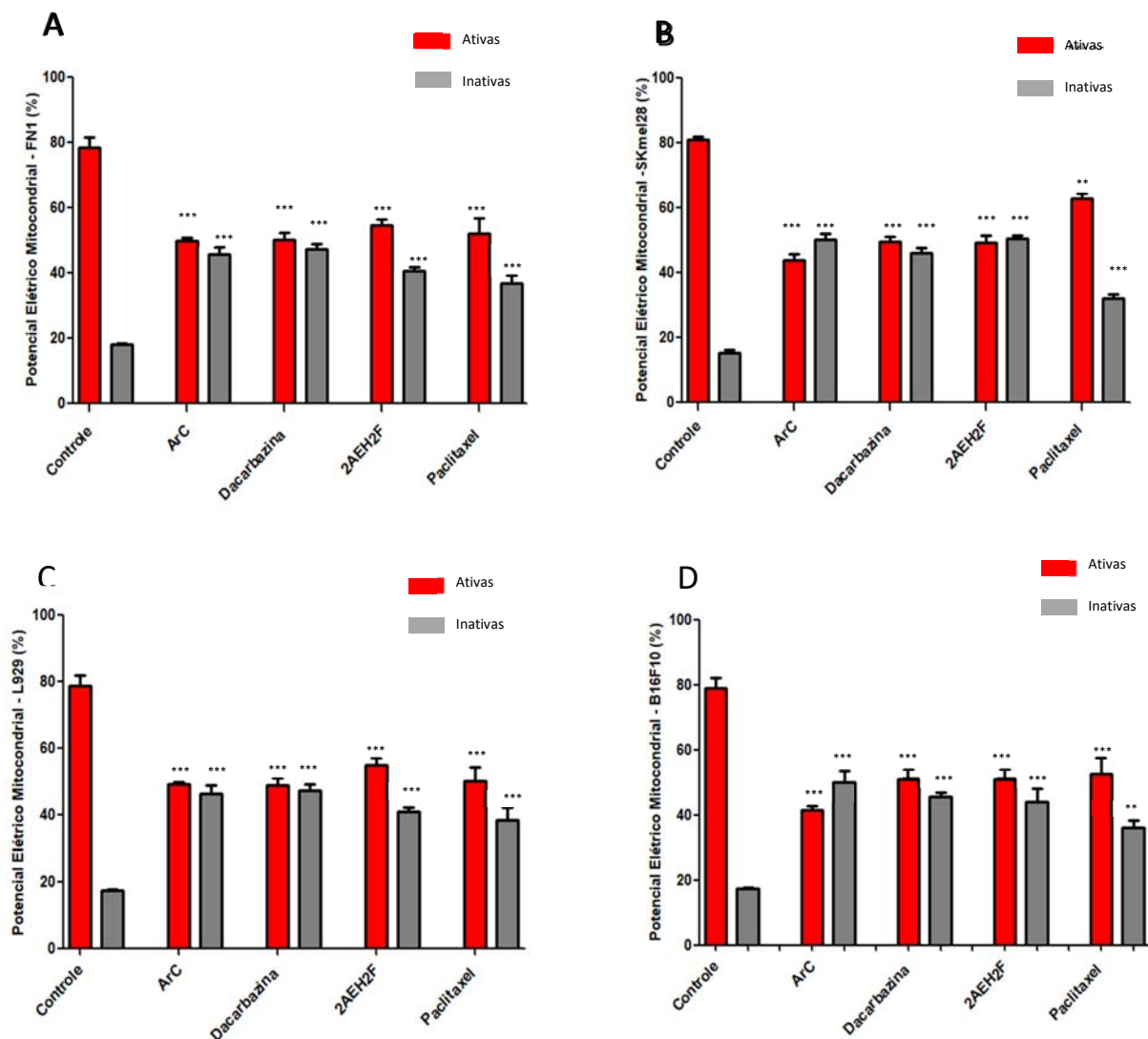
O tratamento com o alquilfosfolípido 2-AEH<sub>2</sub>F demonstrou efeito mais protetivo aos fibroblastos, tanto para a linhagem humana FN1 como para a linhagem murino L929, nesse sentido, os fibroblatos FN1 reduziram frente ao tratamento de 30,54%, e foi observada uma diferença estatística significativa entre ativas e inativas, conforme gráfico "A" da figura 44. Na linhagem de melanoma SKmel-28, houve uma redução da atividade mitocondrial em 39,31%, gerando diferença estatística significativa entre células do grupo controle, decorrente do aumento das células com mitocôndrias inativas, conforme gráfico "B" da figura 44. Situação semelhante ocorreu na linhagem murino, onde, em L929 houve uma redução de células ativas em 30,20% e na linhagem de melanoma murino B16F10 houve uma redução de 35,42%.

Análise do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em fibroblastos normais de origem humana FN1 e murino L929, e células tumorais de origem humana Skmel-28 e murino B16F10 por citometria de fluxo, frente aos tratamentos, conforme gráficos das dispersões *Density Plots* representativos da distribuição de acordo com  $\Delta\Psi_m$ .



**Figura 43.** Análise do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em células fibroblastos e melanoma em tratamentos de 24 horas nas concentrações obtidas de IC50%. **A-E** Fibroblasto humano FN1- **A**: Controle; **B**: ArC a 2,49 mM; **C**: Dacarbazina 2,18 mM; **D**: 2-AEH<sub>2</sub>F 77,9 mM; **E**: Paclitaxel 37,49  $\mu$ M; **F-J** Melanoma humano SKmel-28 - **F**: Controle; **G**: ArC 1,20 mM; **H**: Dacarbazina 1,75 mM; **I**: 2-AEH<sub>2</sub>F 62,32 mM; **J**: Paclitaxel 24,28  $\mu$ M; **K-O** Fibroblasto murino L929 - **K**: Controle; **L**: ArC 2,80 mM; **M**: Dacarbazina 1,51 mM; **N**: 2-AEH<sub>2</sub>F 76,29 mM; **O**: Paclitaxel 31,14  $\mu$ M; **P-T** Melanoma murino B16F10 : **P**: Controle; **Q**: ArC 1,01 mM; **R**: Dacarbazina 1,03 mM; **S**: 2-AEH<sub>2</sub>F 41,06; **T**: Paclitaxel 16,98  $\mu$ M.

Análises estatísticas dos resultados obtidos do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Os resultados das médias  $\pm$ SD foram comparados entre células ativas e inativas com o grupo controle frente aos tratamentos em fibroblastos normais de origem humana FN1 e murino L929, e nas células de melanoma humano Skmel-28 e murino B16F10, frente aos tratamentos com o extrato ArC, o monofosfoéster 2AEH2F e os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel.



**Figura 44.** Gráficos de barras representando o  $\Delta\Psi_m$  expresso como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **A:** Fibroblasto humano FN1; **B:** Melanoma humano SKmel-28; **C:** Fibroplasto murino L929; **D:** Melanoma murino B16F10. As diferenças estatísticas, foram obtidas por meio do teste não paramétrico de comparações múltiplas *one-way ANOVA* e *Tukey-Kramer* comparando-se ativas e inativas com o grupo controle. Valores de *p*: *p*<0,05 \*; *p*<0,01\*\* ; *p*<0,001\*\*\*; ns=não significativo.

### 5.9 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Para este ensaio, as células foram tratadas com os compostos descritos na tabela 8 do item 5.7 e nas concentrações dos valores obtidos de IC50%, descritos nesta tabela, pelo período de 24 horas, após o tratamento, foi aplicada a metodologia descrita em 4.12 para leitura em equipamento de citometria de fluxo.

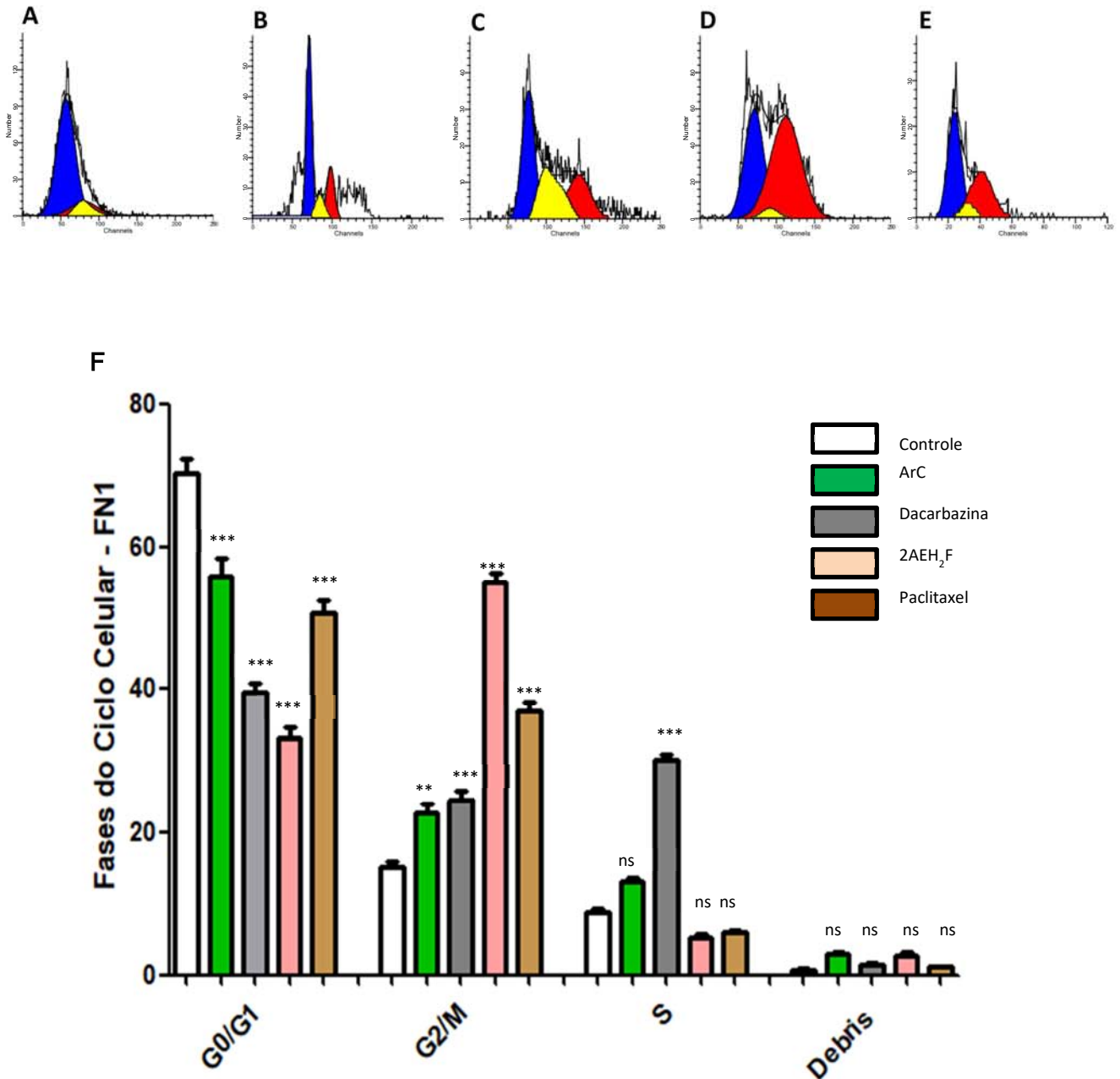
Os fibroblastos de origem humana FN1, tratados com ArC na concentração de 2,49 mM, gerou uma redução de células nas fases G0/G1 que estavam em 73,96% para 60,69% quando comparadas ao controle sem tratamento. Na fase G2/M, houve um aumento de células na fase S, de 9,66% para 14,15% e o *debris* celular aumentou de 0,75% para 3,58%. Quando essas células foram tratadas com a dacarbazina a 2,18 mM, houve uma redução das células nas fases G0/G1, sendo esta redução, maior do que as células tratadas com ArC, porém, a maior diferença nas fases G0/G1, foi aferida ao tratamento com 2-AEH<sub>2</sub>F, na concentração de 77,90 mM, indo de um percentual de 73,96% aferido ao grupo controle, para um percentual de 36,47%, por outro lado, este mesmo tratamento acumulou células em G2/M em 57,27%, contra os 16,38% do grupo controle, conforme tabela 9 do item 5.9.

A linhagem de células de melanoma humano SKmel-28 tratadas com 2-AEH<sub>2</sub>F, a 62,32 mM, produziu efeito semelhante aos fibroblastos de origem humana FN1, acumulando células em G2/M (54,25%), a mesma característica foi observada em células de melanoma murino B16F10, acumulando células em G2/M (54,76%).

O tratamento com dacarbazina em fibroblastos de origem humana FN1, gerou um acúmulo de células na fase S, com um aumento em relação ao controle de 9,66% para 31,69%. A fase S em fibroblastos FN1, para os tratamentos com 2-AEH<sub>2</sub>F e paclitaxel, apresentou valores semelhantes de 6,26% e 6,68% respectivamente.

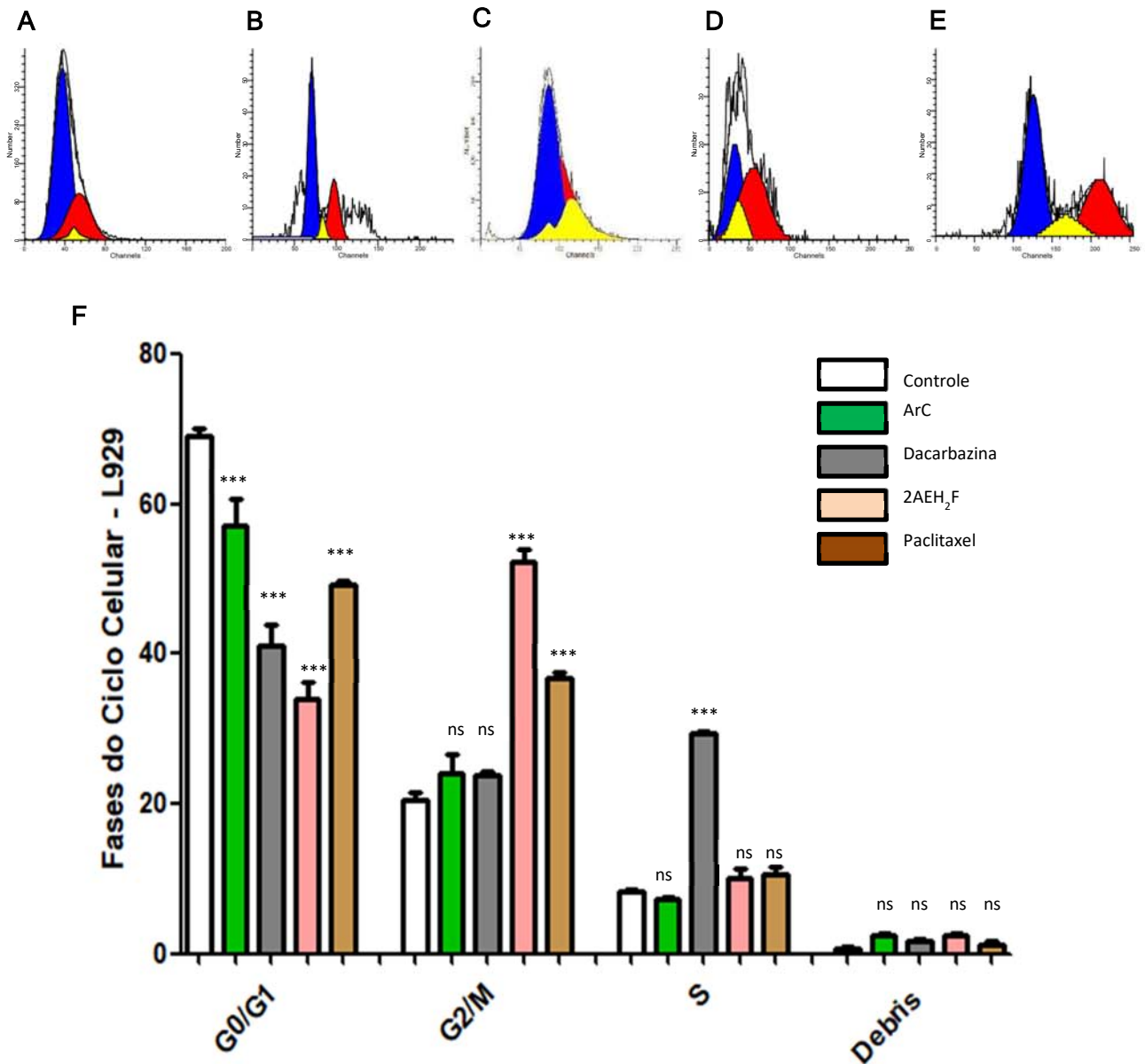
Nas linhagens tumorais humana SKmel-28 e melanoma murino B16F10, os resultados do tratamento com ArC em SKmel-28, acumulou mais células em G0/G1, o mesmo ocorreu em B16F10. No tratamento com a dacarbazina também acumulou mais células em G0/G1, por outro lado, o tratamento com 2-AEH<sub>2</sub>F acumulou células nas fases G2/M para ambas as linhagens. O tratamento com paclitaxel, acumulou células B16F10 em G2/M(51,91%) e em SKmel-28 acumulou células em G2/M (54,86%).

Análise do ciclo celular em fibroblastos normais de origem humana FN1, obtida por citometria de fluxo. Histogramas representativos *density plot* gerados através do programa *ModFit* referente às distribuições das fases do ciclo celular, frente aos tratamentos com o extrato ArC, o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F e os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel.



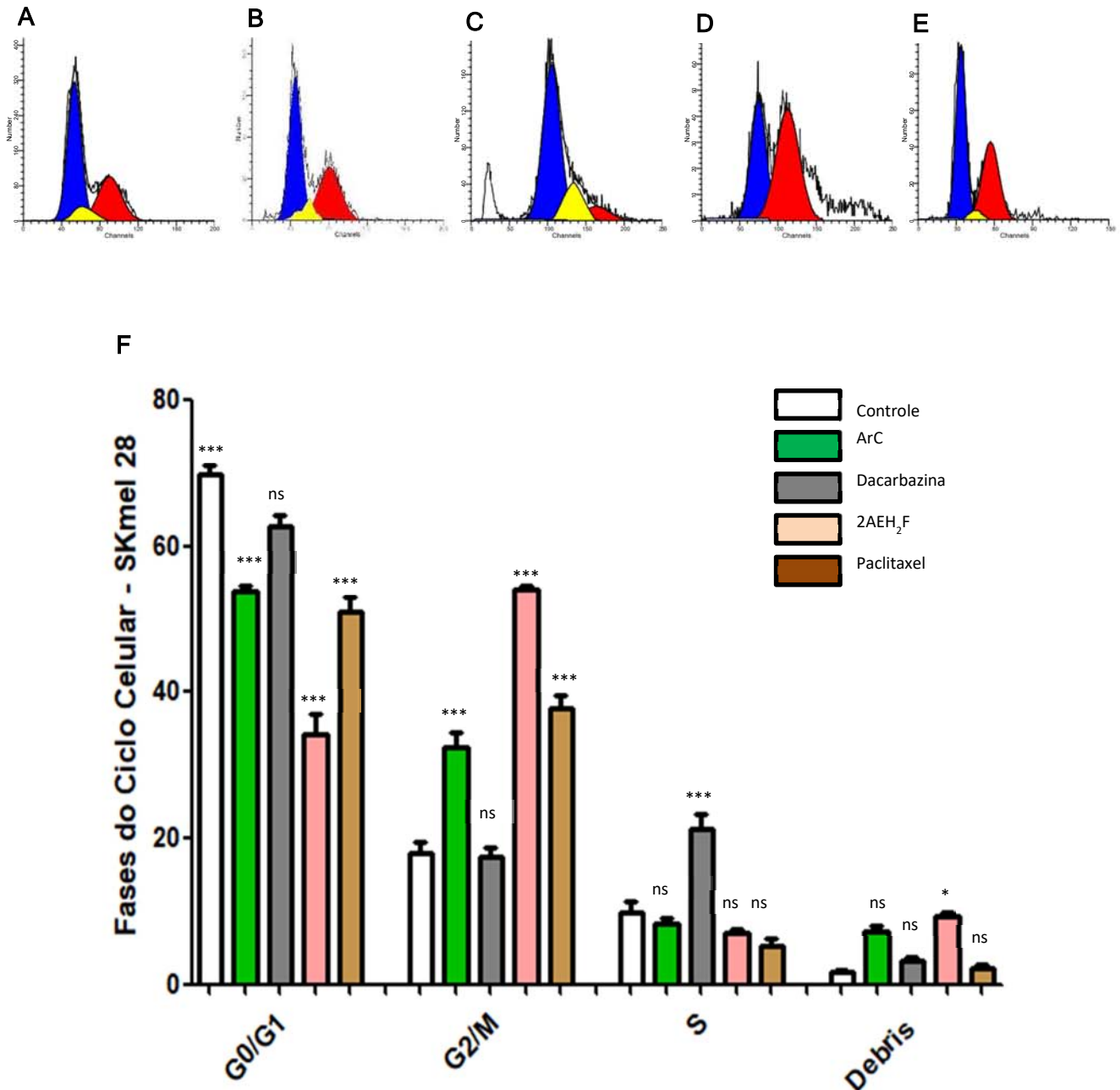
**Figura 45.** Análise das fases do ciclo celular em fibroblastos humano FN1 em diferentes tratamentos por um período de 24 horas nas concentrações obtidas dos valores de IC50%. A: Controle, sem tratamento. B: Extrato ArC 2,497 mM; C: Dacarbazina 2,18mM; D: 2AEH<sub>2</sub>F 77,9 mM; E: Paclitaxel 37,49 μM. F: Diferenças estatísticas obtidas por meio do teste não paramétrico de comparações múltiplas *one-way ANOVA* e *Tukey-Kramer* entre o controle e os demais tratamentos. Valores de *p*: *p*<0,05 \* ; *p*<0,01\*\* ; *p*<0,001\*\*\*; ns=não significativo

Análise do ciclo celular em fibroblastos normais murino L929, obtida por citometria de fluxo. Histogramas representativos *density plot* gerados através do programa *ModFit* referente às distribuições das fases do ciclo celular, frente aos tratamentos com o extrato ArC, o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F e os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel.



**Figura 46** . Análise das fases do ciclo celular em fibroblastos murino L929 em diferentes tratamentos por um período de 24 horas nas concentrações obtidas dos valores de IC50%. A: Controle, sem tratamento. B: Extrato ArC 2,8 mM; C: Dacarbazina 1,51mM; D: 2AEH<sub>2</sub>F 76,29 mM; E: Paclitaxel 31,14 µM. F: Diferenças estatísticas obtidas por meio do teste não paramétrico de comparações múltiplas *one-way* ANOVA e *Tukey-Kramer* entre o controle e os demais tratamentos. Valores de *p*: *p*<0,05 \* ; *p*<0,01\*\* ; *p*<0,001\*\*\*; ns=não significativo

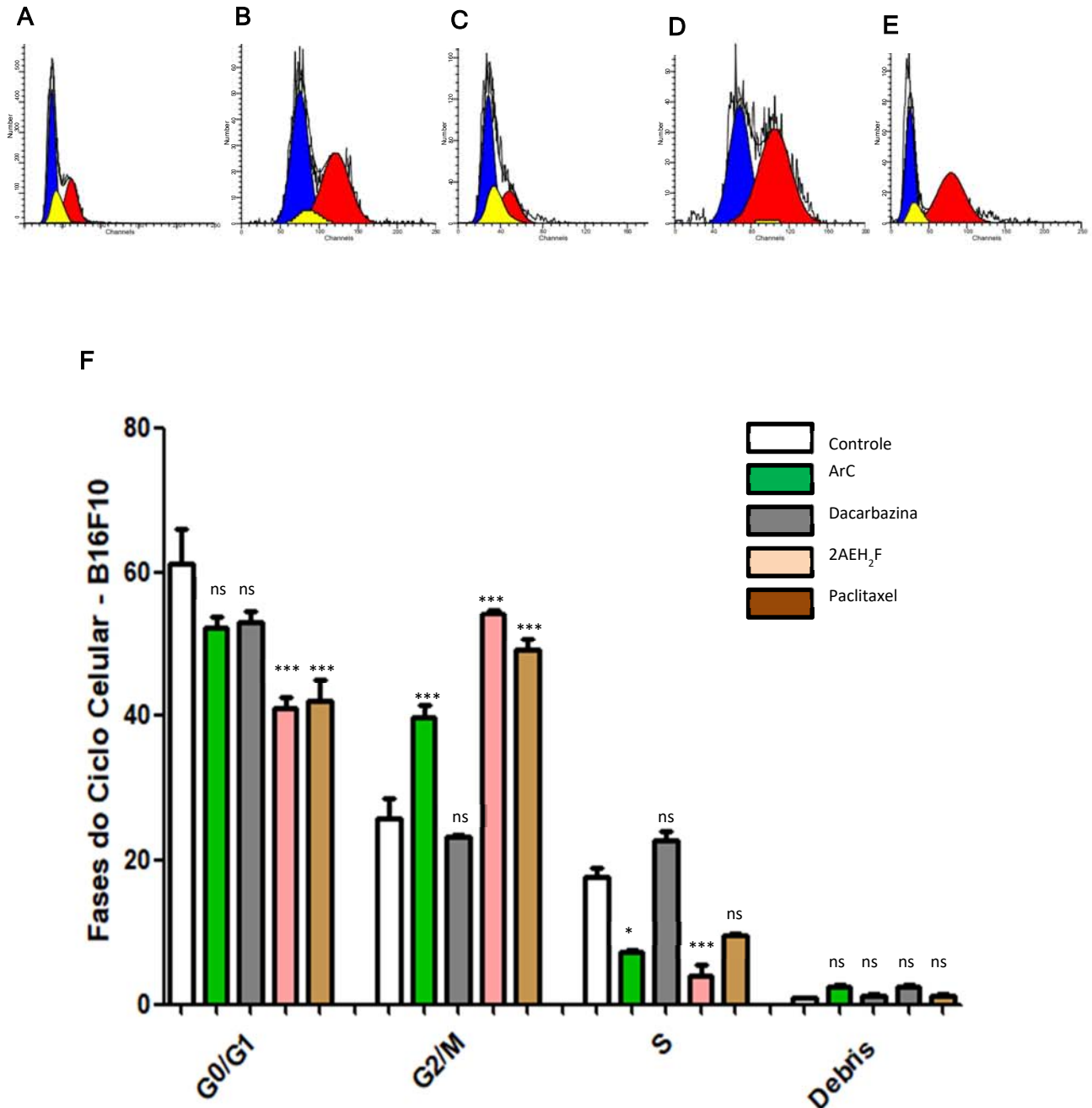
Análise do ciclo celular em células de melanoma humano Skmel-28, obtida por citometria de fluxo. Histogramas representativos *density plot* gerados através do programa *ModFit* referente às distribuições das fases do ciclo celular, frente aos tratamentos com o extrato ArC, o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F e os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel.



**Figura 47 .** Análise das fases do ciclo celular em melanoma humano Skmel-28 em diferentes tratamentos por um período de 24 horas nas concentrações obtidas dos valores de IC50%. A: Controle, sem tratamento. B: Extrato ArC 1,20 mM; C: Dacarbazina 1,75mM; D: 2AEH<sub>2</sub>F 62,32 mM; E: Paclitaxel 24,28 μM. Diferenças estatísticas obtidas por meio do teste não paramétrico de comparações múltiplas *one-way* ANOVA e *Tukey-Kramer* entre o controle e os demais tratamentos. Valores de *p*: *p*<0,05 \* ; *p*<0,01\*\* ; *p*<0,001\*\*\*; ns=não significativo



Análise do ciclo celular em células de melanoma murino B16F10, obtida por citometria de fluxo. Histogramas representativos *density plot* gerados através do programa *ModFit* referente às distribuições das fases do ciclo celular, frente aos tratamentos com o extrato ArC, o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F e os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel.



**Figura 48** . Análise das fases do ciclo celular em melanoma murino B16F10 em diferentes tratamentos por um período de 24 horas nas concentrações obtidas dos valores de IC50%. A: Controle sem tratamento. B: Extrato ArC 1,00 mM; C: Dacarbazina 1,03mM; D: 2AEH<sub>2</sub>F 41,06 mM; E: Paclitaxel 16,98 µM. Diferenças estatísticas obtidas por meio do teste não paramétrico de comparações múltiplas *one-way* ANOVA e *Tukey-Kramer* entre o controle e os demais tratamentos. Valores de *p*: *p*<0,05 \* ; *p*<0,01\*\* ; *p*<0,001\*\*\*; ns=não significativo

Tabelas comparativas dos resultados das fases do ciclo celular frente aos diferentes tratamentos.

FN1	Controle %	ArC %	Dacarbazina %	2AEH <sub>2</sub> F %	Paclitaxel %
G0/G1	73,96	60,69	41,33	36,47	53,97
G2/M	16,38	25,16	26,98	57,27	39,35
S	9,66	14,15	31,69	6,26	6,68
Dedris	0,75	3,58	1,98	3,24	1,01

**Tabela 9.** Fases do ciclo celular expressas em percentual em células de fibroblastos normais de origem humana FN1.

L929	Controle %	ArC %	Dacarbazina %	2AEH <sub>2</sub> F %	Paclitaxel %
G0/G1	69,6	64,23	46,52	38,74	49,37
G2/M	22,62	29,14	24,6	49,08	37,97
S	7,78	6,63	28,88	12,18	12,66
Dedris	0,50	2,62	2,3	2,08	1,69

**Tabela 10.** Fases do ciclo celular expressas em percentual em células fibroblastos normais murino L929.

SKmel-28	Controle %	ArC %	Dacarbazina %	2AEH <sub>2</sub> F %	Paclitaxel %
G0/G1	72,09	54,21	65,25	39,75	54,86
G2/M	15,07	36,09	15,72	54,25	41,2
S	12,84	9,7	19,03	6	3,94
Dedris	1,85	7,63	3,5	9,83	1,47

**Tabela 11.** Fases do ciclo celular expressas em percentual em células de melanoma humano SKmel-28.

B16F10	Controle %	ArC %	Dacarbazina %	2AEH <sub>2</sub> F %	Paclitaxel %
G0/G1	51,7	50,09	53,97	44,12	38,67
G2/M	28,5	43,35	23,03	54,76	51,91
S	19,8	6,56	23	1,12	9,42
Dedris	0,97	4,01	1,3	5,31	1,04

**Tabela 12.** Fases do ciclo celular expressas em percentual em células de melanoma murino B16F10.

### 5.10. Avaliação do efeito da associação farmacológica entre os compostos

Este ensaio foi elaborado para avaliar a possibilidade de efeito sinérgico ou efeitos antagônicos e os graus de variabilidade da interação entre os compostos testados. Para isso, foram montadas duas placas de 96 poços para cada grupo de células sendo fibroblastos murino L929, fibroblastos humano, FN1 e as células de linhagens tumorais provenientes de melanomas, sendo B16F10 de origem murino e SKmel-28 de origem humana, totalizando oito placas. As placas foram incubadas no tempo de 24 horas com os tratamentos, por meio do extrato ArC, onde, em alguns gráficos, podem conter a designação Aretepelin C, o quimioterápico dacarbazina, o monofosfoéster 2-AEH<sub>2</sub>F, e o quimioterápido paclitaxel. Os resultados foram submetidos à análise através da plataforma *Synergy Finder 2.0*, que é um aplicativo da *web* para análise interativa e visualização da combinação de drogas, aferindo resultados sobre efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos.

As concentrações utilizadas neste tratamento, foram as obtidas nos ensaios de MTT nos valores de IC50% conforme tabela 8, para os tratamentos designados como compostos fixos, por um período de 24 horas.

Os resultados em fibroblastos humanos FN1, apresentou um sinergismo forte no tratamento com o 2-AEH<sub>2</sub>F associado ao quimioterápico dacarbazina, por outro lado, o tratamento com ArC e 2-AEH<sub>2</sub>F, resultou em um antagonismo fraco, por outro lado, a mesma associação em células de melanoma humano, produziu um antagonismo moderado, por meio de um *score* de -2,84 para FN1 e -8.88 para a linhagem tumoral SKmel-28. O antagonismo aumentou quando o composto ArC foi associado ao paclitaxel em melanoma SKmel-28, produzindo um *score* de -17,85.

Na linhagem de melanoma murino, B16F10, todas as associações produziram antagonismo variando entre efeito antagônico e efeito antagônico moderado. Nos fibroblastos de origem murino, o tratamento da associação entre ArC e dacarbazina, produziu um efeito aditivo em melanoma humano, por outro lado, o mesmo tratamento em fibroblastos de origem humana FN1, produziu efeito sinérgico.

Estudo da associação farmacológica em fibroblastos normais de origem humana (FN1), pelo período de 24 horas.

### Estudo Farmacológico I - 24 Horas FN1

ArC (2,497mM) + Quimioterápico dacarbazina

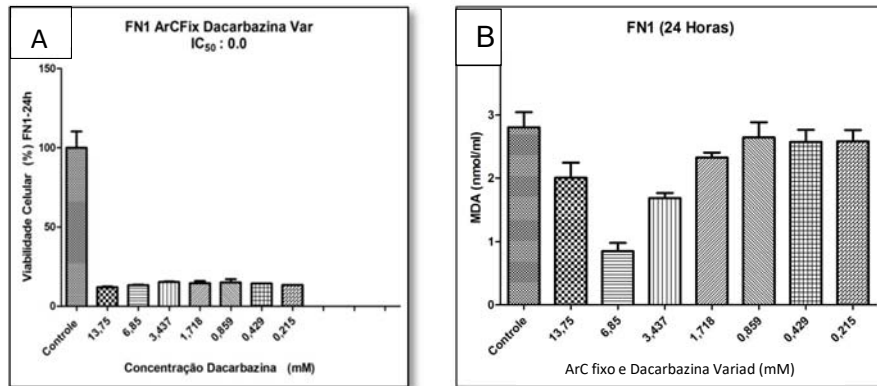


Figura 49. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos de origem humana FN1 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 2,49 mM e Dacarbazina em diluição a partir de 13,75 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

### Estudo Farmacológico II – 24 Horas FN1

Quimioterápico Dacarbazina (2,182 mM) + ArC

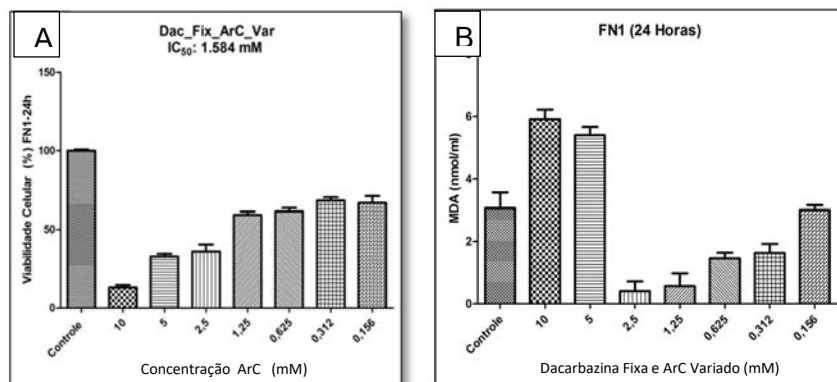


Figura 50. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos de origem humana FN1 frente ao tratamento com dacarbazina na concentração fixa de 2,182 mM e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em fibroblastos normais de origem humana (FN1), pelo período de 24 horas.

### Estudo Farmacológico III – 24 Horas FN1

ArC (2,497 mM) + 2-AEH<sub>2</sub>F

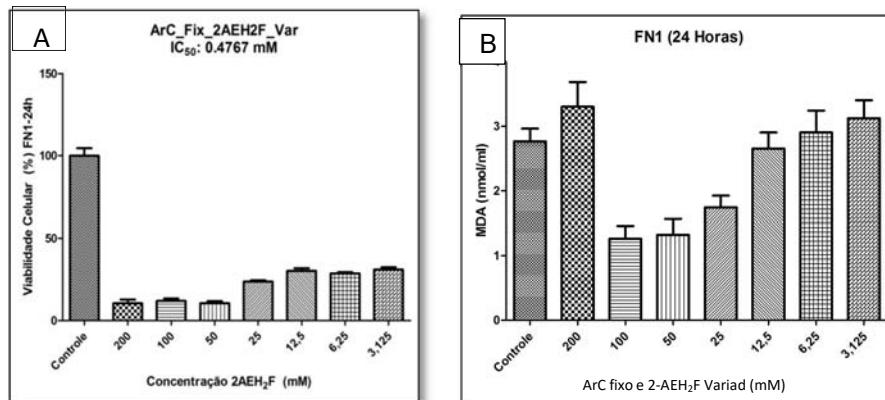


Figura 51. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos de origem humana FN1 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 2,497 mM fixo e 2-AEH<sub>2</sub>F em diluição a partir de 200 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

### Estudo Farmacológico IV - 24 Horas FN1

2-AEH<sub>2</sub>F (77,90 mM) + ArC

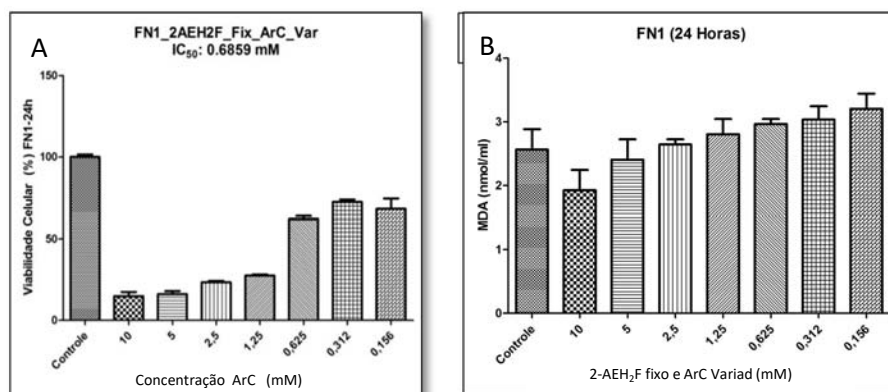


Figura 52. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos de origem humana FN1 frente ao tratamento 2AEH<sub>2</sub>F na concentração fixa de 77,90 mM e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em fibroblastos normais de origem humana (FN1), pelo período de 24 horas.

#### Estudo Farmacológico V – 24 Horas FN1

Quimioterápico dacarbazina (2,182 mM) + 2-AEH<sub>2</sub>F

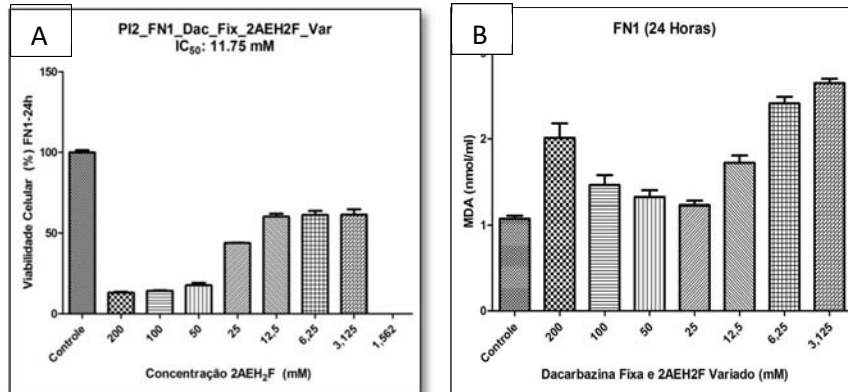


Figura 53. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos de origem humana FN1 frente ao tratamento com dacarbazina na concentração fixa de 2,182 mM e 2AEH<sub>2</sub>F em diluição a partir de 200 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

#### Estudo Farmacológico VI - 24 Horas FN1

2-AEH<sub>2</sub>F (77,90 mM) + Quimioterápico dacarbazina

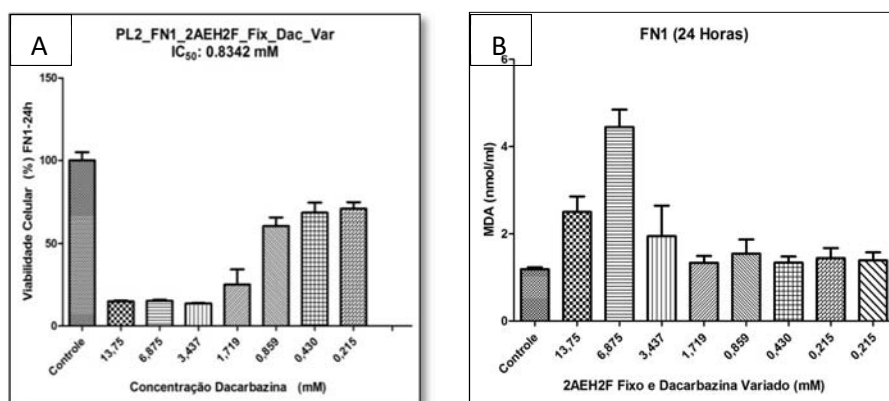


Figura 54. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos de origem humana FN1 frente ao tratamento com 2AEH<sub>2</sub>F na concentração fixa de 77,90 mM e dacarbazina em diluição a partir de 13,75 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em fibroblastos normais de origem humana (FN1), pelo período de 24 horas.

#### Estudo Farmacológico VII – 24 Horas FN1

Quimioterápico paclitaxel (37,49  $\mu$ M) + ArC

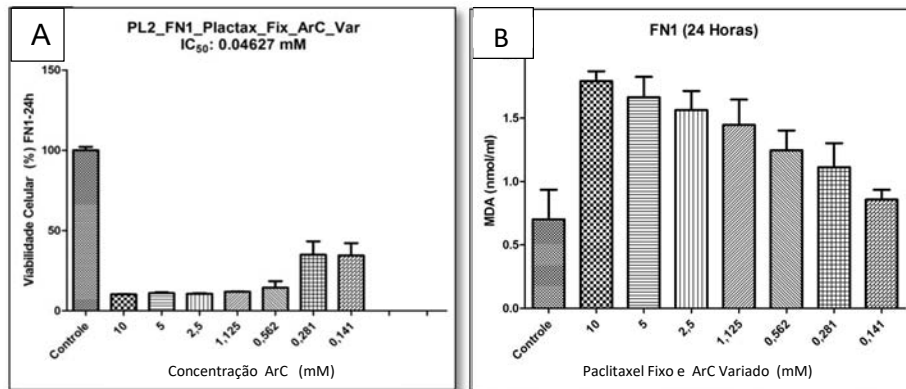


Figura 55. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos de origem humana FN1 frente ao tratamento com Paclitaxel na concentração fixa de 37,49  $\mu$ M e Artepelin C em diluição a partir de 10 mM. **A**: Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B**: Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

#### Estudo Farmacológico VIII - 24 Horas FN1

ArC Fixo (2,497 mM) + quimioterápico paclitaxel

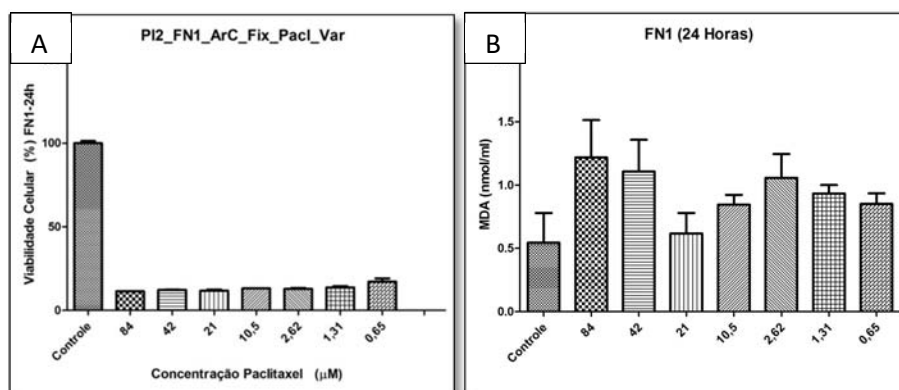


Figura 56. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos de origem humana FN1 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 2,497 mM e paclitaxel em diluição a partir de 84  $\mu$ M. **A**: Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B**: Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Fotomicrografias representativas dos efeitos das associações farmacológicas em fibroblastos normais, de origem humana FN1 no período de 24 horas, obtidas em microscópio invertido das placas de cultura. Estudo de I ao IV.

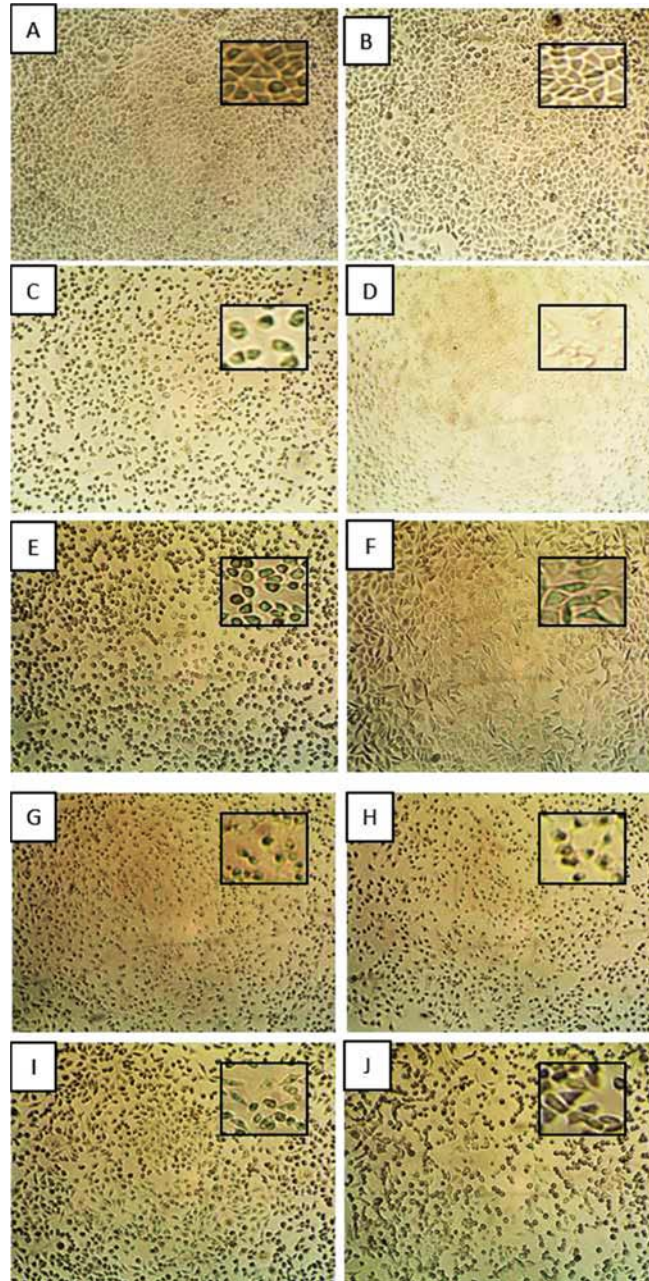


Figura 57. **Fibroblastos normais de origem humana FN1.** **A e B:** Controle; **C:** Estudo farmacológico I - 50  $\mu$ l de ArC a 2,49 mM e 50  $\mu$ l Dacarbazina a 6,85 mM; **D :** Estudo farmacológico I - 50  $\mu$ l de ArC a 2,01 mM e 50  $\mu$ l Dacarbazina a 0,215 mM; **E:** Estudo farmacológico II - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1,044 mM e 50  $\mu$ l de ArC 5 mM; **F:** Estudo farmacológico II - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 2,182 mM e 50  $\mu$ l de Artepelin C 1,25 mM; **G:** Estudo farmacológico III - 50  $\mu$ l ArC a 2,497 mM e 50  $\mu$ l de 2-AEH<sub>2</sub>F 100 mM; **H:** Estudo farmacológico III - 50  $\mu$ l ArC a 2,497 mM e 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 3,125 mM; **I:** Estudo farmacológico IV - 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 77 mM e 50  $\mu$ l de ArC a 5 mM; **J:** Estudo farmacológico IV - 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 77,9 mM e 50  $\mu$ l de ArC a 0,625 mM.



Fotomicrografias representativas dos efeitos das associações farmacológicas em fibroblastos normais, de origem humana FN1 no período de 24 horas, obtidas em microscópio invertido das placas de cultura. Estudo de V ao VIII.

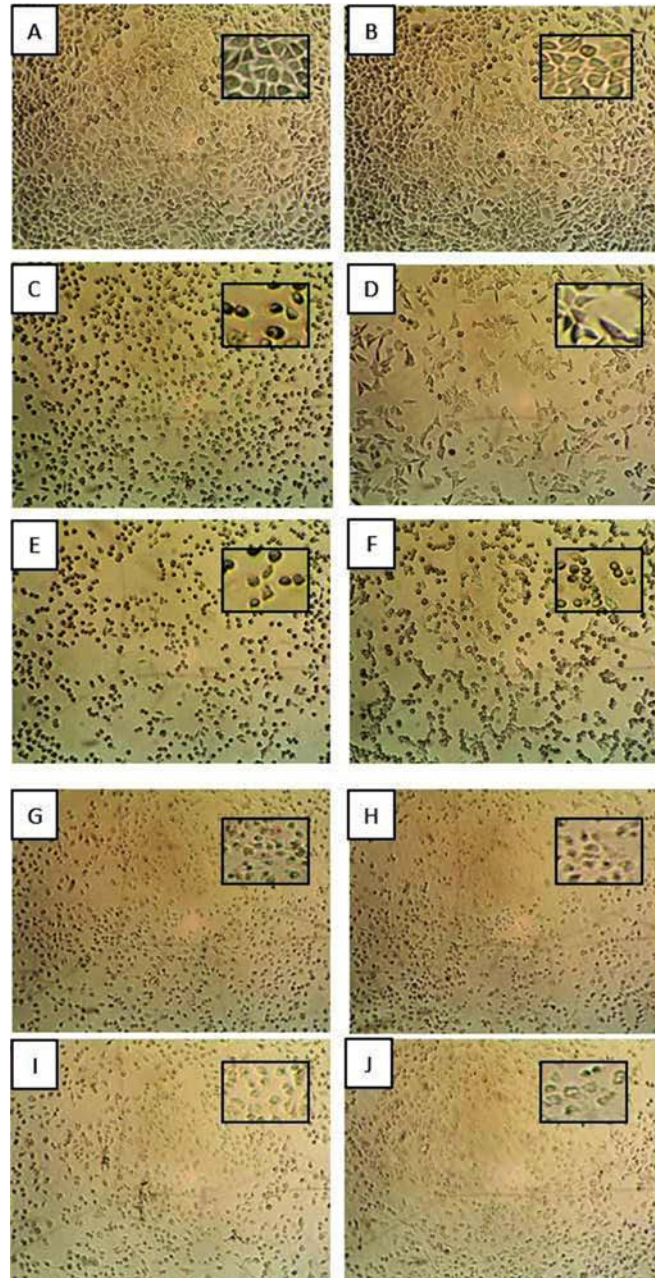


Figura 58. **Fibroblastos normais de origem humana FN1.** **A e B:** Controle; **C:** Estudo farmacológico **V** - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 2,182 mM e 50  $\mu$ l 2-AEH<sub>2</sub>F a 100 mM; **D:** Estudo farmacológico **V** - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 2,182 mM e 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 3,125 mM; **E:** Estudo farmacológico **VI** - 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 77,9 mM e 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 3,437 mM; **F:** Estudo farmacológico **VI** - 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 77,9 mM e 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 0,859 mM; **G:** Estudo farmacológico **VII** - 50  $\mu$ l Paclitaxel a 37,49  $\mu$ M e 50  $\mu$ l de ArC a 0,562 mM; **H:** Estudo farmacológico **VII** - 50  $\mu$ l Paclitaxel a 37,49  $\mu$ M e 50  $\mu$ l de ArC a 0,141 mM; **I:** Estudo farmacológico **VIII** - 50  $\mu$ l ArC a 2,497 mM e 50  $\mu$ l de Paclitaxel a 10,5  $\mu$ M; **J:** Estudo farmacológico **VIII** - 50  $\mu$ l ArC a 2,497 mM e 50  $\mu$ l de Paclitaxel a 1,31  $\mu$ M.

Estudo da associação farmacológica em fibroblastos normais de origem murino (L929), pelo período de 24 horas.

#### Estudo Farmacológico I – 24 Horas L929

ArC (2,8 mM) + quimioterá Dacarbazina

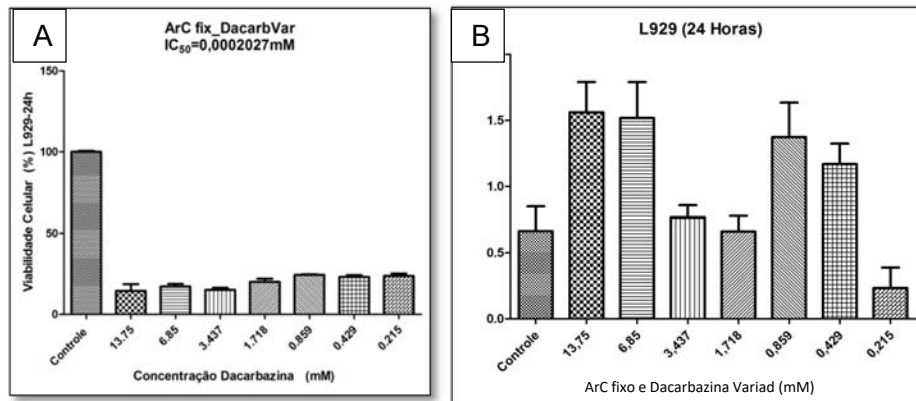


Figura 59. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos murino L929 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 2,8 mM e Dacarbazina em diluição a partir de 13,75 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

#### Estudo Farmacológico II - 24 Horas L929

Quimioterápico dacarbazina (1,513mM) + ArC

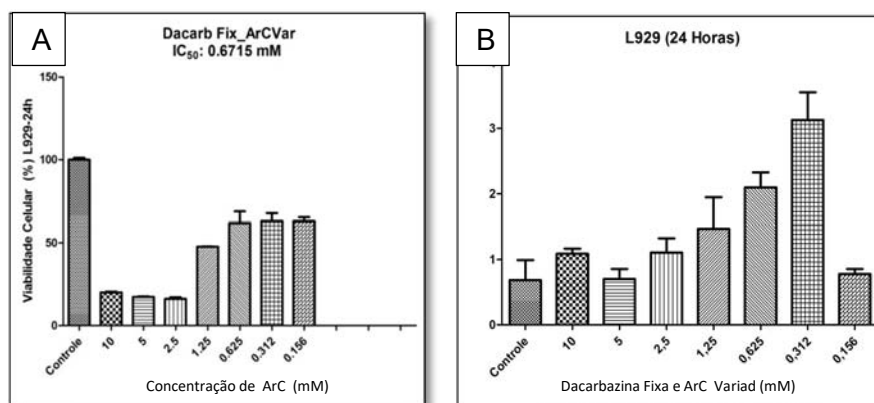


Figura 60. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos murino L929 frente ao tratamento com dacarbazina na concentração fixa de 1,51 mM e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em fibroblastos normais de origem murino (L929), pelo período de 24 horas.

#### Estudo Farmacológico III – 24 Horas L929

ArC (2,8 mM) + 2-AEH<sub>2</sub>F

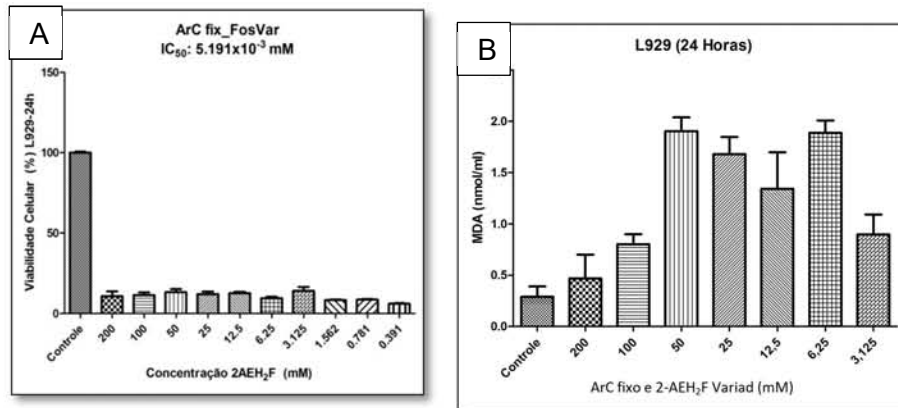


Figura 61. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos murino L929 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 2,8 mM e 2AEH<sub>2</sub>F em diluição a partir de 200 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

#### Estudo Farmacológico IV – 24 Horas L929

2-AEH<sub>2</sub>F (76,29 mM) + ArC

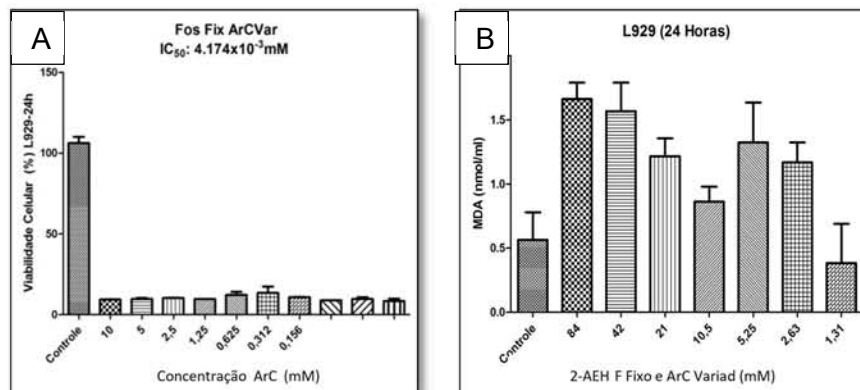


Figura 62. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos murino L929 frente ao tratamento com 2-AEH<sub>2</sub>F na concentração fixa de 76,29 mM e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em fibroblastos normais de origem murino (L929), pelo período de 24 horas.

Estudo Farmacológico V – 24 Horas L929 QT

Dacarbazina (1,513mM) + 2-AEH<sub>2</sub>F

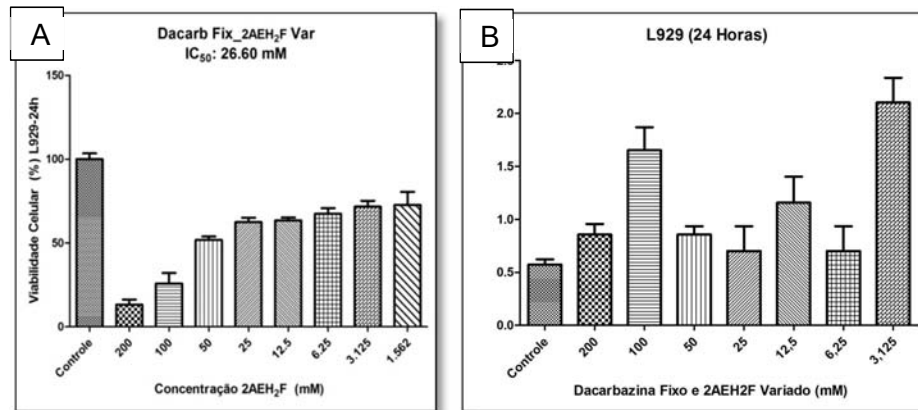


Figura 63. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos murino L929 frente ao tratamento com dacarbazina na concentração fixa de 1,51 mM e 2-AEH<sub>2</sub>F em diluição a partir de 200 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo Farmacológico VI – 24 Horas L929

2-AEH<sub>2</sub>F (76 mM) + Quimioterápico dacarbazina

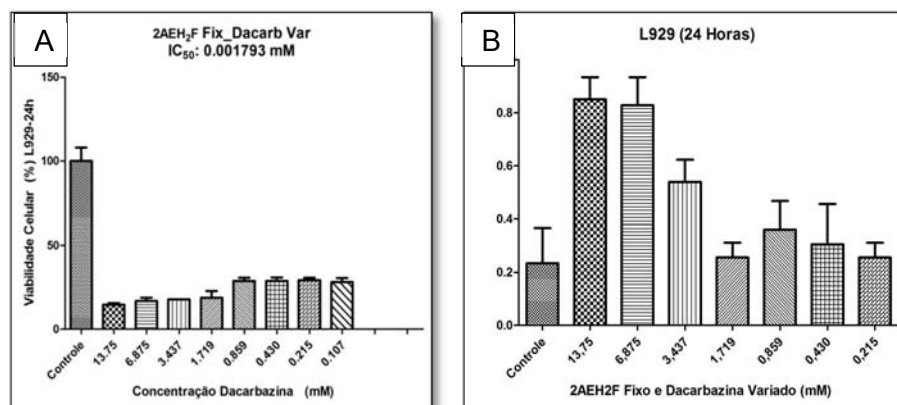


Figura 64. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos murino L929 frente ao tratamento com 2-AEH<sub>2</sub>F na concentração fixa de 76 mM e dacarbazina em diluição a partir de 13,75 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em fibroblastos normais de origem murino (L929), pelo período de 24 horas.

Estudo Farmacológico VII – 24 Horas L929

Quimioterápico paclitaxel (31  $\mu$ M) + ArC

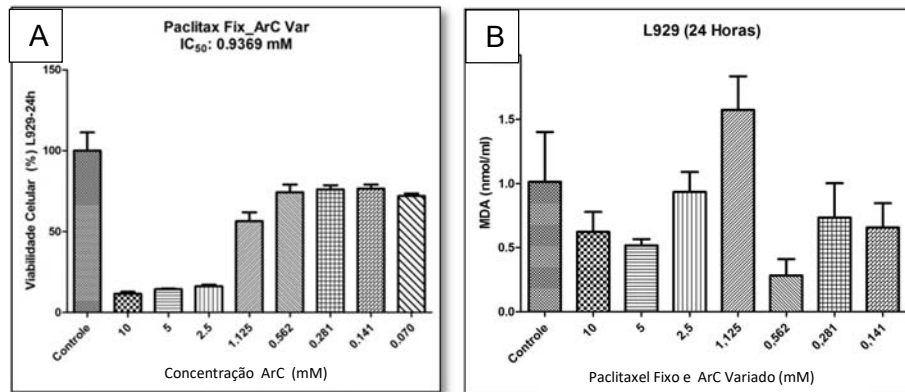


Figura 65. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos murino L929 frente ao tratamento com paclitaxel na concentração fixa de 31  $\mu$ M e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo Farmacológico VIII – 24 Horas L929

ArC (2,8 mM) + quimioterápico paclitaxel

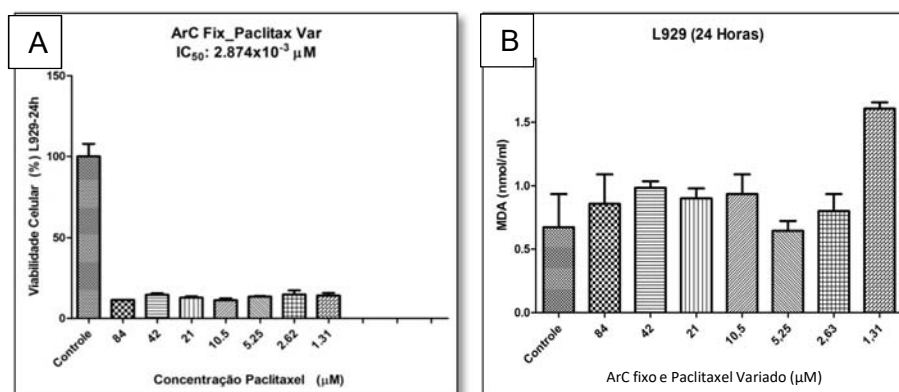


Figura 66. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos murino L929 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 2,8 mM e paclitaxel em diluição a partir de 84  $\mu$ M. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Fotomicrografias representativas dos efeitos das associações farmacológicas em fibroblastos normais, de origem murino L929 no período de 24 horas, obtidas em microscópio invertido das placas de cultura. Estudos de I ao IV.

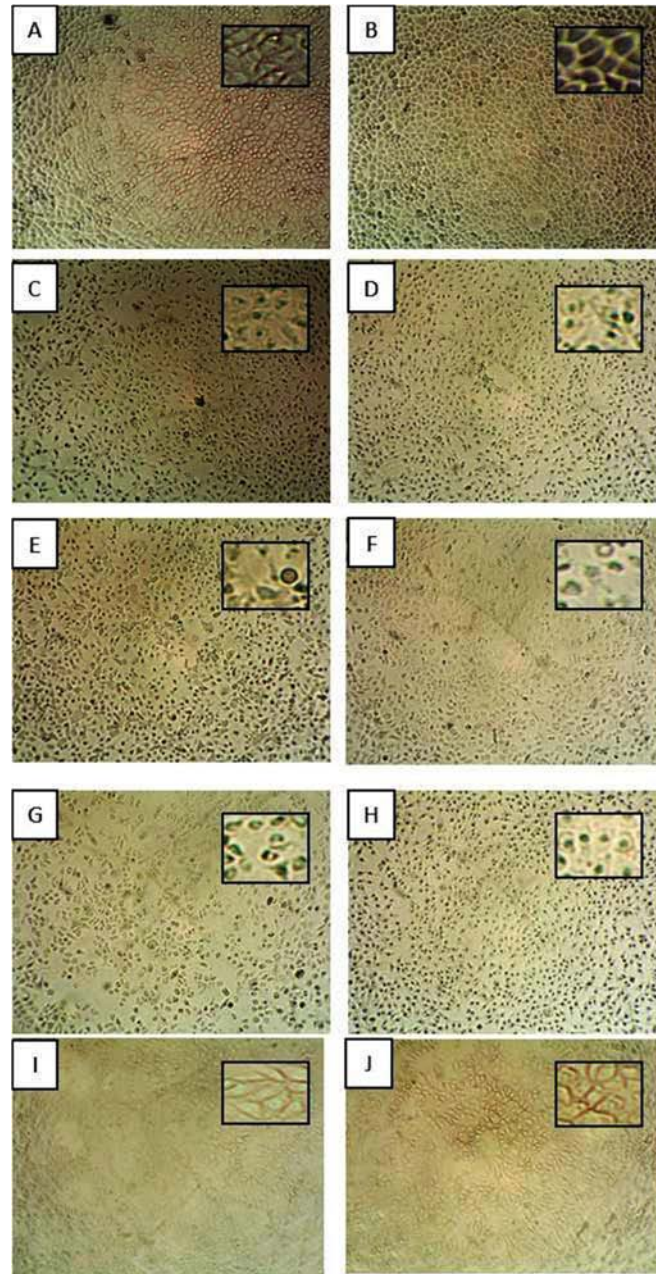


Figura 67. **A e B:** Controle; **C:** Estudo farmacológico I - 50  $\mu$ l de ArC a 2,8 mM e 50  $\mu$ l Dacarbazina a 6,85 mM; **D :** Estudo farmacológico I - 50  $\mu$ l de ArC a 2,8 mM e 50  $\mu$ l Dacarbazina a 0,215 mM; **E:** Estudo farmacológico II - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1,513 mM e 50  $\mu$ l de ArC 5 mM; **F:** Estudo farmacológico II - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1,513 mM e 50  $\mu$ l de ArC 1,25 mM; **G:** Estudo farmacológico III - 50  $\mu$ l ArC a 2,8 mM e 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F 100 mM; **H:** Estudo farmacológico III - 50  $\mu$ l ArC a 2,8 mM e 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 3,125 mM; **I:** Estudo farmacológico IV - 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 76,29 mM e 50  $\mu$ l de ArC a 5 mM; **J:** Estudo farmacológico IV - 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 76,29 mM e 50  $\mu$ l de ArC a 0,625 mM.

Fotomicrografias representativas dos efeitos das associações farmacológicas em fibroblastos normais, de origem murino L929 no período de 24 horas, obtidas em microscópio invertido das placas de cultura. Estudos de V ao VIII.

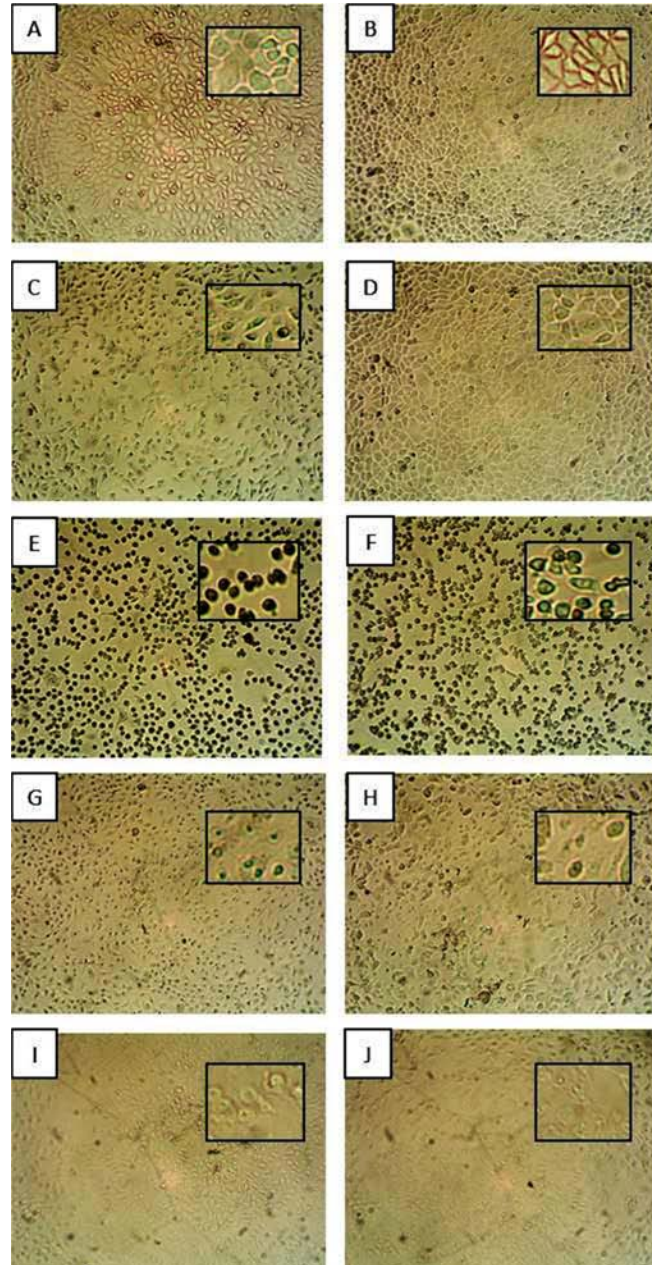


Figura 68. L929 A e B: Controle; C: Estudo farmacológico V - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1,513 mM e 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 100 mM; D : Estudo farmacológico V - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1,513 mM e 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 3,125 mM; E: Estudo farmacológico VI - 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 76 mM e 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 13,75 mM; F: Estudo farmacológico VI - 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 76 mM e 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 0,859 mM; G: Estudo farmacológico VII - 50  $\mu$ l Paclitaxel a 31,14  $\mu$ M e 50  $\mu$ l de ArC a 0,562 mM; H: Estudo farmacológico VII - 50  $\mu$ l Paclitaxel a 31,14  $\mu$ M e 50  $\mu$ l de ArC a 0,281 mM; I: Estudo farmacológico VIII - 50  $\mu$ l ArC a 2,8 mM e 50  $\mu$ l de Paclitaxel a 15  $\mu$ M; J: Estudo farmacológico VIII - 50  $\mu$ l Artepelin C a 2,8 mM e 50  $\mu$ l de Paclitaxel a 5,25  $\mu$ M. . Imagens obtidas em microscópio Zeiss invertido objetiva 4x.

Estudo da associação farmacológica em células de melanoma de origem humana SKmel-28 pelo período de 24 horas.

#### Estudo Farmacológico I – 24 Horas SKmel-28

ArC (1,2mM) + Quimioterápico dacarbazina

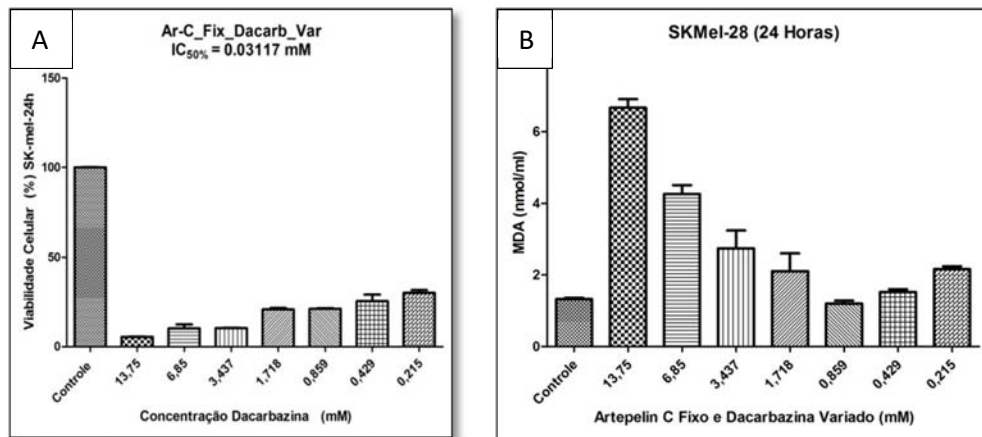


Figura 69. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano SKmel-28 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 1,2 mM e Dacarbazina em diluição a partir de 13,75 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

#### Estudo Farmacológico II – 24 Horas SKmel-28

Quimioterápico dacarbazina (1,75mM) + ArC

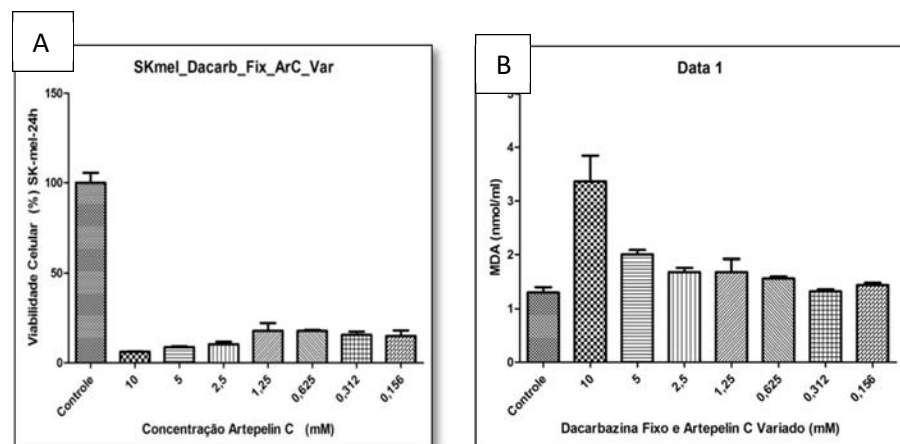


Figura 70. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano SKmel-28 frente ao tratamento com dacarbazina na concentração fixa de 1,75 mM e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.



Estudo da associação farmacológica em células de melanoma de origem humana SKmel-28 pelo período de 24 horas.

#### Estudo Farmacológico III – 24 Horas

SKmel-28 ArC (1,2mM) + 2AEH<sub>2</sub>F

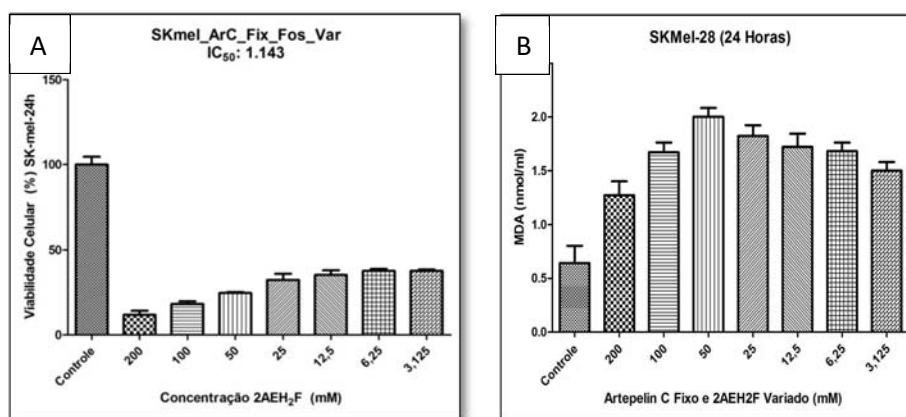


Figura 71. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano SKmel-28 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 1,2 mM e 2-AEH<sub>2</sub>F em diluição a partir de 200 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

#### Estudo Farmacológico IV – 24 Horas

SKmel-28 2-AEH<sub>2</sub>F (62,32mM) + ArC

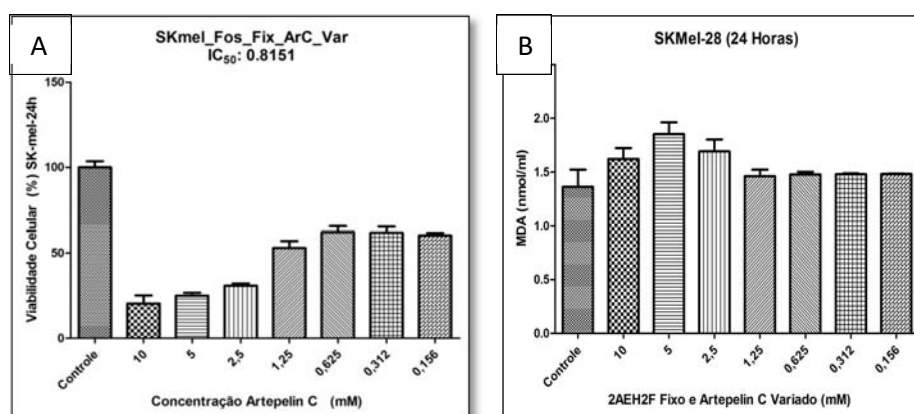


Figura 72. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano SKmel-28 frente ao tratamento com 2-AEH<sub>2</sub>F na concentração fixa de 62,32 mM e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em células de melanoma de origem humana SKmel-28 pelo período de 24 horas.

#### Estudo Farmacológico V - 24 Horas

SKmel-28 Quimioterápico dacarbazina (1,75mM) + 2-AEH<sub>2</sub>F

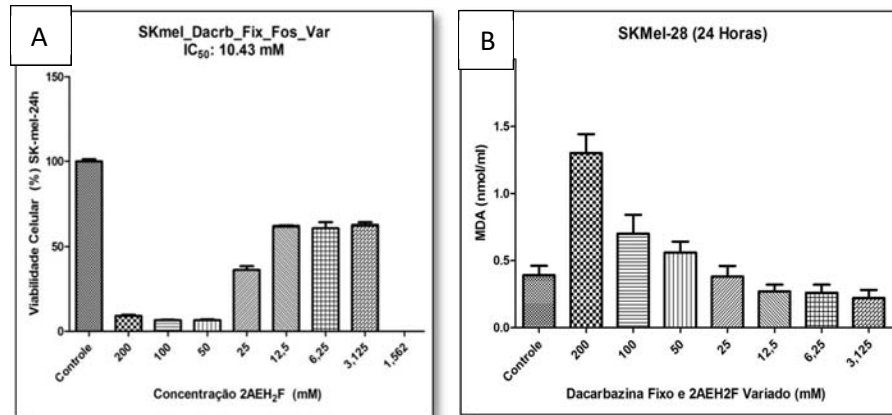


Figura 73. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano SKmel-28 frente ao tratamento com dacarbazina na concentração fixa de 1,75 mM e 2AEH<sub>2</sub>F em diluição a partir de 200 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

#### Estudo Farmacológico VI – 24 Horas SKMel-28

2-AEH<sub>2</sub>F (62,32mM) + Quimioterápico dacarbazina

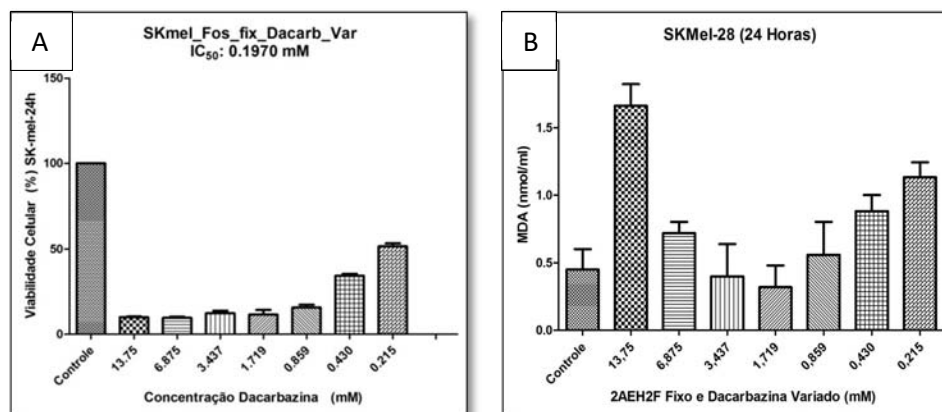


Figura 74. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano SKmel-28 frente ao tratamento 2-AEH<sub>2</sub>F na concentração fixa de 62,32 mM e dacarbazina em diluição a partir de 13,75 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em células de melanoma de origem humana SKmel-28 pelo período de 24 horas.

#### Estudo Farmacológico VII – 24 Horas SKmel-28

Quimioterápico paclitaxel (24,28  $\mu\text{M}$ ) + ArC

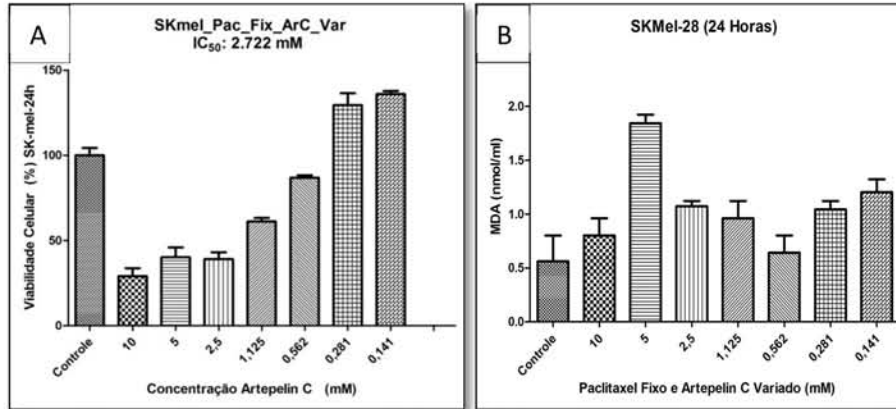


Figura 75. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano SKmel-28 frente ao tratamento com paclitaxel na concentração fixa de 24,28  $\mu\text{M}$  e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

#### Estudo Farmacológico VIII – 24 Horas SKmel-28

ArC (1,2 mM) + Quimioterápico paclitaxel

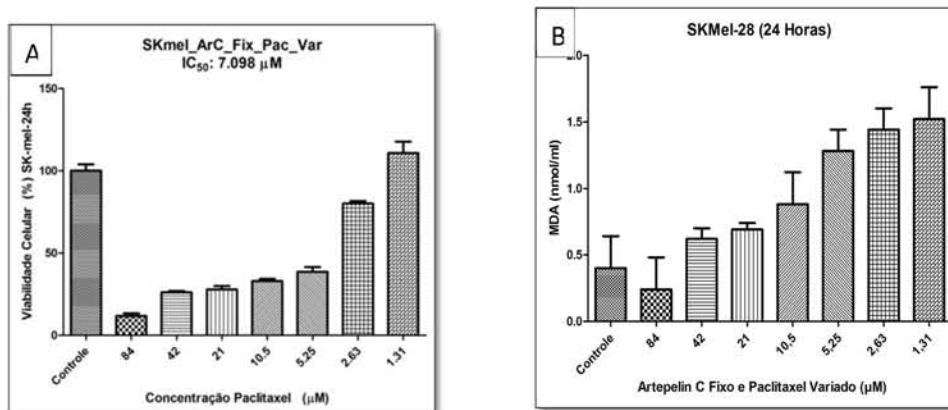


Figura 76. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano SKmel-28 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 1,20 mM e paclitaxel em diluição a partir de 84  $\mu\text{M}$ . **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Fotomicrografias representativas dos efeitos das associações farmacológicas em células de melanoma de origem humana Skmel-28 no período de 24 horas, obtidas em microscópio invertido das placas de cultura. Estudo de I ao IV.

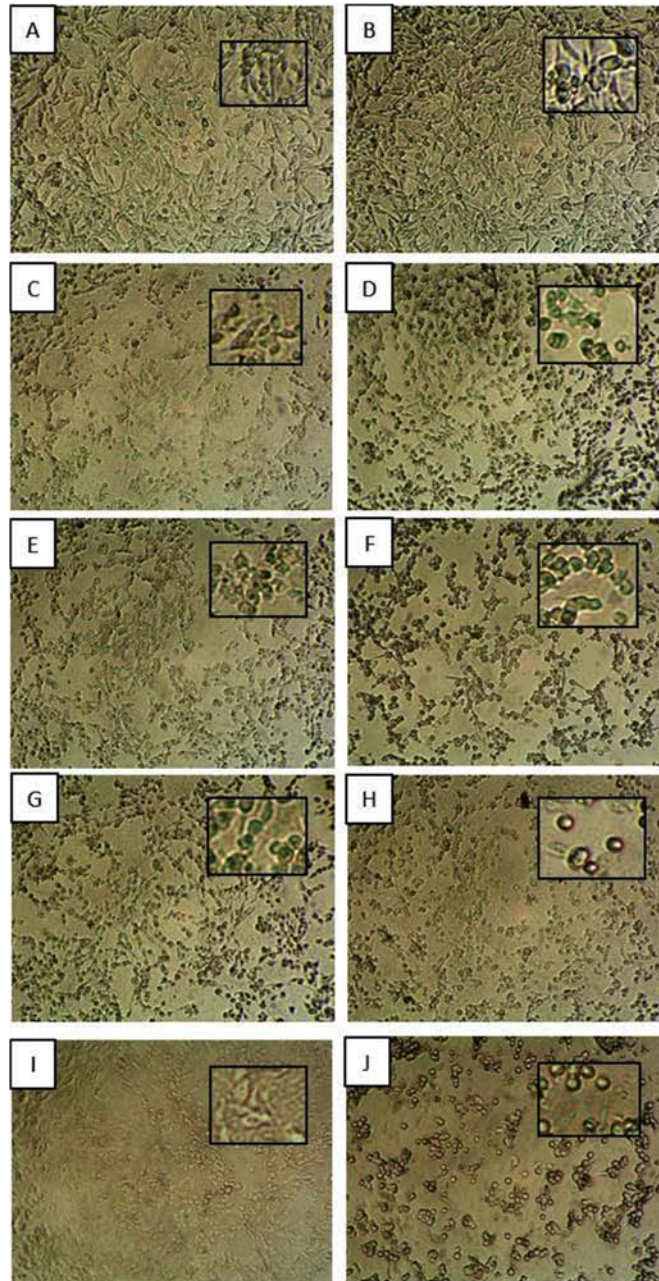


Figura 77. Skmel-28 A e B: Controle; C: Estudo farmacológico I - 50  $\mu$ l de ArC a 1,2 mM e 50  $\mu$ l Dacarbazina a 13,75 mM; D : Estudo farmacológico I - 50  $\mu$ l de ArC a 1,2 mM e 50  $\mu$ l Dacarbazina a 0,43 mM; E: Estudo farmacológico II - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1,75 mM e 50  $\mu$ l de ArC 10 mM; F: Estudo farmacológico II - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1,75 mM e 50  $\mu$ l de ArC 1,25 mM; G: Estudo farmacológico III - 50  $\mu$ l ArC a 1,2 mM e 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F 50 mM; H: Estudo farmacológico III - 50  $\mu$ l ArC a 1,2 mM e 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 12,5 mM; I: Estudo farmacológico IV - 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 52 mM e 50  $\mu$ l de ArC a 10 mM; J: Estudo farmacológico IV - 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 52 mM e 50  $\mu$ l de ArC a 0,156 mM. Imagens obtidas em microscópio Zeiss invertido objetiva 4x.

Fotomicrografias representativas dos efeitos das associações farmacológicas em células de melanoma de origem humana Skmel-28 no período de 24 horas, obtidas em microscópio invertido das placas de cultura. Estudo de V ao VIII.

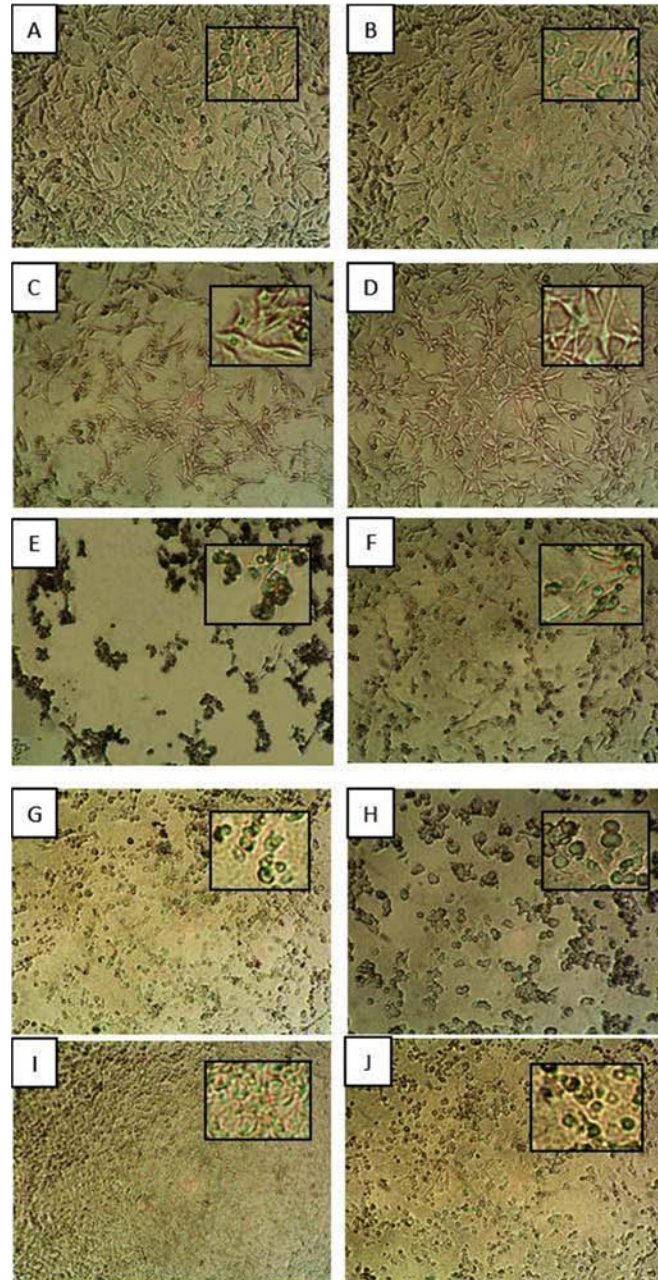


Figura 78. Skmel-28 A e B: Controle; C: Estudo farmacológico V - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1,75 mM e 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 100 mM; D : Estudo farmacológico V - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1,75 mM e 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 12,25 mM; E: Estudo farmacológico VI - 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 62 mM e 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 3,437 mM; F: Estudo farmacológico VI - 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 62 mM e 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 0,215 mM; G: Estudo farmacológico VII - 50  $\mu$ l Paclitaxel a 24  $\mu$ M e 50  $\mu$ l de ArC a 5 mM; H: Estudo farmacológico VII - 50  $\mu$ l Paclitaxel a 24  $\mu$ M e 50  $\mu$ l de Artepelin C a 1,125 mM; I: Estudo farmacológico VIII - 50  $\mu$ l ArC a 1,2 mM e 50  $\mu$ l de Paclitaxel a 31  $\mu$ M; J: Estudo farmacológico VIII - 50  $\mu$ l ArC a 1,2 mM e 50  $\mu$ l de Paclitaxel a 5,25  $\mu$ M. Imagens obtidas em microscópio Zeiss invertido objetiva 4x.

Estudo da associação farmacológica em células de melanoma murino B16F10 pelo período de 24 horas.

#### Estudo Farmacológico I - 24 Horas B16F10

ArC (1,01 mM) + Quimioterápico dacarbazina

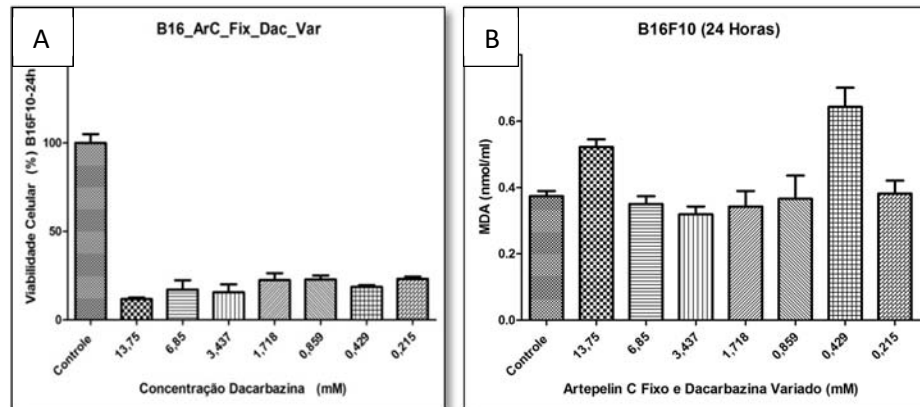


Figura 79. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 1 mM e dacarbazina em diluição a partir de 13,75 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

#### Estudo Farmacológico II - 24 Horas B16F10

Quimioterápico dacarbazina (1,03 mM) + ArC

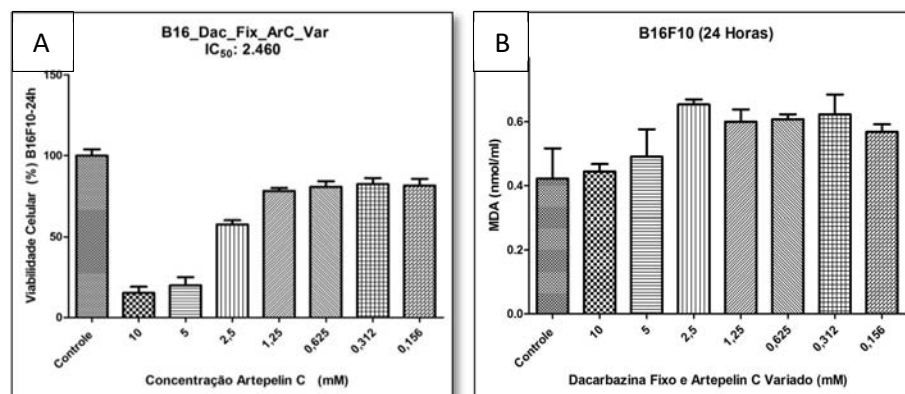


Figura 80. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com dacarbazina na concentração fixa de 1 mM e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em células de melanoma murino B16F10 pelo período de 24 horas.

### Estudo Farmacológico III – 24 Horas

B16F10 ArC (1,01mM) + 2-AEH<sub>2</sub>F

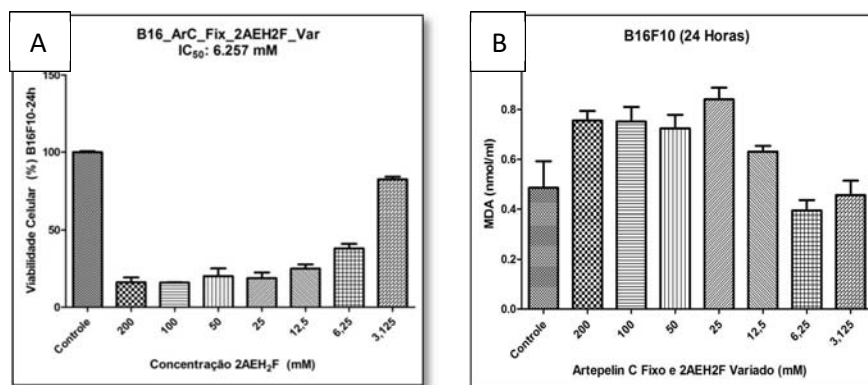


Figura 81. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com ArC na concentração fixa de 1 mM e 2-AEH<sub>2</sub>F em diluição a partir de 200 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

### Estudo Farmacológico IV – 24 Horas B16F10

2-AEH<sub>2</sub>F (41mM) + ArC

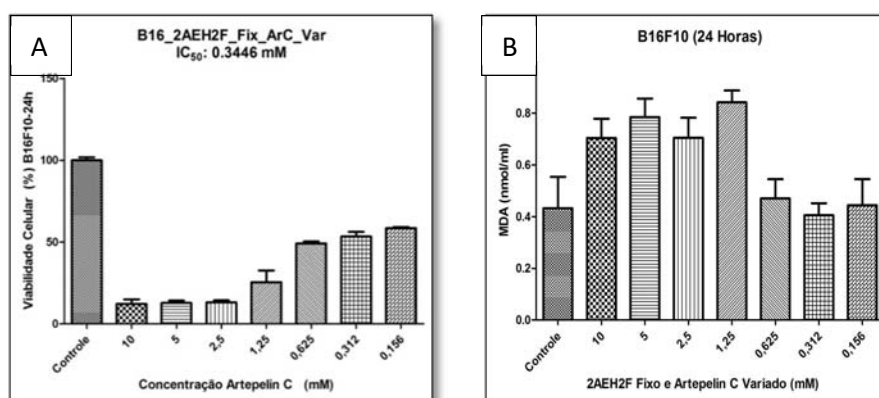


Figura 82. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com 2-AEH<sub>2</sub>F na concentração fixa de 41 mM e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo da associação farmacológica em células de melanoma murino B16F10 pelo período de 24 horas.

Estudo Farmacológico V - 24 Horas B16F10  
Quimioterápico dacarbazina (1,03mM)+ 2-AEH<sub>2</sub>F

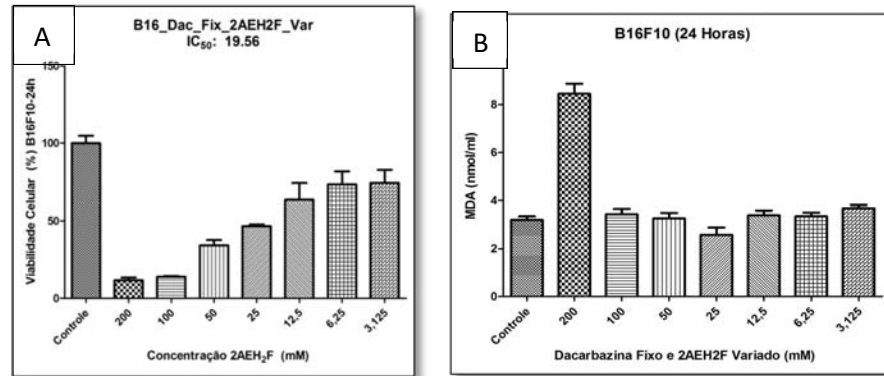


Figura 83. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com dacarbazina na concentração fixa de 1 mM e 2AEH<sub>2</sub>F em diluição a partir de 200 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo Farmacológico VI – 24 Horas

B16F10 2AEH<sub>2</sub>F (28mM) + QT Dacarbazina

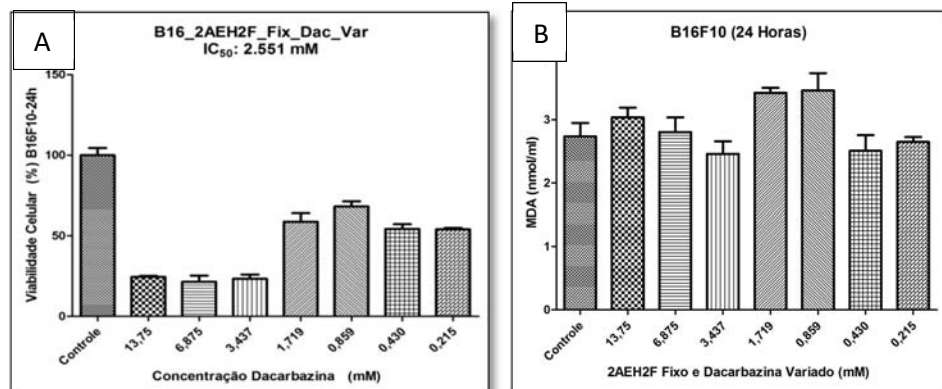


Figura 84 Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com 2AEH<sub>2</sub>F na concentração fixa de 41 mM e Dacarbazina em diluição a partir de 13,75 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.



Estudo da associação farmacológica em células de melanoma murino B16F10 pelo período de 24 horas.

Estudo Farmacológico VII - 24 Horas B16F10  
Quimioterápico paclitaxel (17  $\mu$ M) + ArC

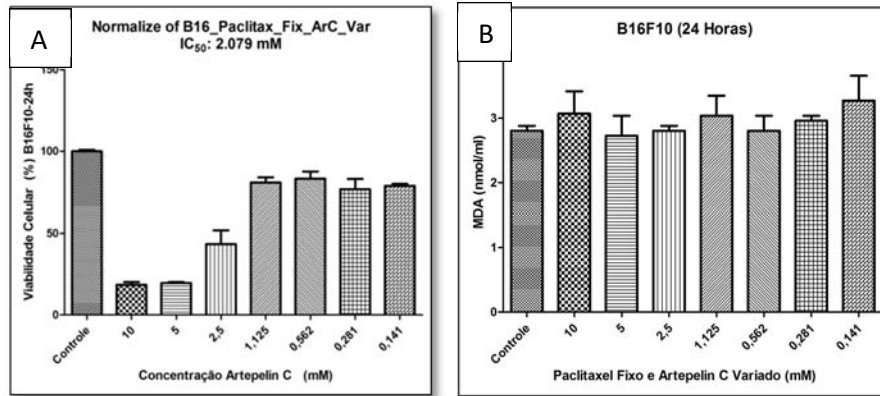


Figura 85. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com paclitaxel na concentração fixa de 17  $\mu$ M e ArC em diluição a partir de 10 mM. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Estudo Farmacológico VIII - 24 Horas B16F10

ArC (1,01) + Quimioterápico paclitaxel

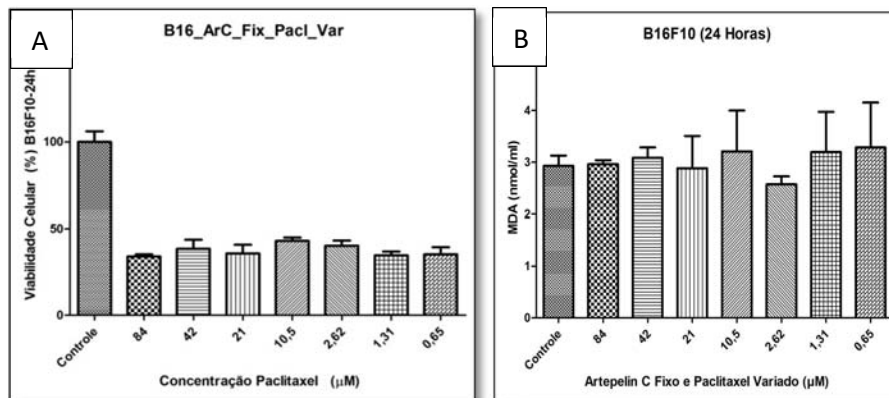


Figura 86. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com ArC na concentração de 1 mM e paclitaxel em diluição a partir de 84  $\mu$ M. **A:** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. **B:** Avaliação da produção de lipídios peroxidados polissaturados (LPO) produzidos pelas células frente aos tratamentos.

Fotomicrografias representativas dos efeitos das associações farmacológicas em células de melanoma de origem murino B16F10 no período de 24 horas, obtidas em microscópio invertido das placas de cultura. Estudo de I ao IV.

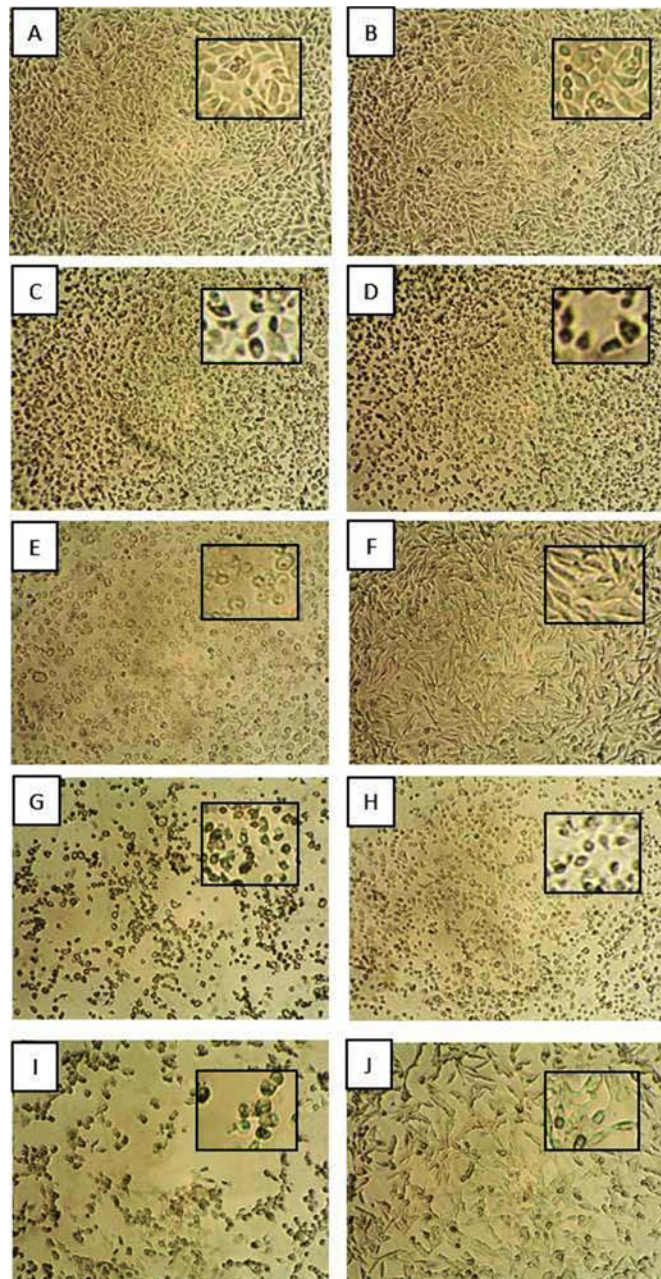


Figura 87 . B16F10 A e B: Controle; C: Estudo farmacológico I - 50  $\mu$ l de ArC a 1 mM e 50  $\mu$ l Dacarbazina a 13,75 mM; D : Estudo farmacológico I - 50  $\mu$ l de ArC a 1 mM e 50  $\mu$ l Dacarbazina a 0,43 mM; E: Estudo farmacológico II - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1 mM e 50  $\mu$ l de ArC 10 mM; F: Estudo farmacológico II - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1 mM e 50  $\mu$ l de ArC 0,312 mM; G: Estudo farmacológico III - 50  $\mu$ l ArC a 1 mM e 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F 100 mM; H: Estudo farmacológico III - 50  $\mu$ l ArC a 1 mM e 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 6,25 mM; I: Estudo farmacológico IV - 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 41 mM e 50  $\mu$ l de ArC a 10 mM; J: Estudo farmacológico IV - 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 41 mM e 50  $\mu$ l de ArC a 1 mM. Imagens obtidas em microscópio Zeiss invertido objetiva 4x.

Fotomicrografias representativas dos efeitos das associações farmacológicas em células de melanoma de origem murino B16F10 no período de 24 horas, obtidas em microscópio invertido das placas de cultura. Estudo de V ao VIII.

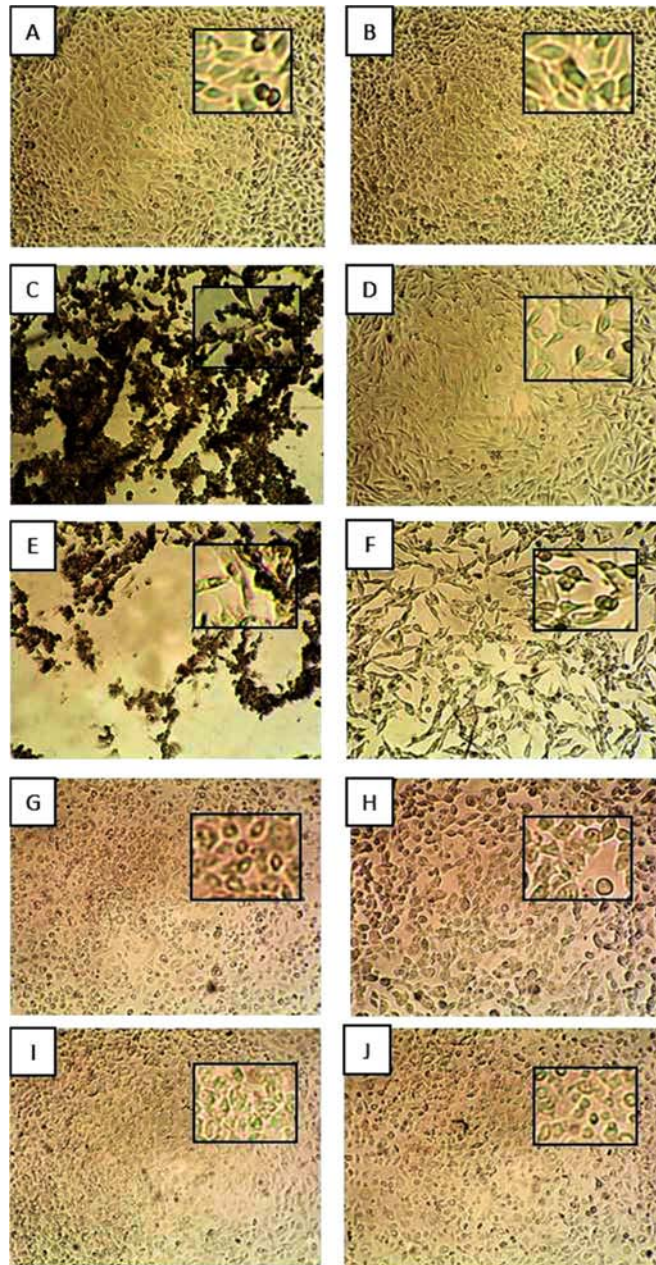
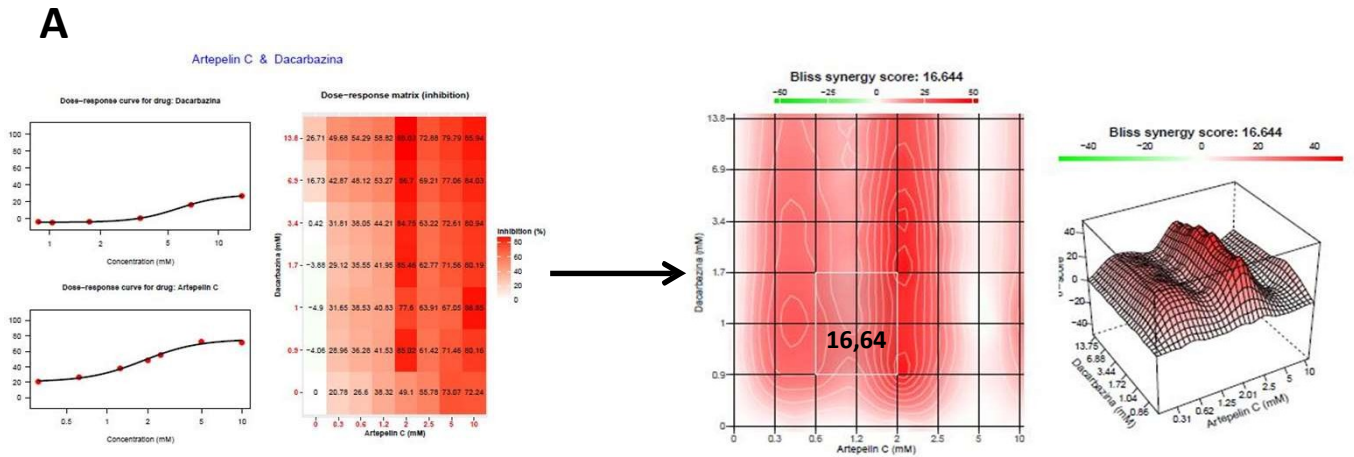


Figura 88. A e B: Controle; C: Estudo farmacológico V - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1 mM e 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 100 mM; D : Estudo farmacológico V - 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 1 mM e 50  $\mu$ l 2AEH<sub>2</sub>F a 3,125 mM; E: Estudo farmacológico VI - 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 41 mM e 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 3,437 mM; F: Estudo farmacológico VI - 50  $\mu$ l de 2AEH<sub>2</sub>F a 41 mM e 50  $\mu$ l de Dacarbazina a 0,46 mM; G: Estudo farmacológico VII - 50  $\mu$ l Paclitaxel a 17  $\mu$ M e 50  $\mu$ l de ArC a 5 mM; H: Estudo farmacológico VII - 50  $\mu$ l Paclitaxel a 17  $\mu$ M e 50  $\mu$ l de ArC a 1,125 mM; I: Estudo farmacológico VIII - 50  $\mu$ l ArC a 1 mM e 50  $\mu$ l de Paclitaxel a 10  $\mu$ M; J: Estudo farmacológico VIII - 50  $\mu$ l ArC a 1 mM e 50  $\mu$ l de Paclitaxel a 1,31  $\mu$ M. Imagens obtidas em microscópio Zeiss invertido objetiva 4x.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*.

Avaliação em fibroblastos normais de origem humana FN1 (Dacarbazina x ArC).



**B**

Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
FN1	ArC (mM) - Dacarbazina (mM)	16,64	Sinergismo	Bliss

Figura 89. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do quimioterápico dacarbazina com o extrato ArC em fibroblastos normais de origem humana FN1.

**A:** A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*.

Avaliação em fibroblastos normais de origem humana FN1 (ArC x 2-AEH<sub>2</sub>F).

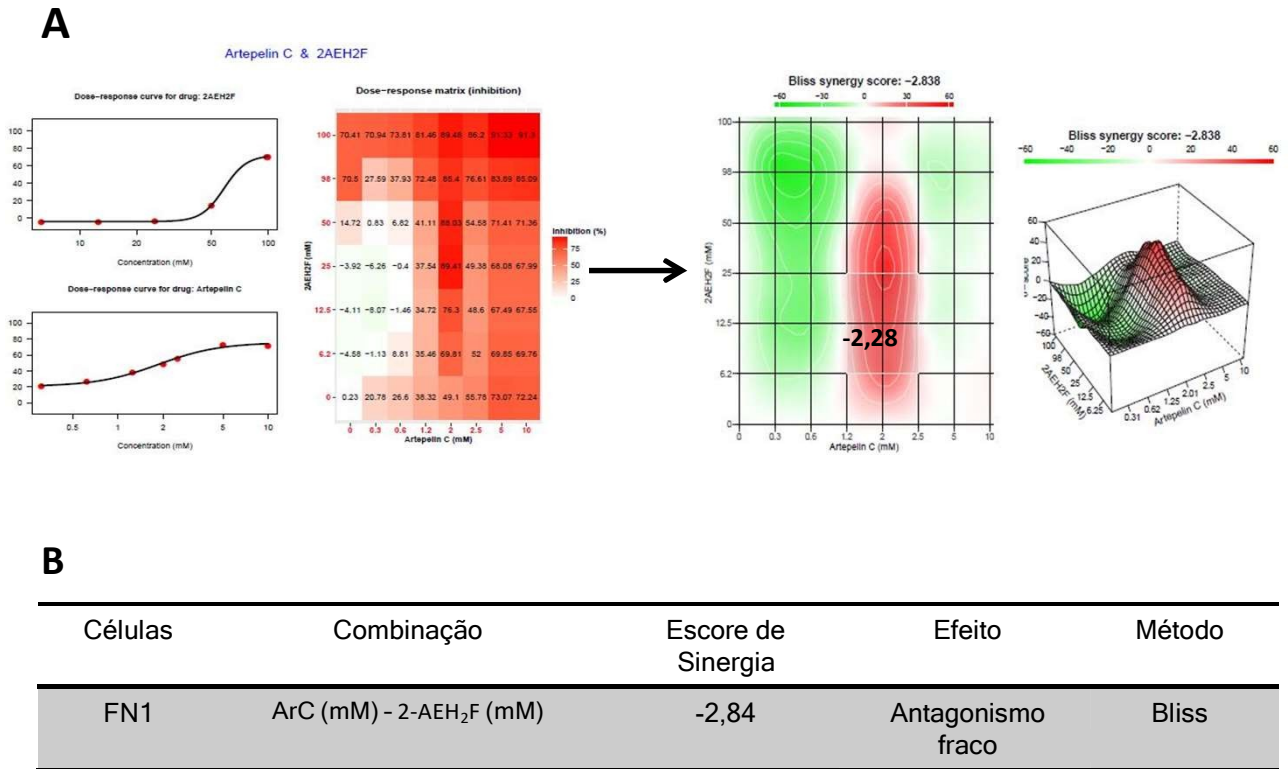
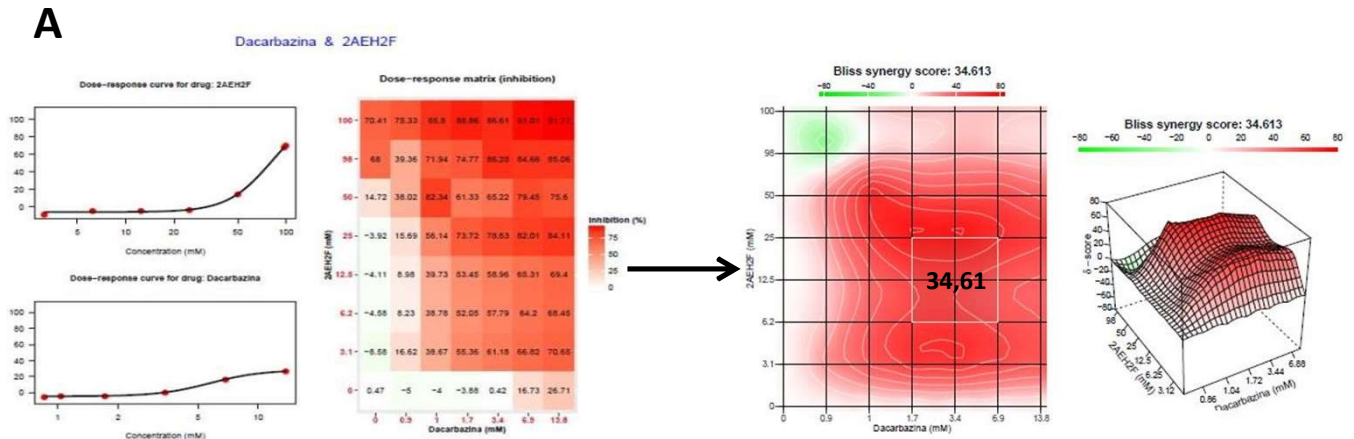


Figura 90. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F em fibroblastos normais de origem humana FN1.

**A:** O efeito antagonístico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*.

Avaliação em fibroblastos normais de origem humana FN1 (Dacarbazina x 2-AEH<sub>2</sub>F).



**B**

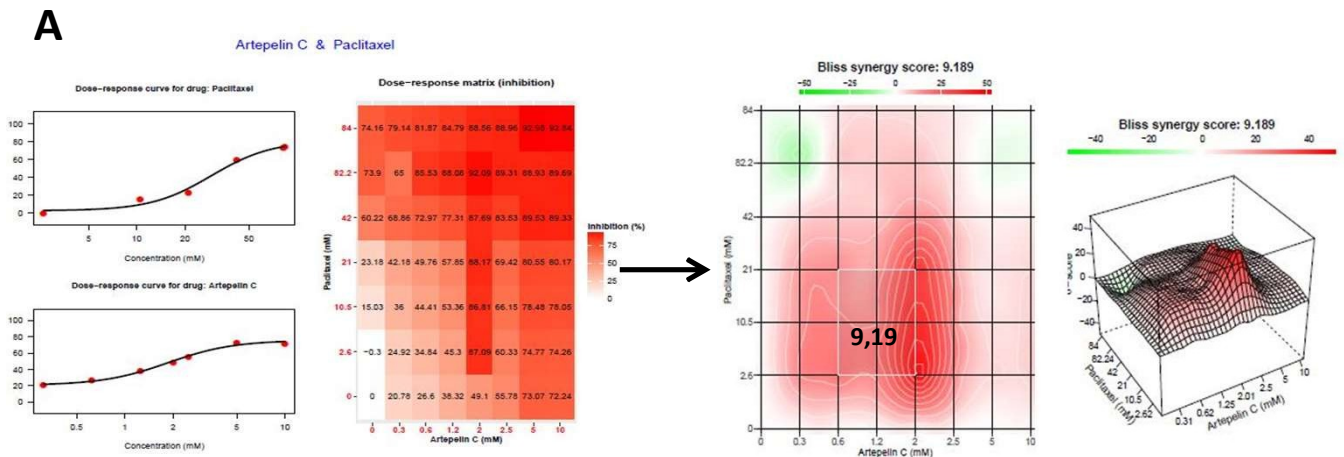
Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
FN1	Dacarbazina (mM) - 2AEH <sub>2</sub> F (mM)	34,61	Sinergismo muito forte	Bliss

Figura 91. Determinação do efeito antagônico, aditivo ou sinérgico da associação do quimioterápico dacarbazina com o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F em fibroblastos normais de origem humana FN1.

**A:** O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*.

Avaliação em fibroblastos normais de origem humana FN1 (ArC x Paclitaxel).



**B**

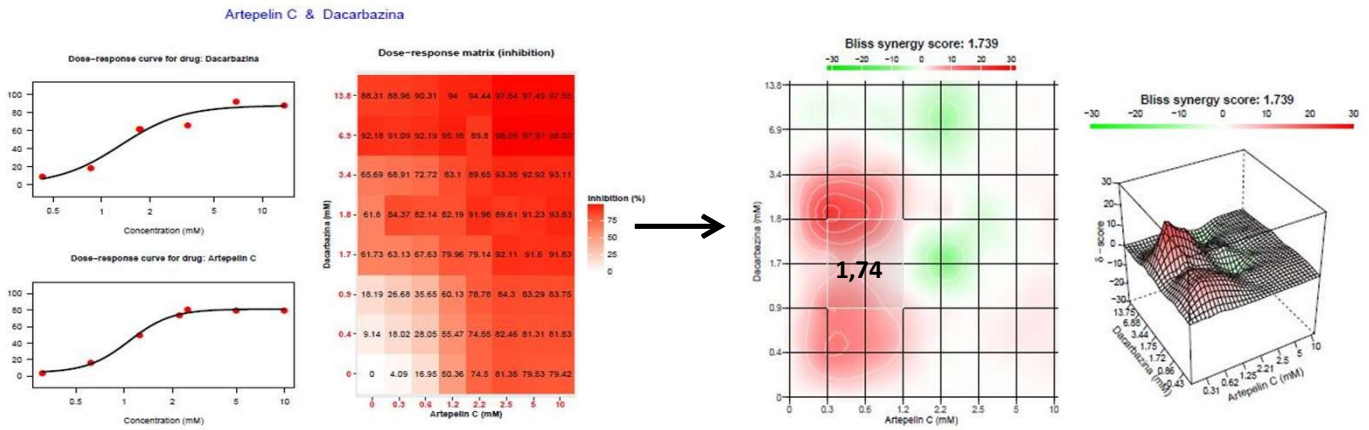
Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
FN1	ArC (mM) - Paclitaxel ( $\mu$ M)	9,19	Sinergismo moderado	Bliss

Figura 92. Determinação do efeito antagônico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com o quimioterápico paclitaxel em fibroblastos normais de origem humana FN1.

**A:** O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em melanoma de origem humana SKmel-28 (Dacarbazina x ArC).

**A**



**B**

Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
SKmel-28	ArC (mM) - Dacarbazina (mM)	1,74	Aditivo	Bliss

Figura 93. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com o quimioterápico dacarbazina em células de melanoma de origem humana SKmel-28.

**A:** O efeito antagonístico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.



Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em melanoma de origem humana Skmel-28 (ArC x 2-AEH<sub>2</sub>F).

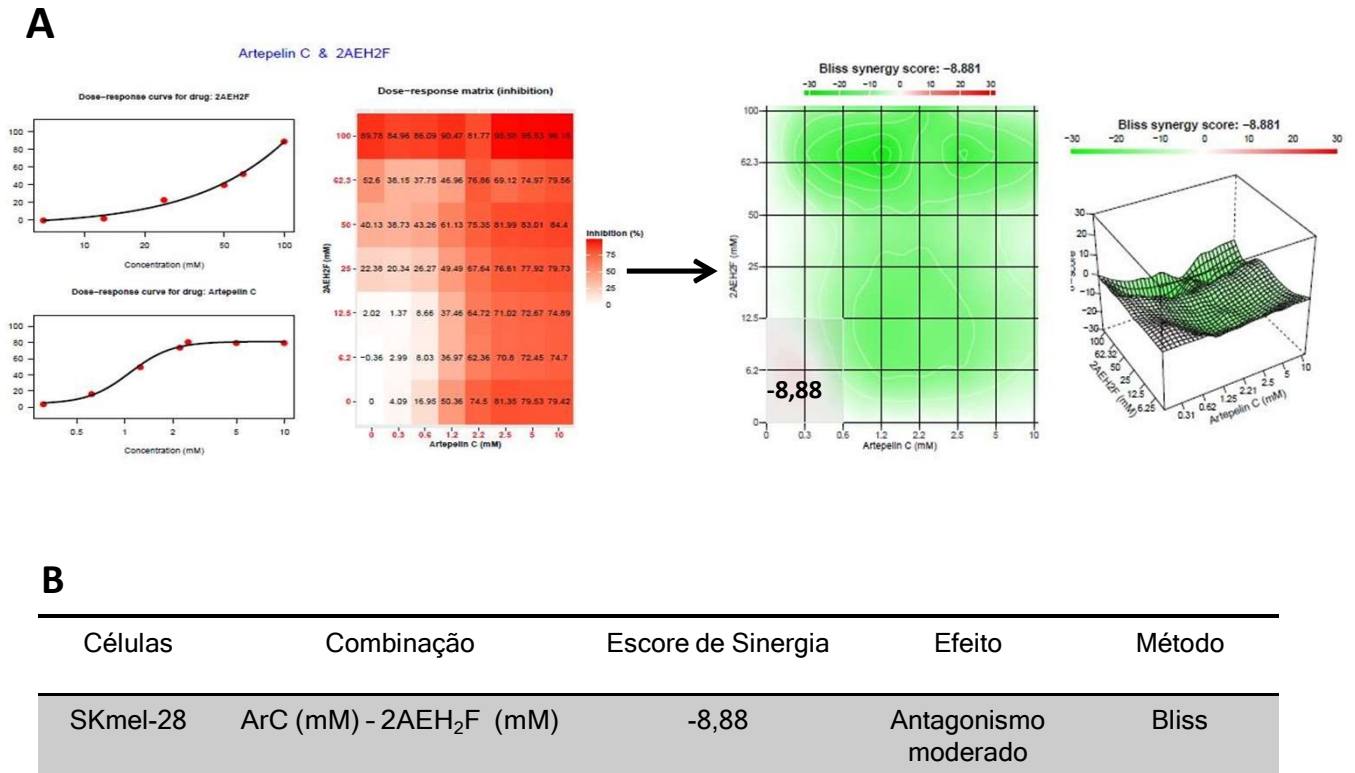
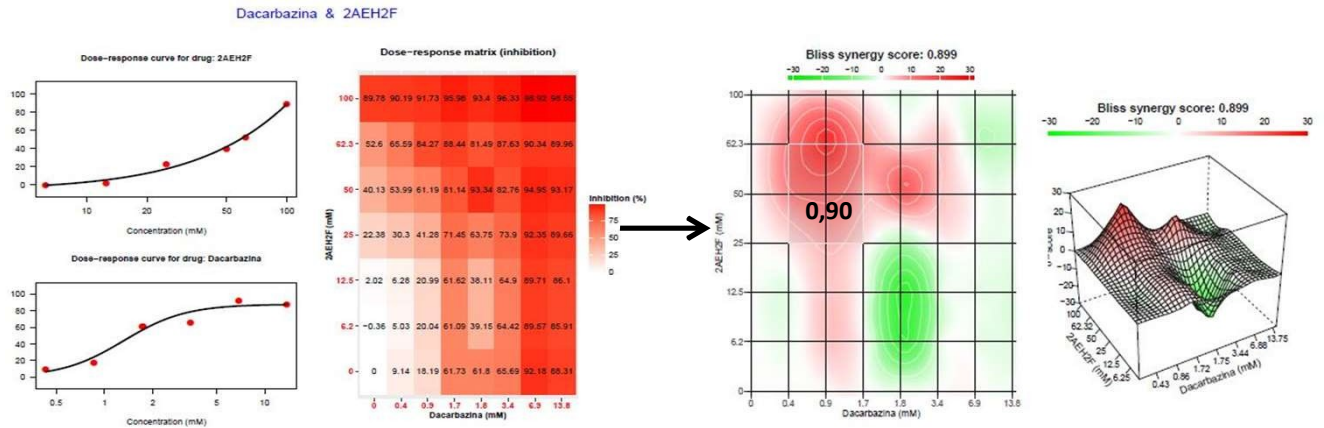


Figura 94. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F em células de melanoma de origem humana SKmel-28.

**A:** O efeito antagonístico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em melanoma de origem humana Skmel-28 (Dacarbazina x 2-AEH<sub>2</sub>F).

**A**



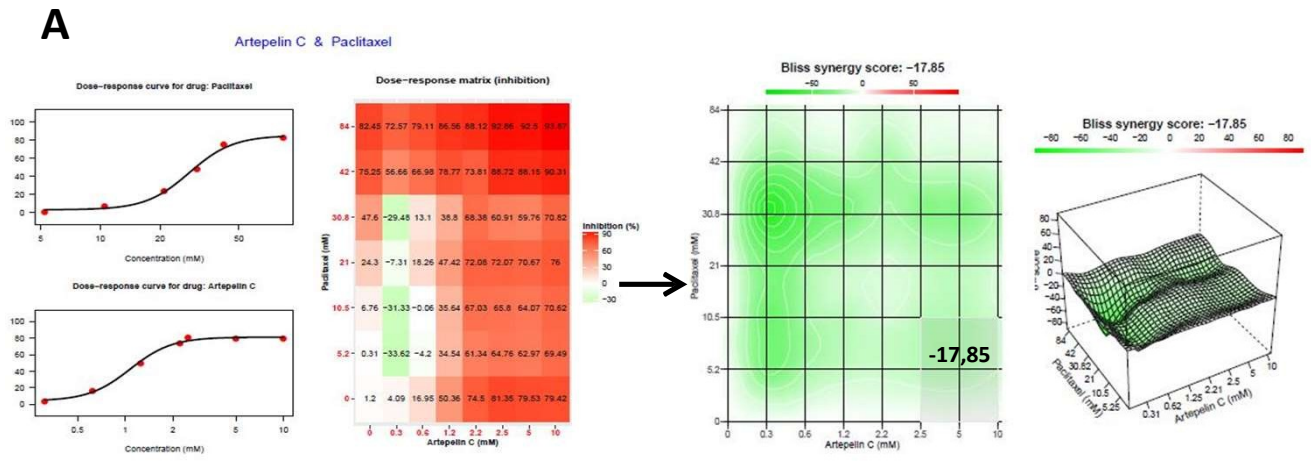
**B**

Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
SKmel-28	Dacarbazina (mM) - 2AEH <sub>2</sub> F (mM)	0,90	Aditivo	Bliss

Figura 95. Determinação do efeito antagônico, aditivo ou sinérgico da associação do quimioterápico dacarbazina com o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F em células de melanoma de origem humana SKmel-28.

**A:** O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em melanoma de origem humana Skmel-28 (ArC x Paclitaxel).



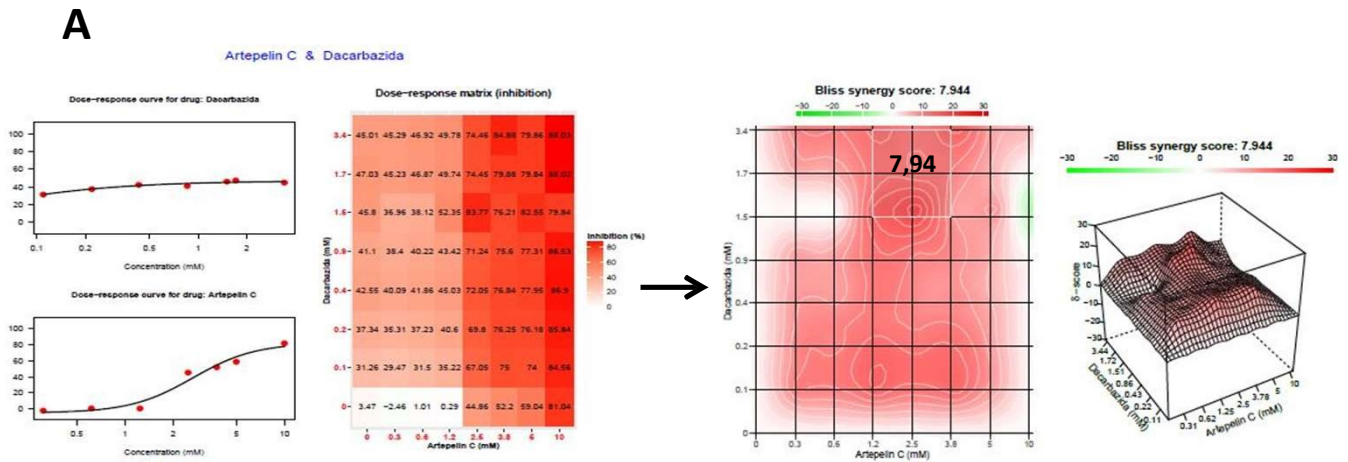
**B**

Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
SKmel-28	ArC (mM) - Paclitaxel (µM)	-17,85	Antagonismo	Bliss

Figura 96. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com o quimioterápico paclitaxel em células de melanoma de origem humana SKmel-28.

**A:** O efeito antagonístico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em fibroblastos murino L929 (ArC x Dacarbazina).



**B**

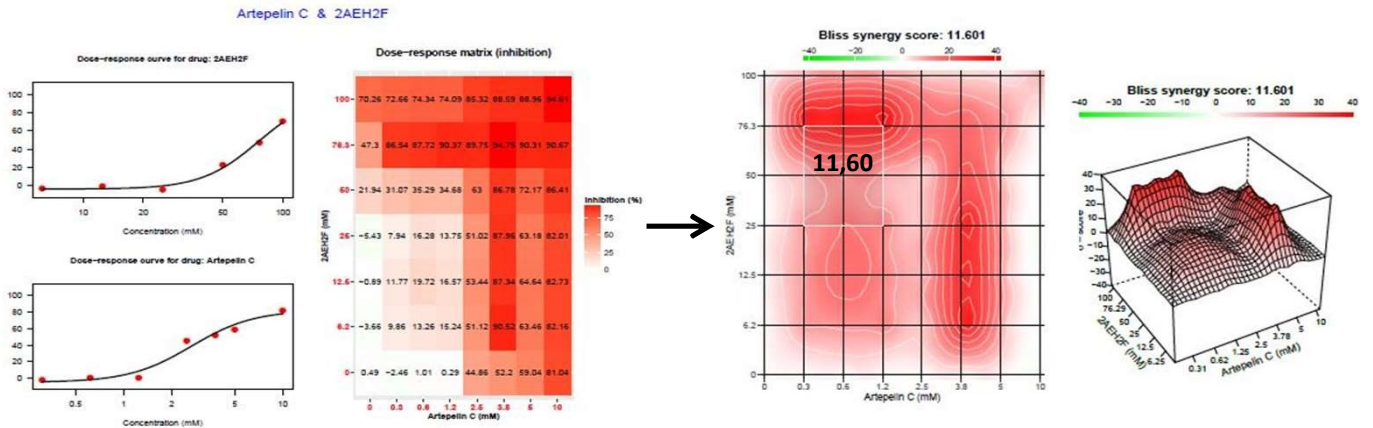
Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
L929	Dacarbazina (mM) - ArC (mM)	7,94	Sinergismo moderado	Bliss

Figura 97. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do quimioterápico dacarbazina com o extrato ArC em fibroblastos murino L929.

**A:** O efeito antagonístico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em fibroblastos murino L929 (ArC x 2-AEH<sub>2</sub>F).

**A**



**B**

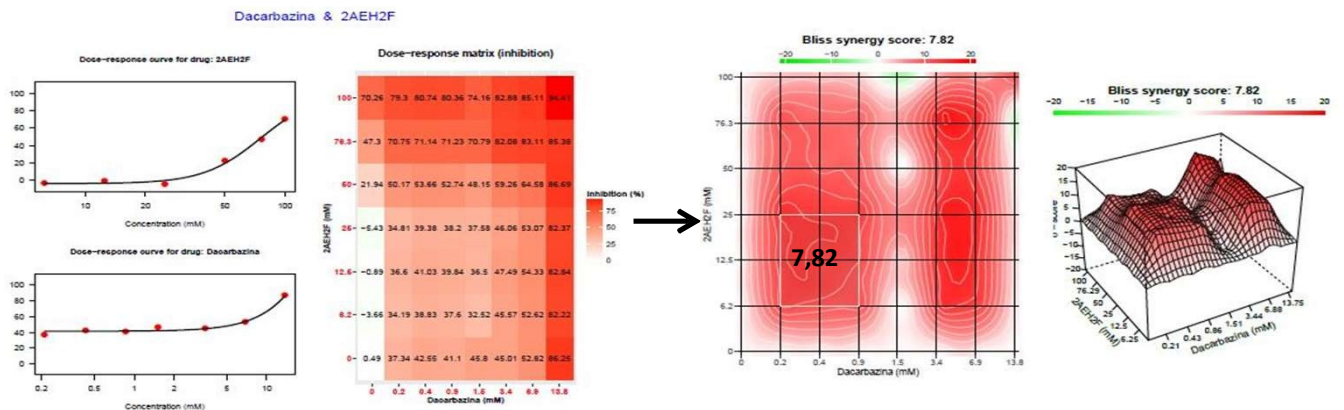
Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
L929	ArC (mM) - 2-AEH <sub>2</sub> F (mM)	11,60	Sinergismo	Bliss

Figura 98. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com o monofosfoéster 2-AEH<sub>2</sub>F em fibroblastos murino L929.

**A:** O efeito antagonístico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em fibroblastos murino L929 (Dacarbazina x 2-AEH<sub>2</sub>F).

**A**



**B**

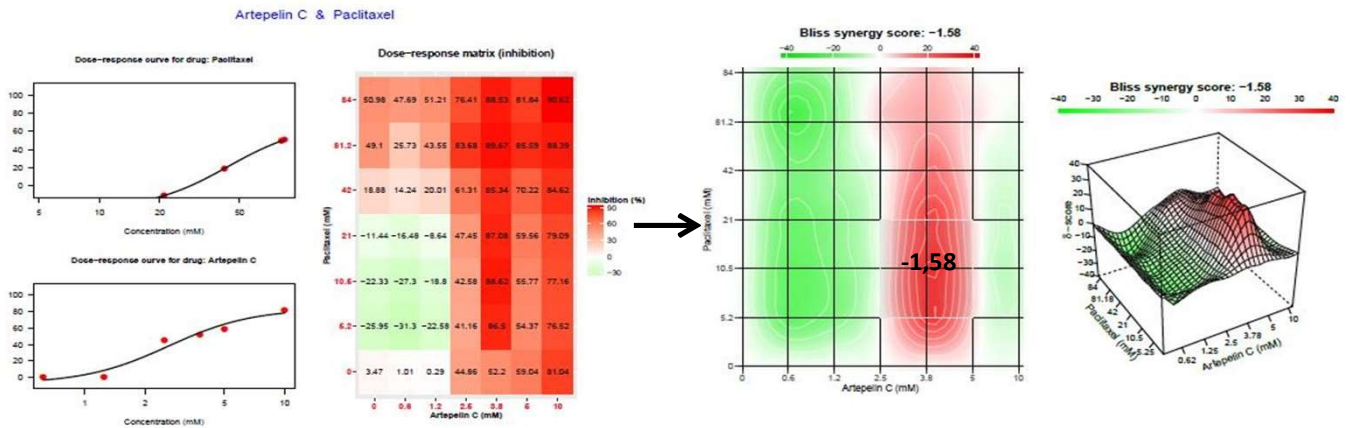
Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
L929	Dacarbazina (mM) - 2-AEH <sub>2</sub> F (mM)	7,82	Sinergismo moderado	Bliss

Figura 99. Determinação do efeito antagônico, aditivo ou sinérgico da associação do quimioterápico dacarbazina com o monofosfoéster 2-AEH<sub>2</sub>F em fibroblastos murino L929.

**A:** O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em fibroblastos murino L929 (ArC x Paclitaxel).

**A**



**B**

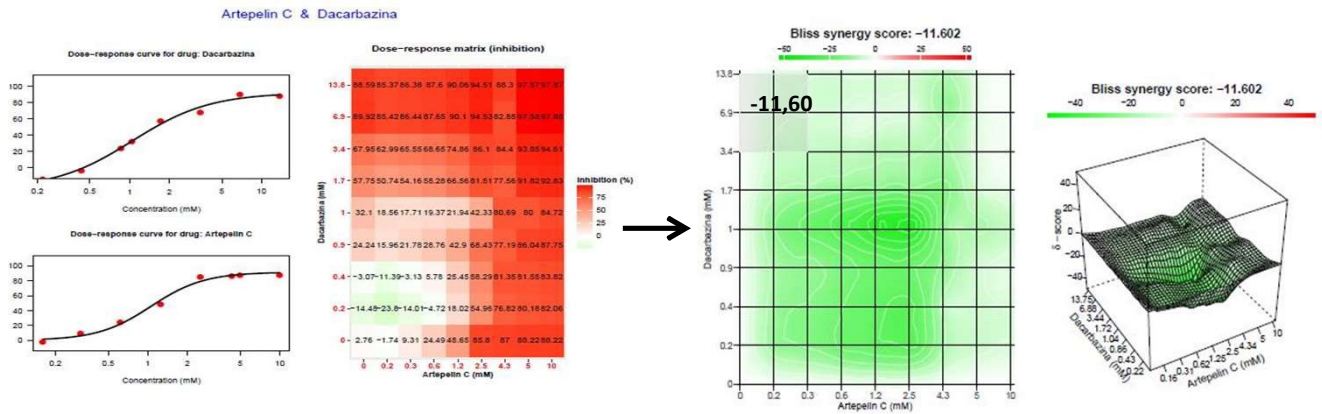
Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
L929	ArC (mM) - Paclitaxel (µM)	-1,58	Aditivo	Bliss

Figura 100. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com o quimioterápico paclitaxel em fibroblastos murino L929.

**A:** O efeito antagonístico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em melanoma murino B16F10 (ArC x Dacarbazina).

**A**



**B**

Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
B16F10	ArC (mM) - Dacarbazina (mM)	-11,60	Antagonismo	Bliss

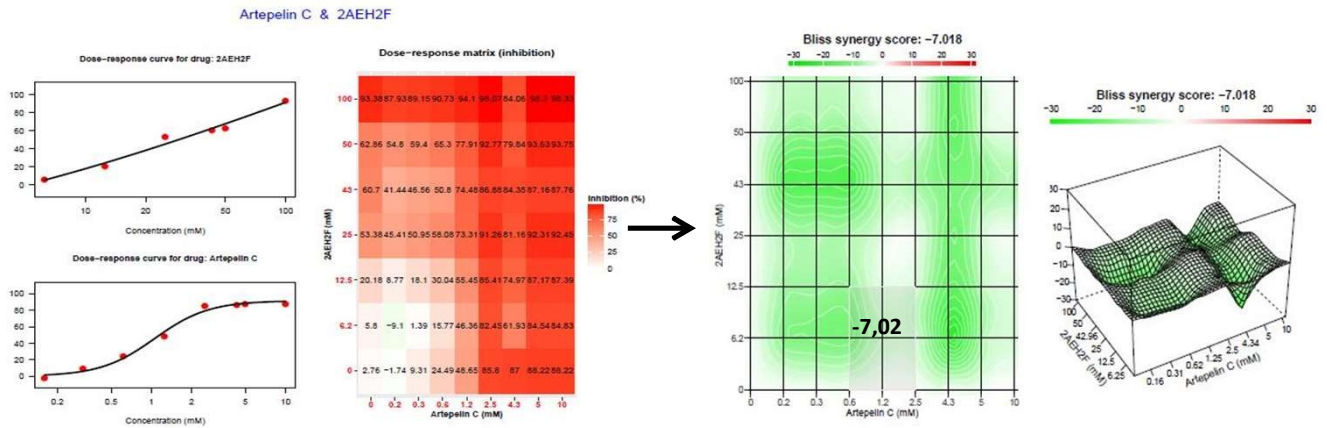
Figura 101. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com o quimioterápico dacarbazina em células de melanoma murino B16F10.

**A:** O efeito antagonístico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.



Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em melanoma murino B16F10 (ArC x 2-AEH<sub>2</sub>F).

**A**



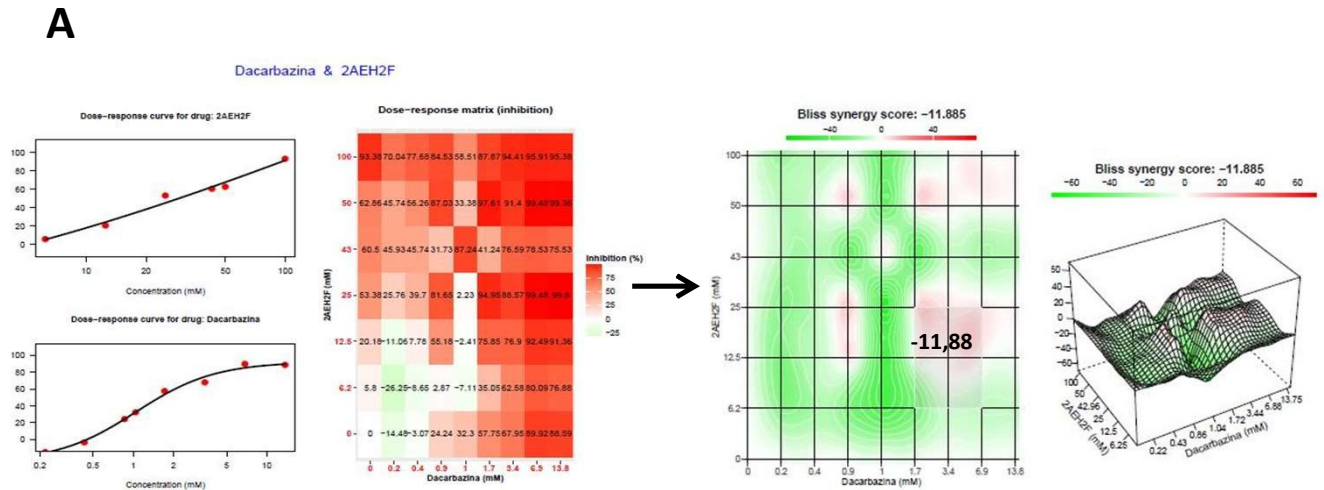
**B**

Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
B16F10	ArC (mM) - 2-AEH <sub>2</sub> F (mM)	-7,02	Antagonismo moderado	Bliss

Figura 102. Determinação do efeito antagônico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com omonofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F em células de melanoma murino B16F10.

**A:** O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em melanoma murino B16F10 (Dacarbazina x 2-AEH<sub>2</sub>F).



**B**

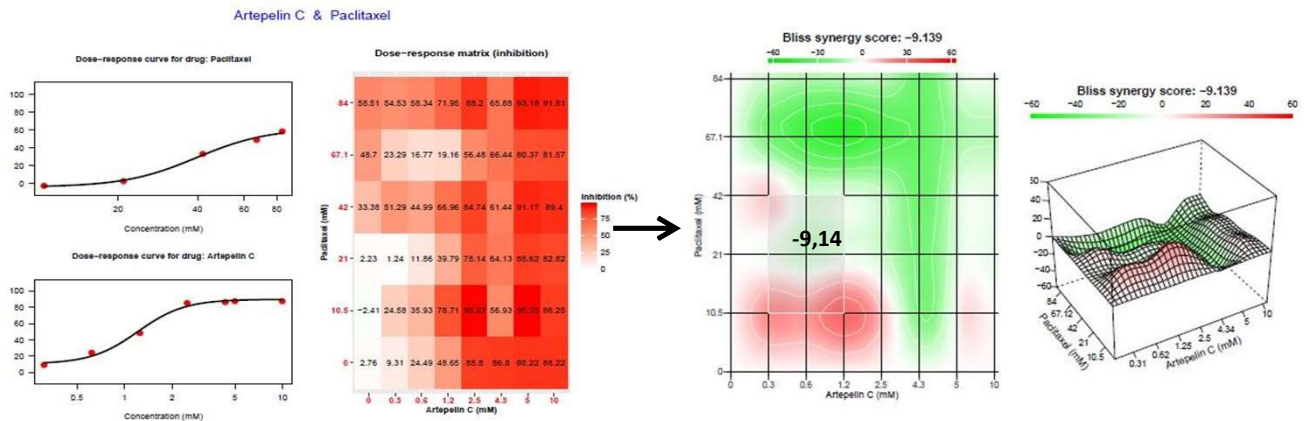
Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
B16F10	Dacarbazina (mM) - 2-AEH <sub>2</sub> F (mM)	-11,88	Antagonismo	Bliss

Figura 103. Determinação do efeito antagônico, aditivo ou sinérgico da associação do quimioterápico dacarbazina com o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F em células de melanoma murino B16F10.

**A:** O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

Estudos dos efeitos sinérgicos entre os compostos analisados gerados pela plataforma *Synergy Finder 2.0*. Avaliação em melanoma murino B16F10 (ArC x Paclitaxel).

**A**



**B**

Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
B16F10	ArC (mM) - Paclitaxel (μM)	-9,14	Antagonismo moderado	Bliss

Figura 104. Determinação do efeito antagonístico, aditivo ou sinérgico da associação do extrato ArC com o quimioterápico paclitaxel em células de melanoma murino B16F10.

**A:** O efeito antagonístico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (<0). A evolução do efeito sinérgico é observado do espaço branco para o vermelho, indicando efeito aditivo e sinérgico (>0 e <10 aditivo; >10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **B:** Combinação de drogas, pontuação e o efeito da análise pelo método BLISS.

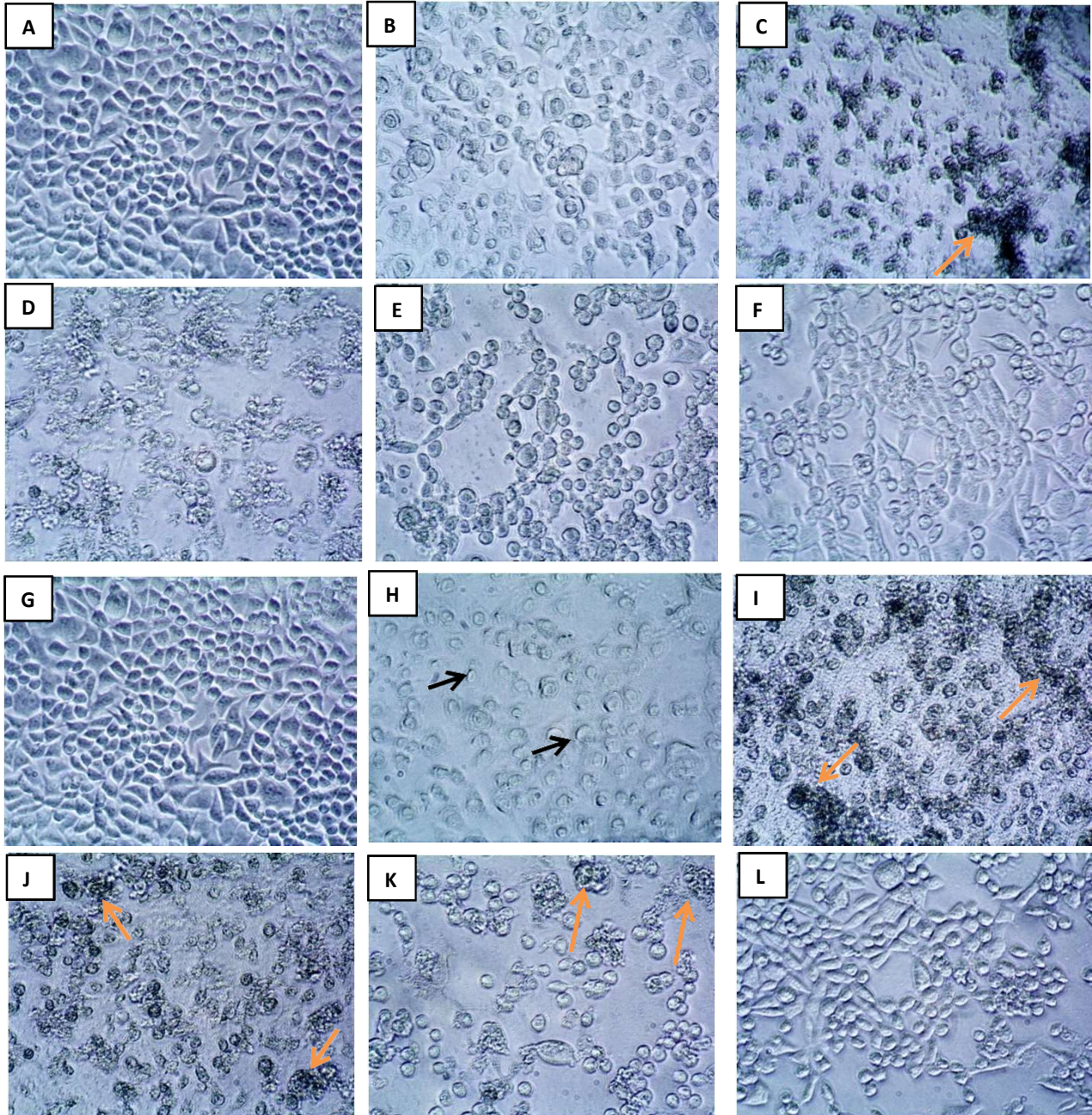
### 5.11. Determinação da atividade citotóxica das formulações lipossomais avaliada pelo método colorimétrico MTT.

Os tratamentos com as formulações lipossomais foram realizados conforme descritos na tabela 13, bem como os resultados obtidos. As diferentes concentrações dos compostos nos carreadores lipossomais tiveram como base, a concentração do carreador DODAC em 10 mM para cálculo de diluição seriada. A diferença entre o valor de IC50% produzido nas linhagens tumorais estudadas e os fibroblastos correspondentes como células controle, foi determinante. A formulação DODAC/ArC 10 e 8 mM respectivamente, demonstrou um efeito mais protetivo aos fibroblastos, para ambas as linhagens, por outro lado, a Formulação DODAC/ArC, na concentração 10/4 demonstrou efeito protetivo aos fibroblastos de origem humana e foi tóxica para a linhagem de melanoma humano na proporção de 223 vezes maior, porém o mesmo não ocorreu na linhagem murino. Os tratamentos com os lipossomas demonstraram maior efeito citotóxico nas células como um todo, gerando valores de IC50% mais baixos em comparação aos compostos isolados da formulação lipossomal.

Tratamentos	FN1 mM	L929 mM	SKmel-28 mM	B16F10 mM
DODAC 10 mM	0,03739	0,01518	0,008337	0,04611
DODAC 10mM	0,04932	0,01553	0,001343	0,01307
ArC 2mM				
DODAC 10mM	0,06429	0,003273	0,0002878	0,02597
ArC 4mM				
DODAC 10mM	0,1139	0,4145	0,02211	0,01307
ArC 8mM				
DODAC 10 mM 2AEH <sub>2</sub> F 4mM ArC 4mM	0,04349	0,02099	0,02059	0,01263

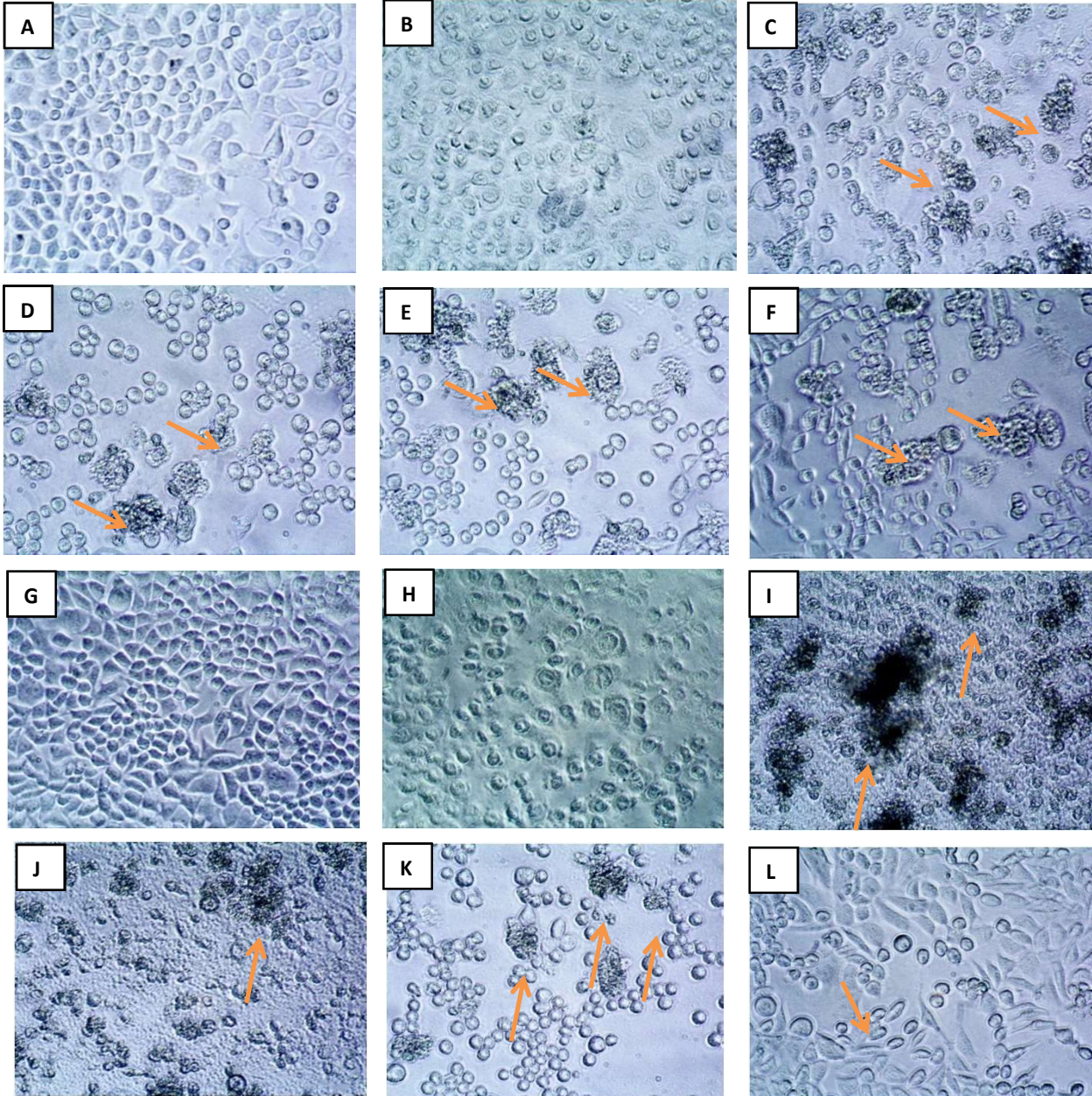
**Tabela 13.** Valores de IC50% obtidos após os tratamentos com lipossomas em fibroblastos de origem humana FN1, murino L929 e nas células de melanoma humano Skmel-28, murino B16F10, por um período de 24h.

Imagens representativas da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido de fibroblastos normais de origem humana FN1, apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.



**Figura 105. Fotomicrografias representativas da análise morfológica dos fibroblastos FN1 tratadas com: DODAC vazio 10 mM . A: Controle; B: 10 mM; C: 5 mM, debris celular (seta); D: 0,078 mM; E: 0,039 mM, células apresentando características de recuperação; F: 0,019 mM, células com morfologia aparentando atividade. DODAC Arc 10/2 mM. G: Controle, células crescendo em monocamada compacta justaposta; H: 10 mM, células apresentando retração citoplasmática (setas); I: 0,313 mM, as células estão apresentando condensação cromática, presença de debris (setas) ; J: 0,078 mM, presença de debris (setas); K: 0,039 mM, nessa concentração, as células aparentem morfologia indicando processo de recuperação, presença de debris (setas) ; L: 0,019 mM, células em processo de recuperação. Imagens obtidas em microscópio invertido, aumento 4x.**

Imagens representativas da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido de fibroblastos normais de origem humana FN1, apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.



**Figura 106. Fotomicrografias representativas da análise morfológica dos fibroblastos FN1 tratadas com: DODAC / Arc 10/4 mM. A:** Controle; **B:** 10 mM; **C:** 5 mM, presença de *debris* (setas); **D:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **E:** 0,039 mM, presença de *debris* (setas); **F:** 0,019 mM, presença de *debris* (setas). **DODAC Arc 10/8 mM. G:** Controle; **H:** 10 mM, células morfológicamente inativas; **I:** 0,313 mM, presença de *debris* (setas); **J:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **K:** 0,039 mM, presença de *debris* (setas); **L:** 0,019 mM, células aparentando processo mitótico. Imagens obtidas em microscópio invertido, aumento 4x.

Gráficos de barras representando a atividade citotóxica dos tratamentos lipossomais em fibroblastos normais de origem humana FN1, obtidos através de experimento para avaliação do valor de IC<sub>50</sub>% por meio do programa *GraphPad Prism5*.

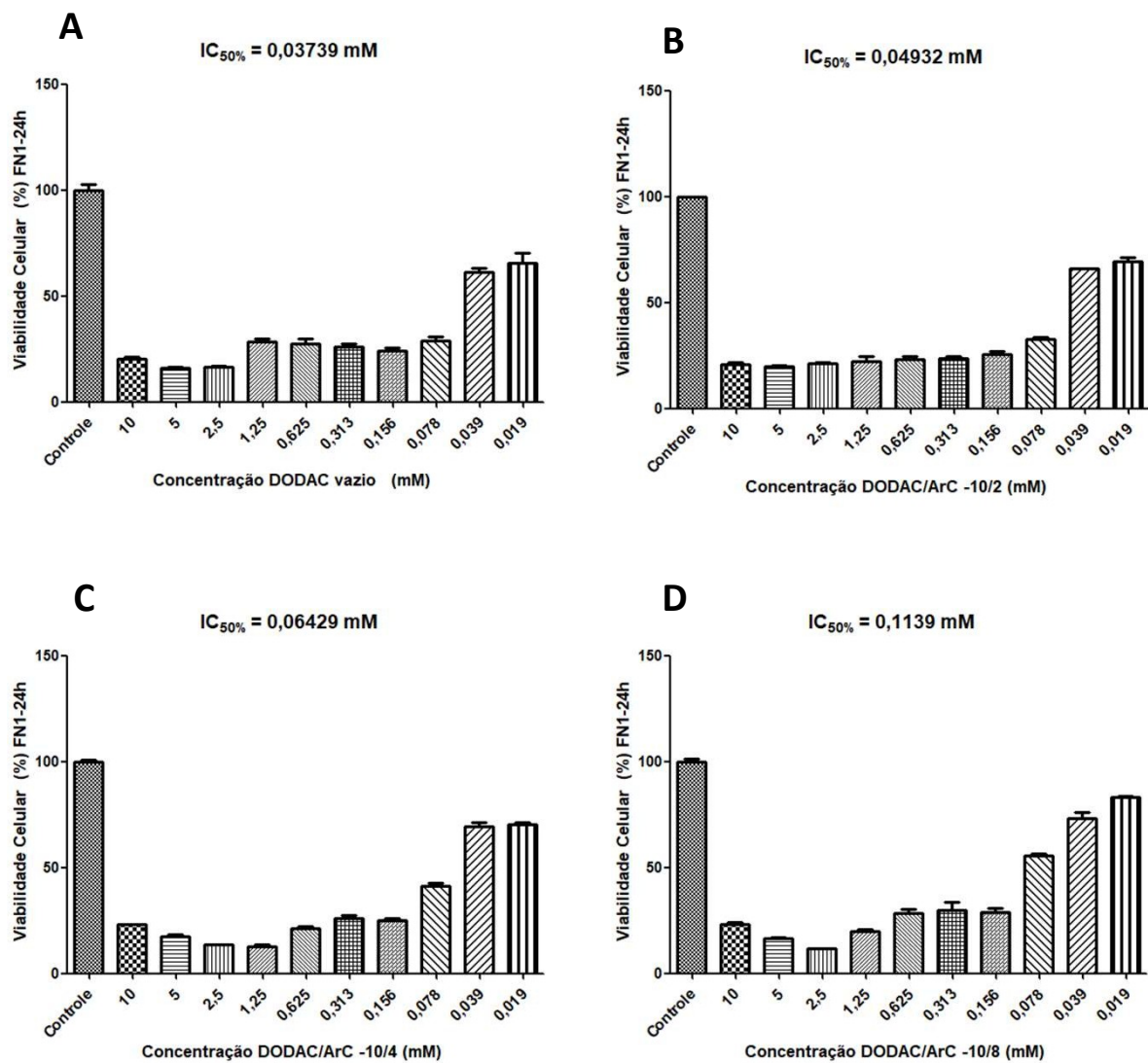
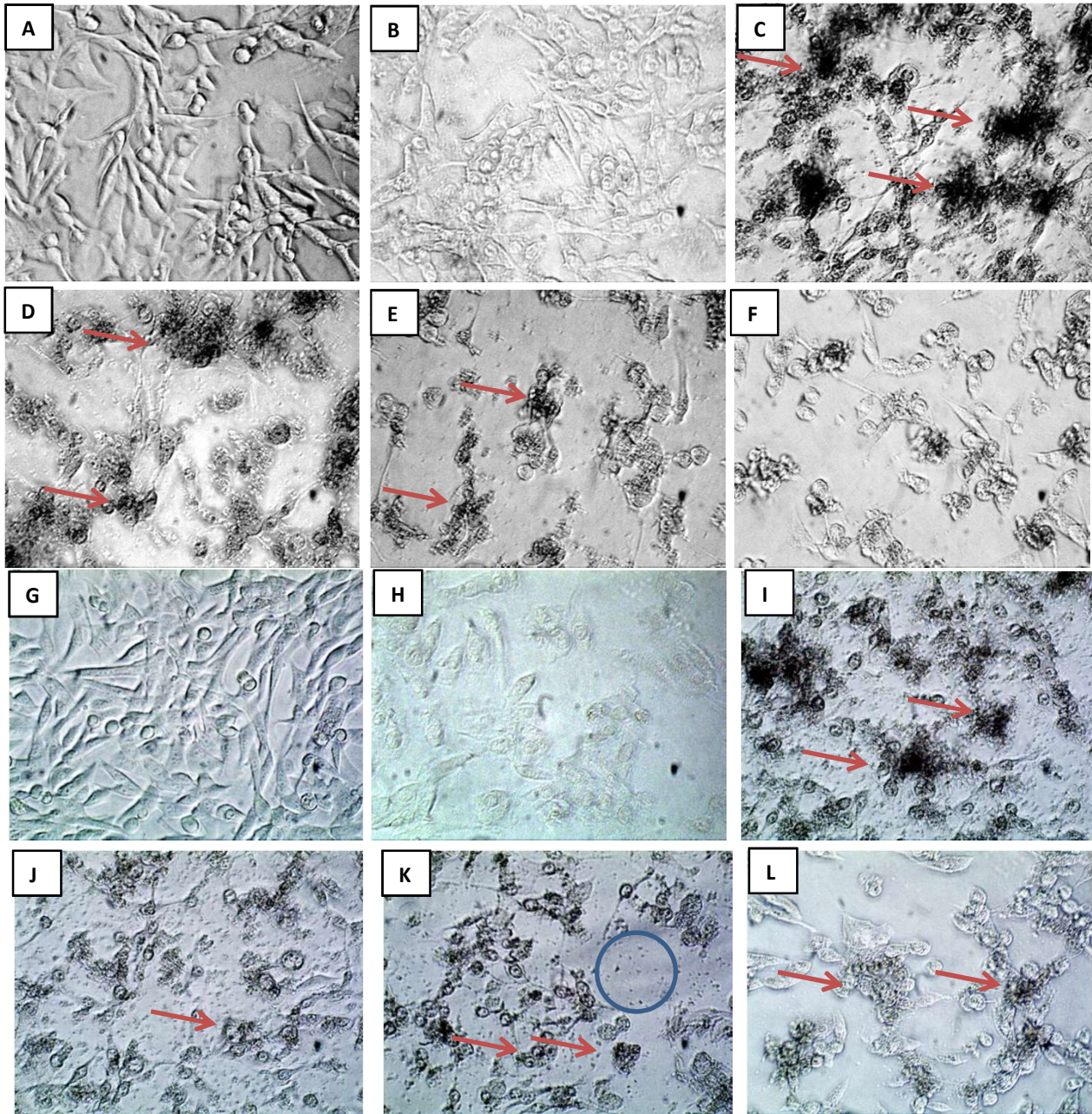


Figura 107. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos FN1 pelo método colorimétrico MTT.

Os fibroblastos foram tratados em diferentes concentrações por meio de diluição seriada no período de 24h. **A**: DODAC vazio 10 mM; **B**: DODAC/ArC na concentração 10/2 mM; **C**: DODAC/ArC na concentração 10/4 mM; **D**: DODAC/ArC na concentração 10/8 mM.

Os gráficos de colunas demonstram a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$ DP de três experiências independentes.

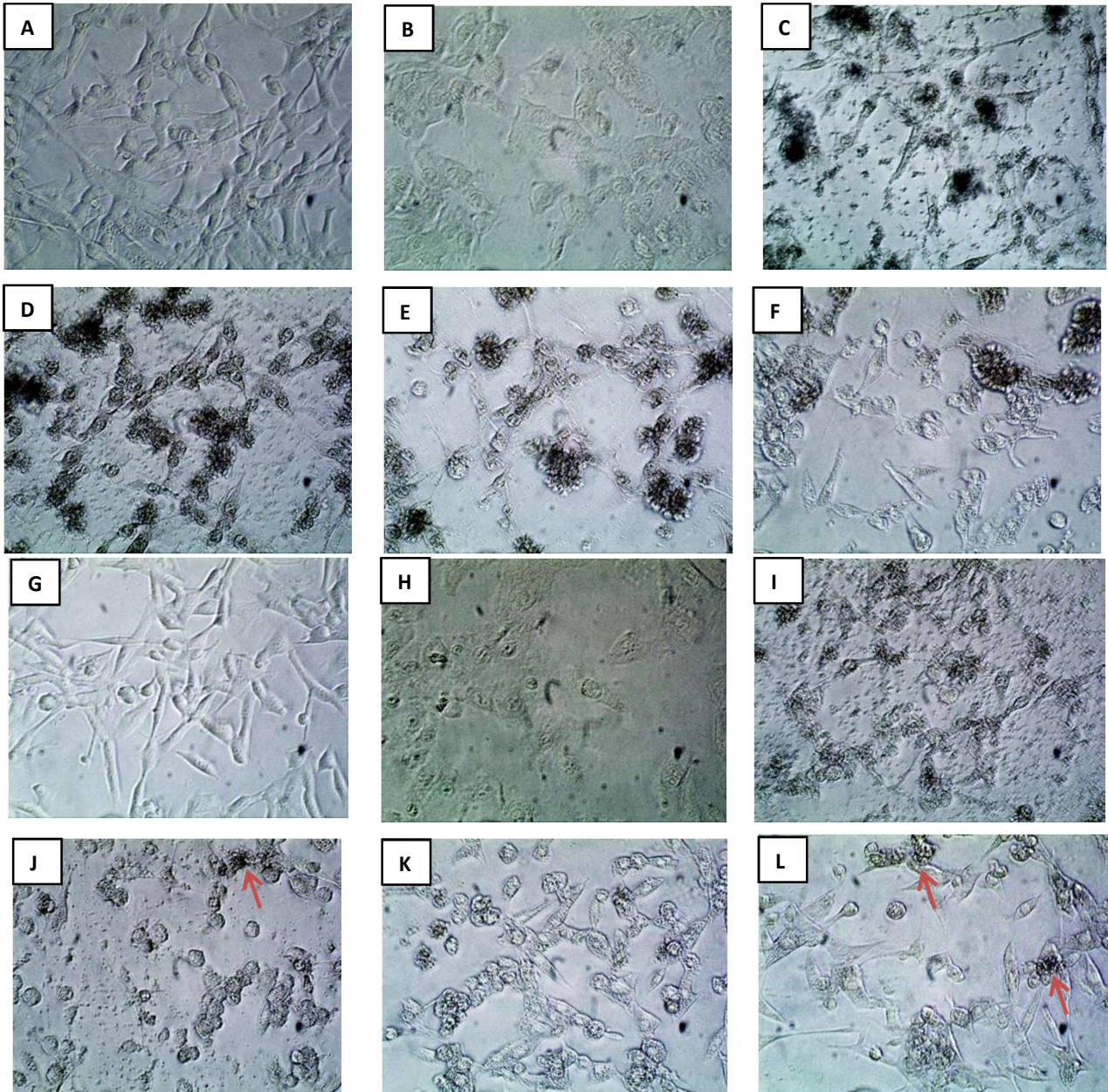
Imagens representativas da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido de melanoma humano Skmel-28, apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.



**Figura 108. Fotomicrografias representativas da análise morfológica das células melanoma humano SKmel-28 tratado com: DODAC vazio.** Fotomicrografias representativas da análise morfológica das células. **A:** Controle; **B:** 10 mM; **C:** 0,156 mM, presença de *debris* (setas); ; **D:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **E:** 0,039mM, presença de *debris* (setas); **F:** 0,019 mM. **DODAC ArC 10/2 mM.** **G:** Controle; **H:** 10 mM, células morfológicamente inativas; **I:**0,313 mM, presença de *debris* (setas); **J:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **K:** 0,039 mM, presença de *debris* (setas), resíduos dispersos em menores dimensões (círculo); **L:** 0,019 mM, células aparentemente ativas, presença de *debris* (setas). Imagens obtidas em microscópio invertido, aumento 4x.

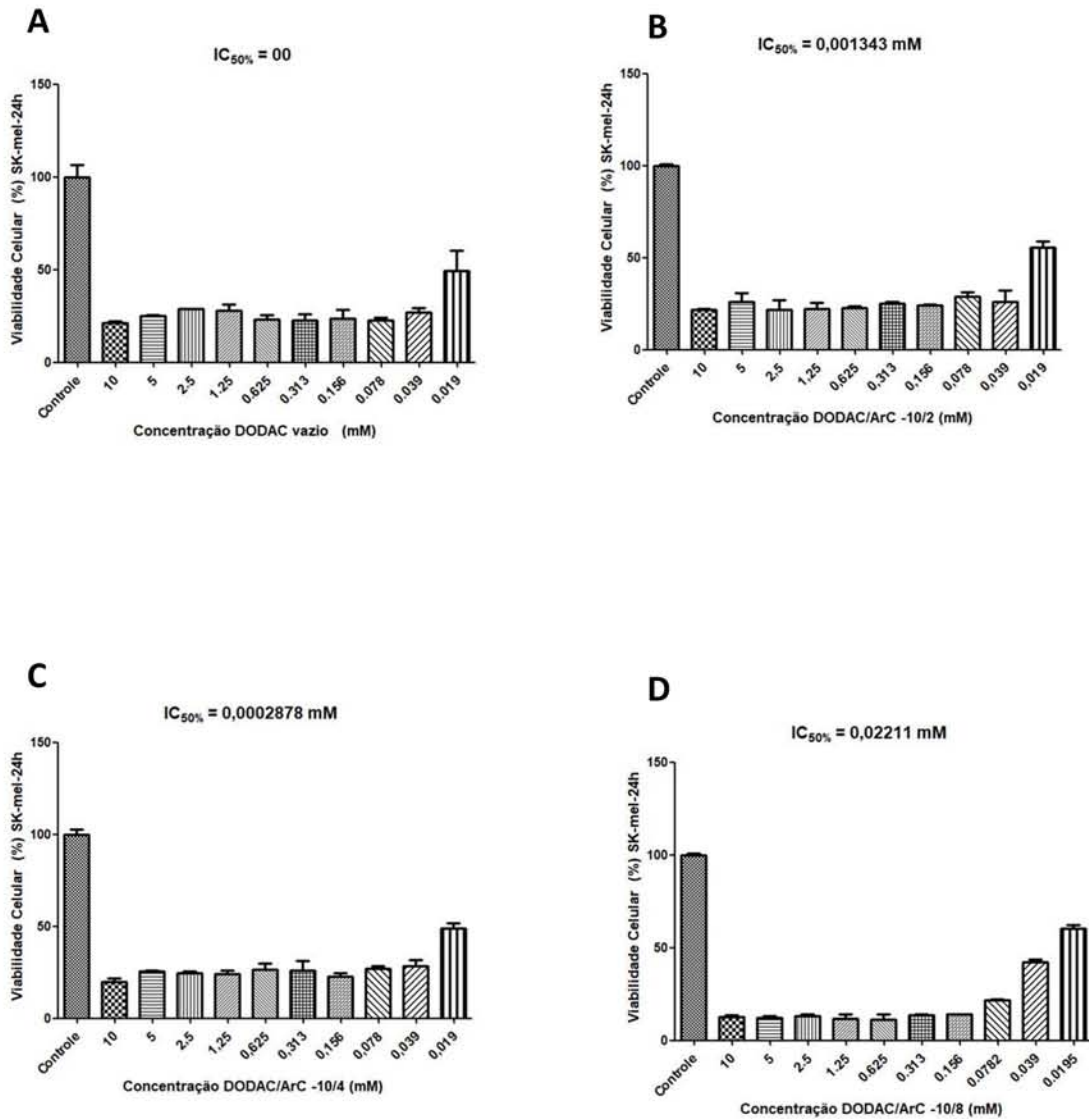


Imagens representativas da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido de melanoma humano Skmel-28, apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.



**Figura 107. Fotomicrografias representativas da análise morfológica das células melanoma humano SKmel-28 tratadas com: DODAC/ArC 10/4 mM..** **A:** Controle; **B:** 10 mM; **C:** 5 mM, presença de *debris* (setas); **D:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **E:** 0,039 mM, presença de *debris* (setas); **F:** 0,019 mM. **DODAC ArC 10/8 mM.** **G:** Controle; **H:** 10 mM, células morfológicamente inativas; **I:** 0,313 mM, presença de *debris* (setas); **J:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **K:** 0,039 mM, células apresentando morfologia sugerido metabolismo ativo; **L:** 0,019 mM, células aparentemente ativas, presença de *debris* (setas). Imagens obtidas em microscópio invertido, aumento 4x.

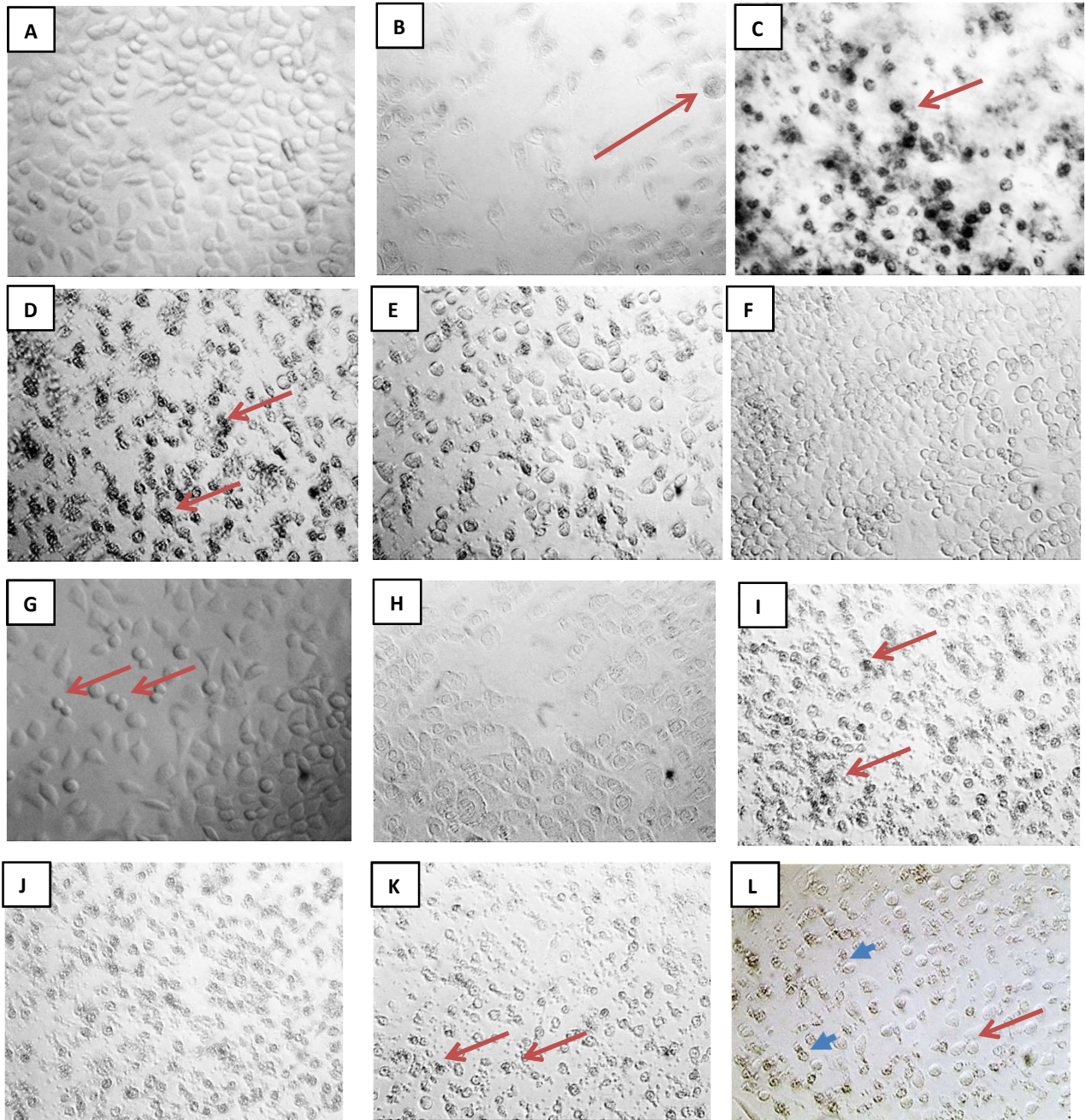
Gráficos de barras representando a atividade citotóxica dos tratamentos lipossomais em melanoma humano Skmel-28, obtidos através de experimento para avaliação do valor de IC<sub>50</sub>% por meio do programa *GraphPad Prism5*.



**Figura 110. Determinação da citotoxicidade em melanoma humano SKmel-28 pelo método colorimétrico MTT.** As células de melanoma foram tratados em diferentes concentrações por meio de diluição seriada no período de 24h. **A:** DODAC vazio 10 mM; **B:** DODAC/ArC na concentração 10/2 mM; **C:** DODAC/ArC na concentração 10/4 mM; **D:** DODAC/ArC na concentração 10/8 mM.

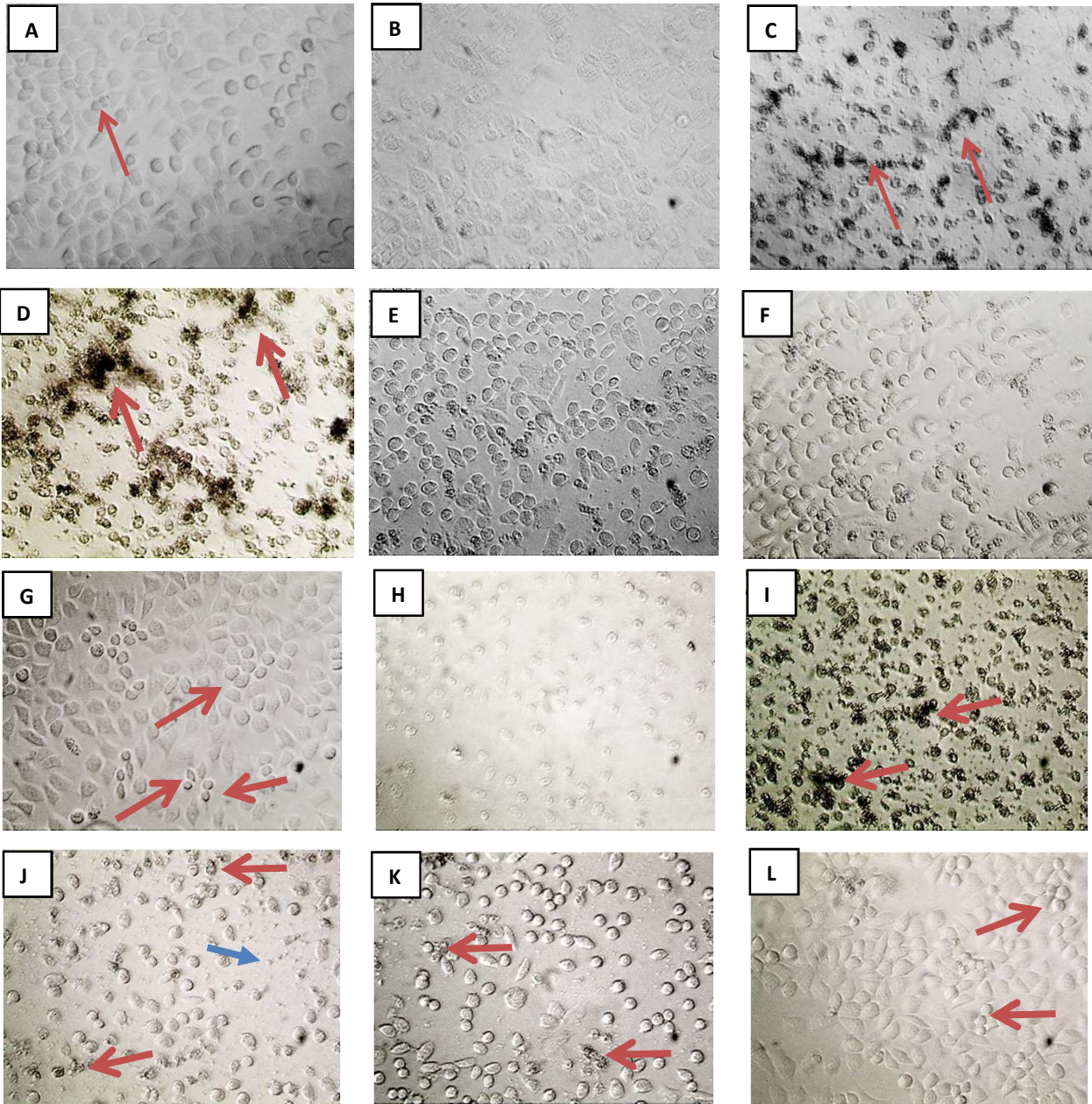
Os gráficos de colunas demonstram a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$ DP de três experiências independentes.

Imagens representativas da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido de fibroblastos de origem murino L929, apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.



**Figura 111. Fotomicrografias representativas da análise morfológica dos fibroblastos murino L929 tratadas com: DODAC vazio 10 mM . A: Controle; B: 10 mM, célula com volume citoplasmático alterado(seta); C: 5 mM, debris celular (seta); D: 0,078 mM, presença de debris celular (setas); E: 0,039 mM, células apresentando características de recuperação; F: 0,019 mM, células com morfologia aparentando atividade. DODAC Arc 10/2 mM. G: Controle, possíveis figuras de mitose (setas); H: 10 mM, células apresentando alterações morfológicas; I:0,313 mM, as células estão apresentando condensação cromática, presença de debris (setas) ; J: 0,078 mM, presença de debris (setas); K: 0,039 mM, presença de debris (setas) ; L: 0,019 mM, células em processo de recuperação (seta), células aparentemente em estado de estresse metabólico (seta cheia) . Imagens obtidas em microscópio invertido, aumento 4x.**

Imagens representativas da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido de fibroblastos de origem murino L929, apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.



**Figura 112. Fotomicrografias representativas da análise morfológica dos fibroblastos murino L929 tratadas com: DODAC ArC 10/4 mM . A:** Controle; **B:** 10 mM, célula com volume citoplasmático alterado(seta); **C:** 5 mM, *debris* celular (setas); **D:** 0,078 mM, presença de *debris* celular (setas); **E:** 0,039 mM, células apresentando características de recuperação; **F:** 0,019 mM, células com morfologia aparentando atividade. **DODAC ArC 10/8 mM.** **G:** Controle, possíveis figuras de mitose (setas); **H:** 10 mM, células apresentando alterações morfológicas; **I:** 0,313 mM, as células estão apresentando condensação cromática, presença de *debris* (setas); **J:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas), presença de partículas menores (seta cheia); **K:** 0,039 mM, presença de *debris* (setas); **L:** 0,019 mM, células em processo de recuperação, prováveis figuras de mitose (setas), Imagens obtidas em microscópio invertido, aumento 4x.

Gráficos de barras representando a atividade citotóxica dos tratamentos lipossomais em fibroblastos normais murino L929, obtidos através de experimento para avaliação do valor de IC50% por meio do programa *GraphPad Prism5*.

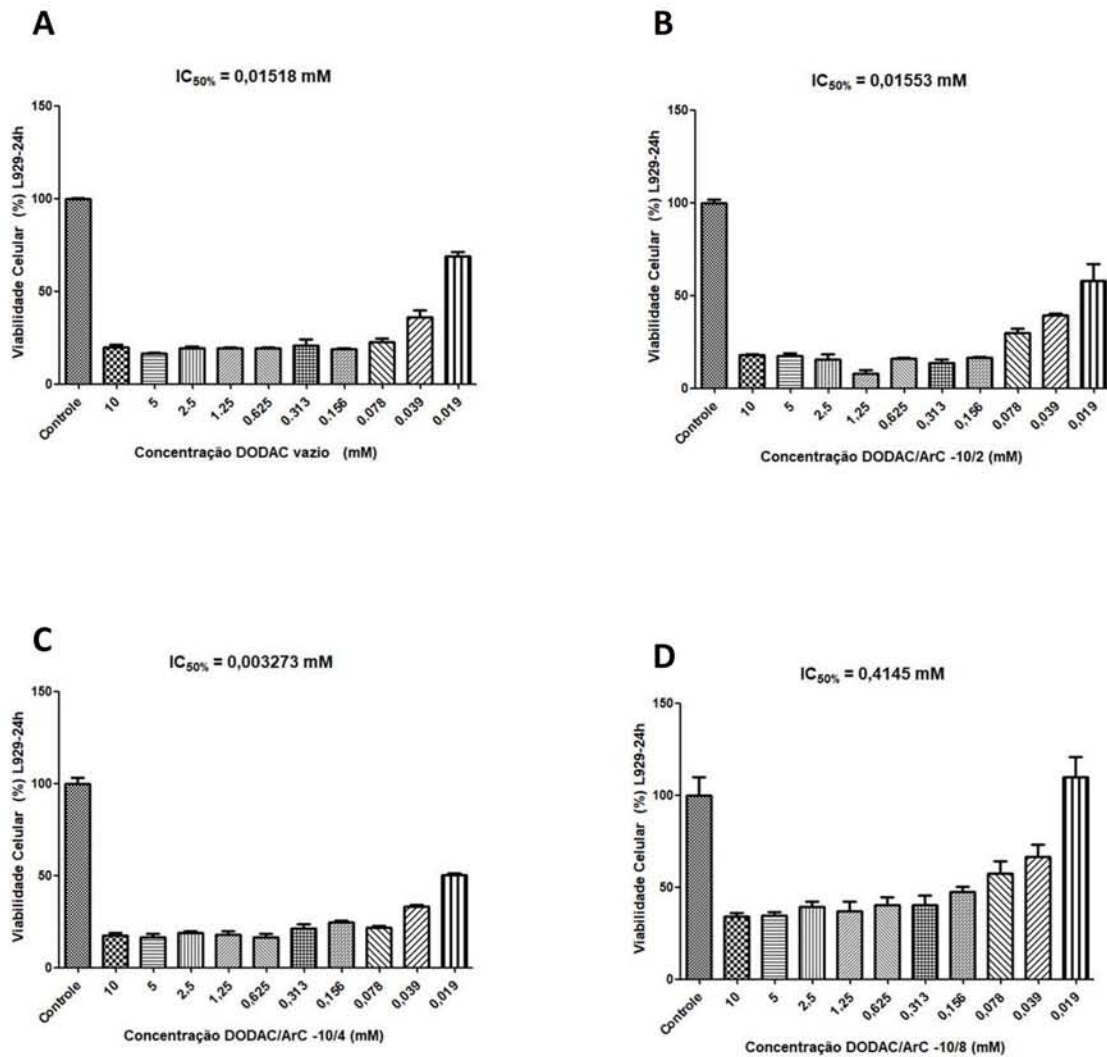
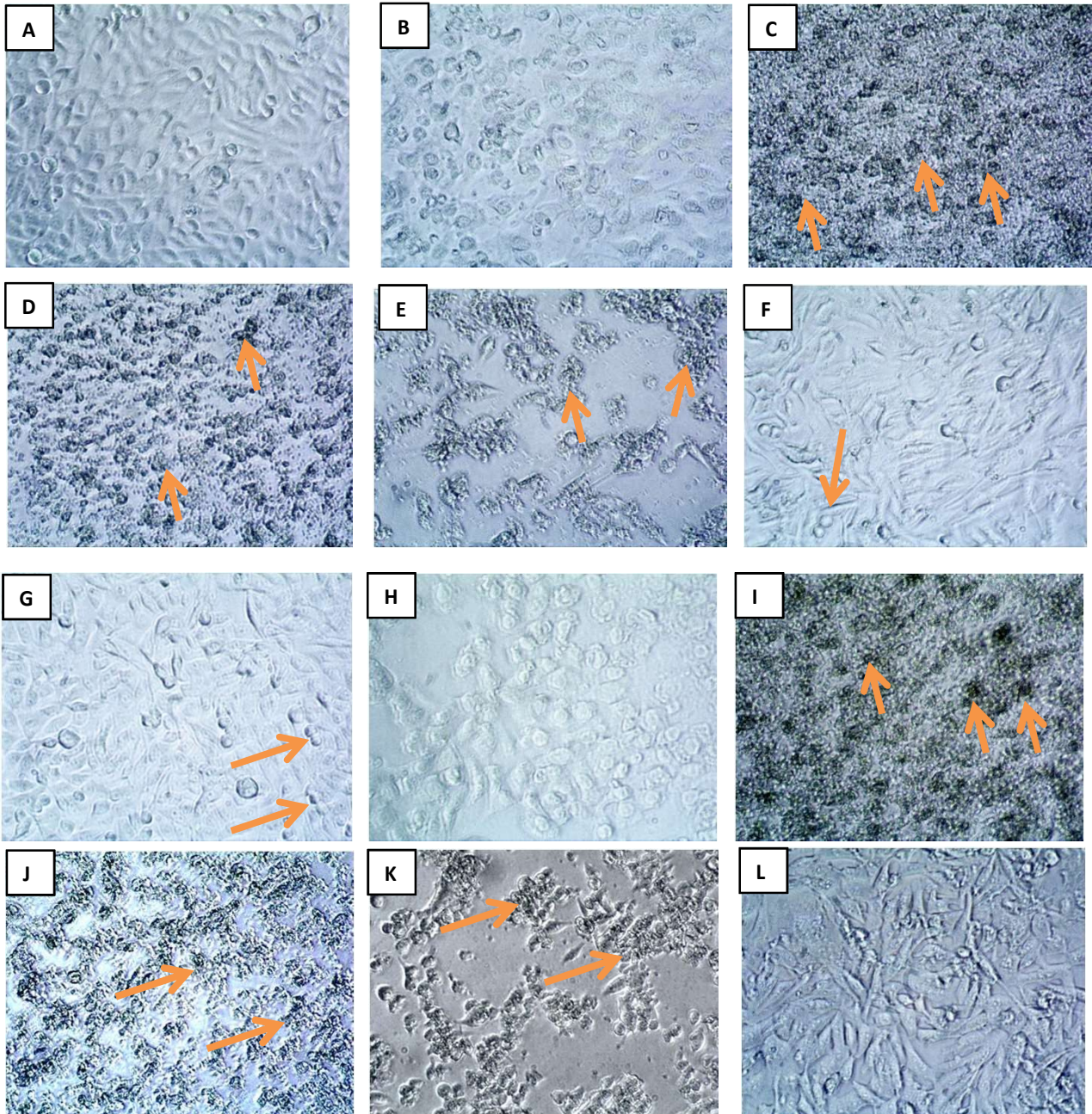


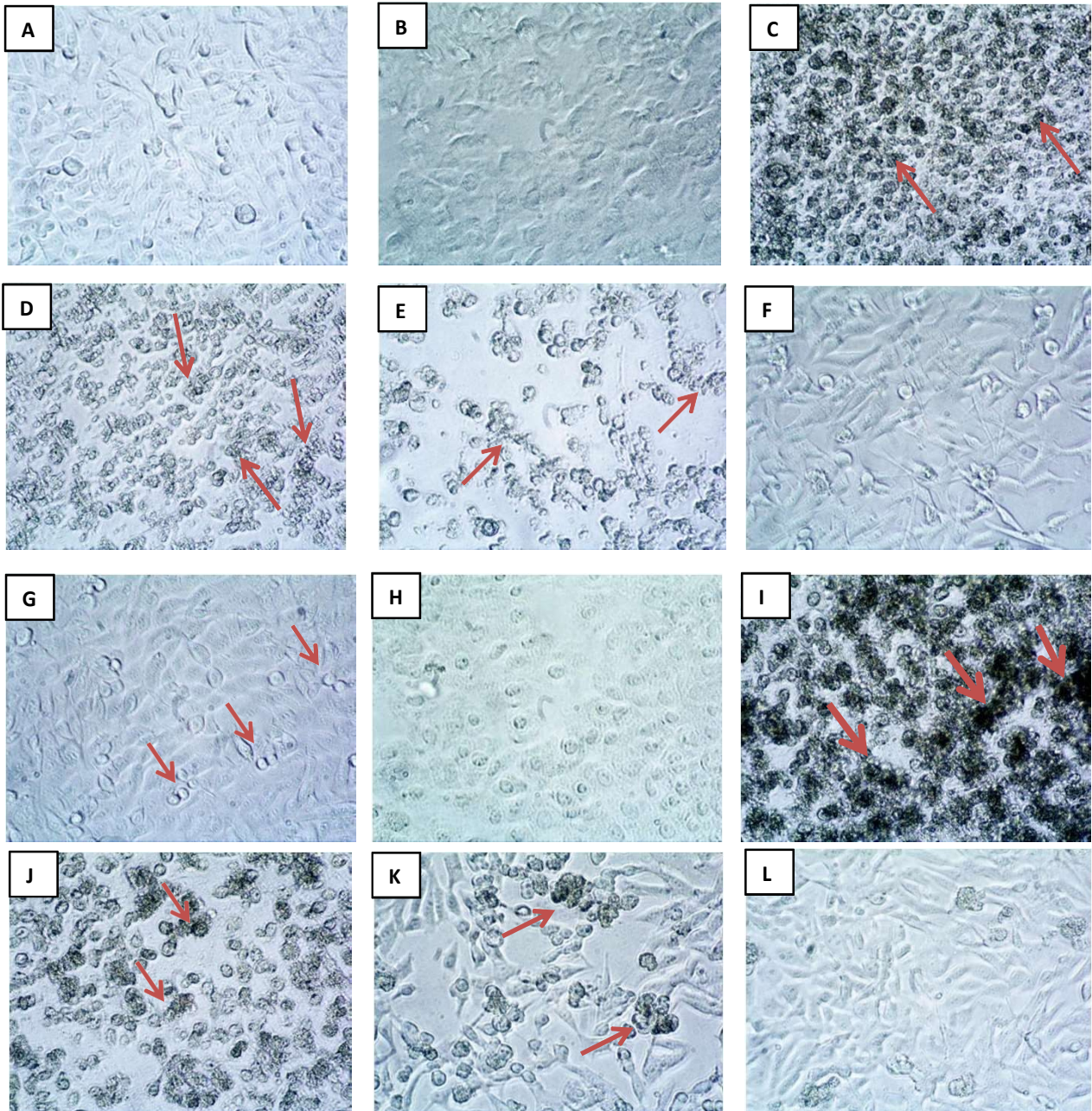
Figura 113. Determinação da citotoxicidade em fibroblastos murino L929 pelo método colorimétrico MTT. Os fibroblastos foram tratados em diferentes concentrações por meio de diluição seriada no período de 24h. **A**: DODAC vazio 10 mM, IC50% 0,01518 mM; **B**: DODAC/ArC na concentração 10/2 mM, IC50% 0,01553 mM; **C**: DODAC/ArC na concentração 10/4 mM, IC50% 0,003273 mM; **D**: DODAC/ArC na concentração 10/8 mM, IC50% 0,4145 mM. Os gráficos de colunas demonstram a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$ DP de três experiências independentes.

Imagens representativas da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido de melanoma murino B16F10, apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.



**Figura 114. Fotomicrografias representativas da análise morfológica das células de melanoma murino B16F10 tratadas com: DODAC vazio 10 mM . A:** Controle, células crescendo em monocamada justapostas; **B:** 10 mM, células aparentando estresse metabólico; **C:** 5 mM, *debris* celular (setas); **D:** 0,078 mM, presença de *debris* celular (setas); **E:** 0,039 mM, incidência elevada de *debris* (setas); **F:** 0,019 mM, células com morfologia aparentando atividade, provável figura de mitose (seta). **DODAC Arc 10/2 mM. G:** Controle, possíveis figuras de mitose (setas); **H:** 10 mM, células apresentando alterações morfológicas; **I:** 0,313 mM, elevada presença de *debris* (setas) ; **J:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas), presença de partículas menores (seta cheia); **K:** 0,039 mM, presença de *debris* (setas) ; **L:** 0,019 mM, células em processo de recuperação. Imagens obtidas em microscópio invertido, aumento 4x.

Imagens representativas da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido de melanoma murino B16F10, apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.



**Figura 115. Fotomicrografias representativas da análise morfológica das células de melanoma murino B16F10 tratadas com: DODAC ArC 10/4 mM . A:** Controle, células crescendo em monocamada justapostas; **B:** 10 mM, células apresentando estresse metabólico, sem definição de contorno citoplasmático; **C:** 5 mM, *debris* celular (setas); **D:** 0,078 mM, presença de *debris* celular (setas); **E:** 0,039 mM, o campo apresenta baixa concentração celular e presença de *debris* (setas); **F:** 0,019 mM, células com morfologia aparentando atividade. **DODAC ArC 10/8 mM. G:** Controle, possíveis figuras de mitose (setas); **H:** 10 mM, células apresentando alterações morfológicas; **I:** 0,313 mM, elevada presença de *debris* (setas) ; **J:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **K:** 0,039 mM, presença de *debris* (setas) ; **L:** 0,019 mM, células em processo de recuperação. Imagens obtidas em microscópio invertido, aumento 4x.

Gráficos de barras representando a atividade citotóxica dos tratamentos lipossomais em células de melanoma murino B16F10, obtidos através de experimento para avaliação do valor de IC50% por meio do programa *GraphPad Prism5*.

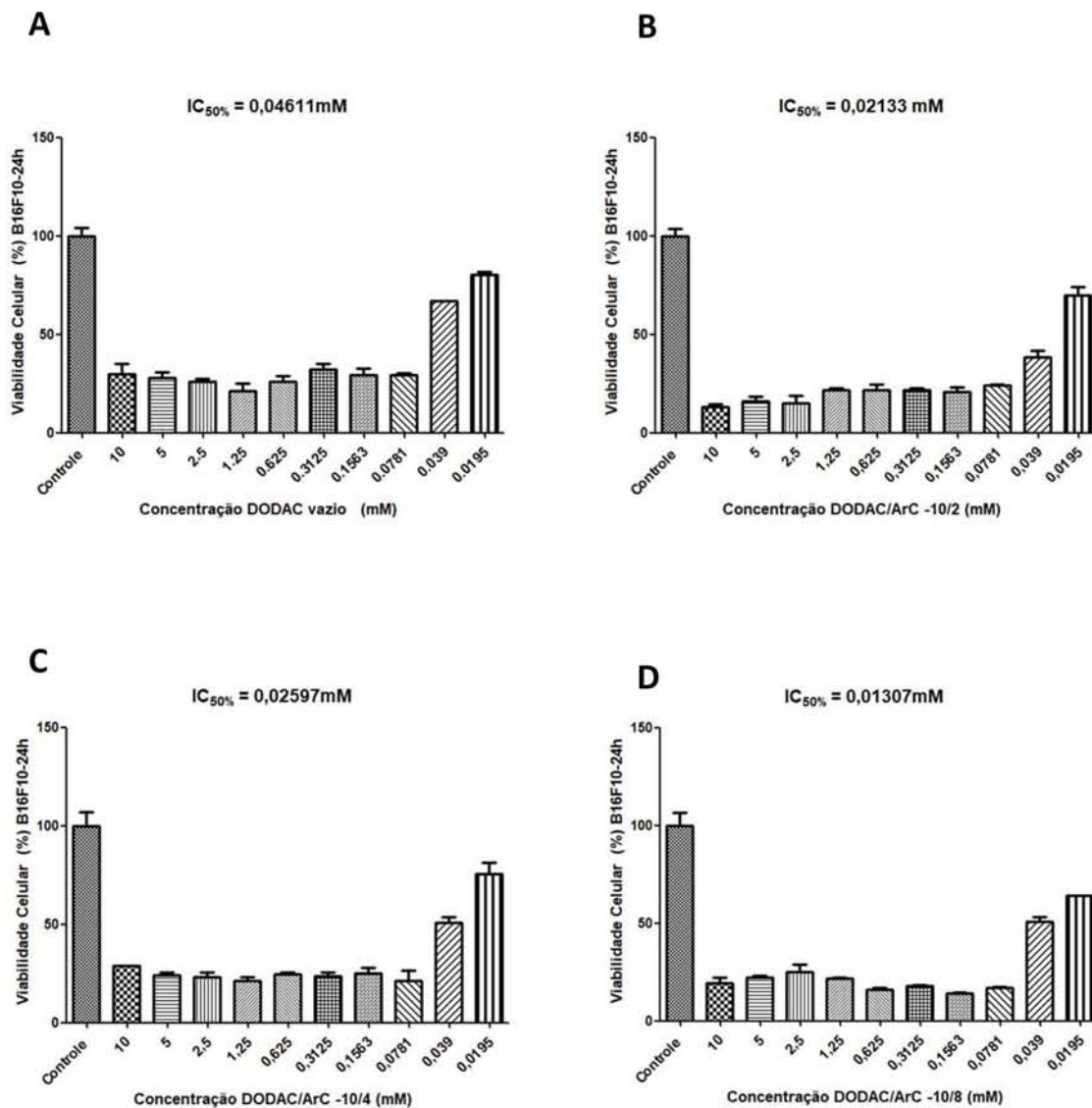
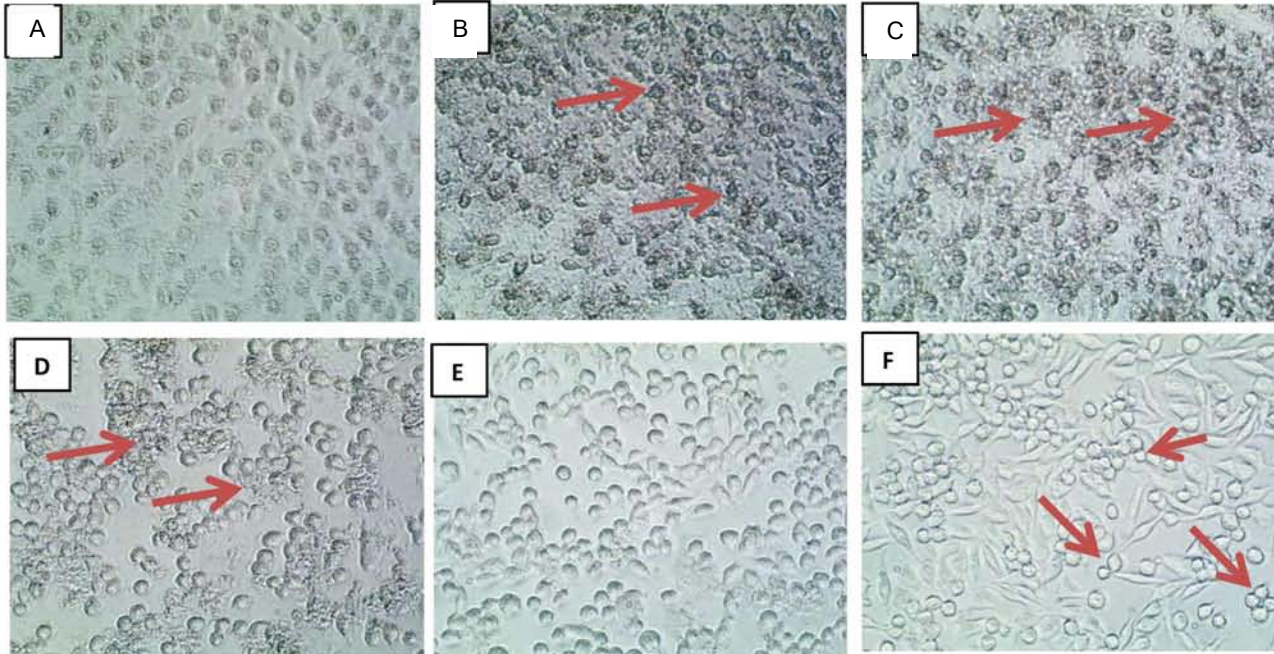


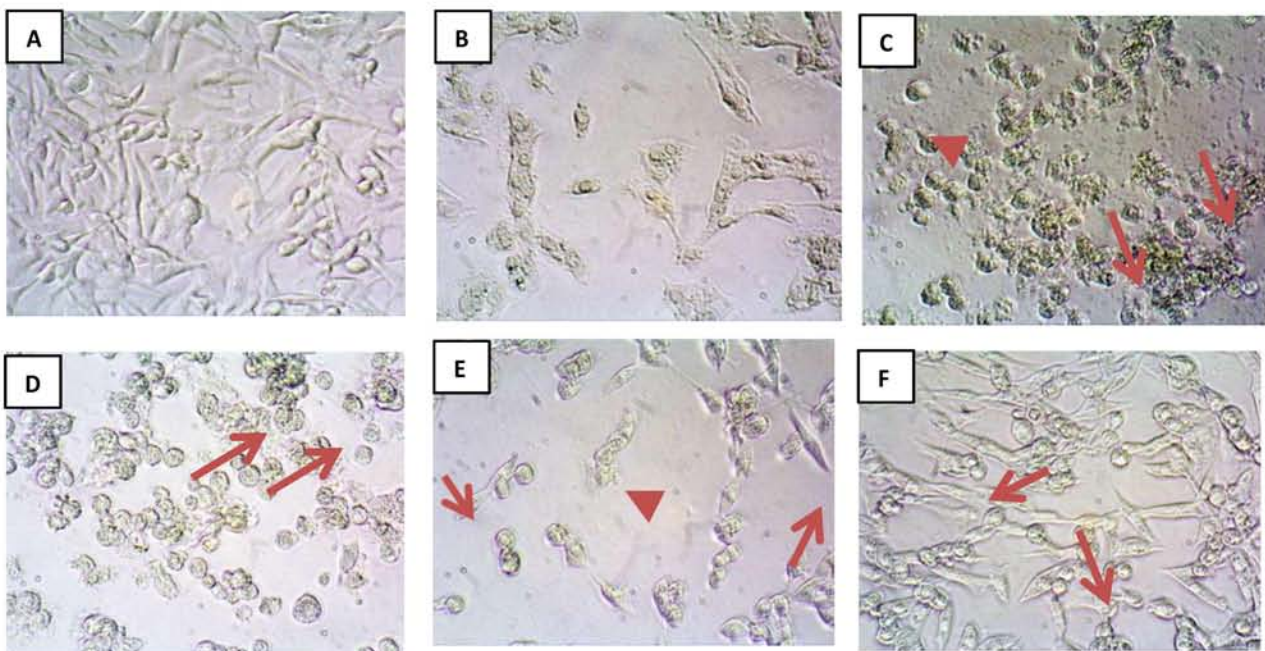
Figura 116. Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas em diferentes concentrações por meio de diluição seriada no período de 24h. **A**: DODAC vazio 10 mM,  $IC_{50\%}$  0,04611 mM; **B**: DODAC/ArC na concentração 10/2 mM,  $IC_{50\%}$  0,02133 mM; **C**: DODAC/ArC na concentração 10/4 mM,  $IC_{50\%}$  0,02597 mM; **D**: DODAC/ArC na concentração 10/8 mM,  $IC_{50\%}$  0,01307 mM. Os gráficos de colunas demonstram a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$ DP de três experiências independentes.



Imagens representativas das culturas celulares obtidas em microscópio óptico invertido de fibroblastos e melanoma de origem humana FN1 (figura 114) e Skmel-28 (Figura 115), apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.

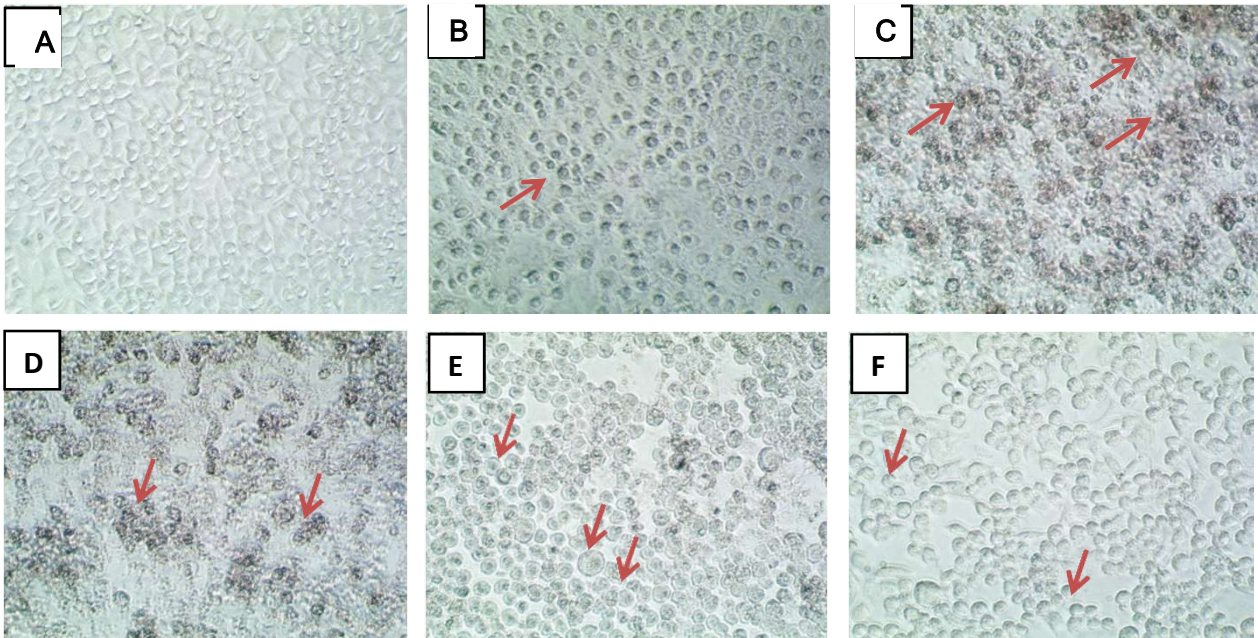


**Figura 117. Fotomicrografias representativas da análise morfológica dos fibroblastos FN1 tratadas com: DODAC/2AEH<sub>2</sub>F/ArC 10/4/4 mM. A:** 10 mM, células apresentando estresse metabólico; **B:** 1,25 mM, *debris* (setas); **C:** 0,3125 mM, presença de *debris* (setas); **D:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **E:** 0,039 mM, células em possíveis processos de recuperação (setas); **F:** 0,019 mM, possíveis figuras de mitose (setas).

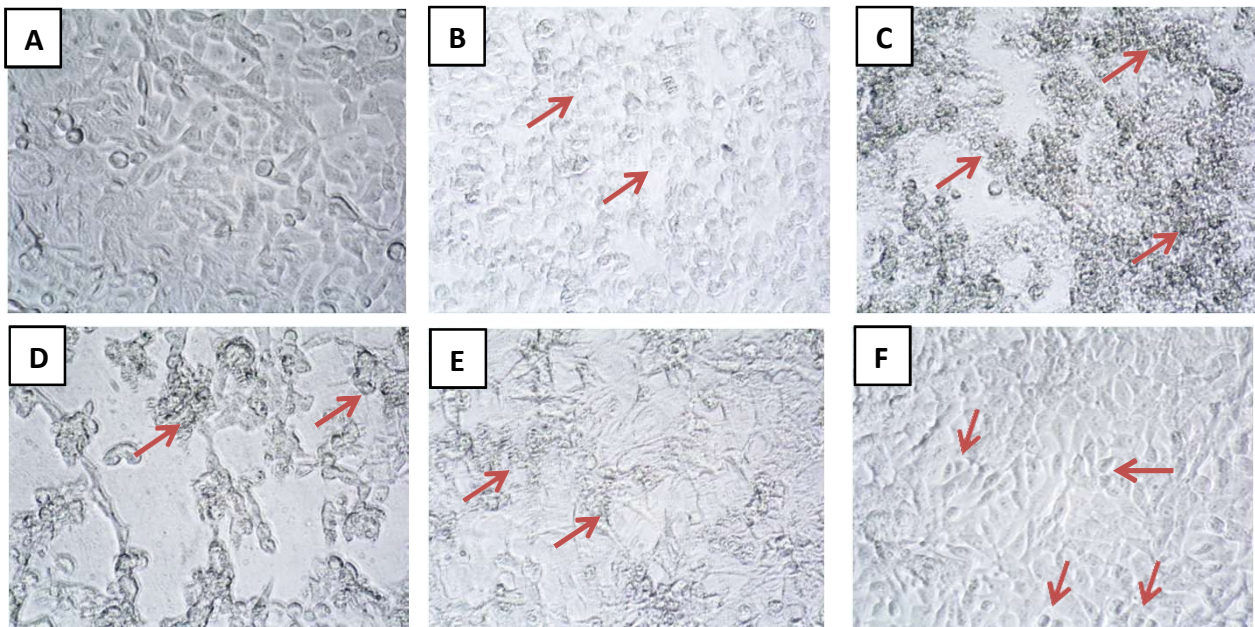


**Figura 118. Fotomicrografias representativas da análise morfológica das células de melanoma SKmel-28 tratadas com: DODAC/2AEH<sub>2</sub>F/ArC 10/4/4 mM. A:** Controle; **B:** 10 mM, células com alterações morfológicas; **C:** 0,156 mM, presença de *debris* (setas), células apresentando retração citoplasmática (cabeça de seta); **D:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **E:** 0,039 mM, células apresentando morfologia normal (setas), célula apresentando alteração citoplasmática (cabeça de seta); **F:** 0,028 mM, células aparentemente em recuperação, possíveis figuras de mitose (setas).

Imagens representativas das culturas celulares obtidas em microscópio óptico invertido de fibroblastos e melanoma de origem murino L929 (Figura 116) e B16F10 (Figura 117), apresentando os efeitos da atividade citotóxica em decorrência dos tratamentos com as formulações lipossomais.



**Figura 119. Fotomicrografias representativas da análise morfológica em fibroblastos murino L929 tratadas com: DODAC/2AEH<sub>2</sub>F/ArC 10/4/4 mM. A:** controle; **B:** 10 mM, células, aparentando retração citoplasmática (setas); **C:** 0,156 mM, elevada presença de *debris* (setas); **D:** 0,078 mM, presença de *debris* (setas); **E:** 0,039 mM, células apresentando alterações metabólicas (setas); **F:** 0,028 mM, possíveis figuras de mitose (setas).



**Figura 120. Fotomicrografias representativas da análise morfológica em melanoma murino B16F10 tratadas com: DODAC/2AEH<sub>2</sub>F/ArC 10/4/4 mM. A:** controle; **B:** 5 mM, células, aparentando retração citoplasmática (setas); **C:** 1,25 mM, elevada presença de *debris* (setas); **D:** 0,625 mM, presença de *debris* (setas); **E:** 0,039 mM, presença de *debris* (setas); **F:** 0,019 mM, possíveis figuras de mitose (setas).

Gráficos de barras representando a atividade citotóxica dos tratamentos lipossomais em fibroblastos normais de origem humana FN1 (A); células de melanoma humano Skmel-28 (B); fibroblastos normais murino L929 (C); células de melanoma murino B16F10 (D), obtidos através de experimento para avaliação do valor de IC<sub>50</sub>% por meio do programa *GraphPad Prism5*.

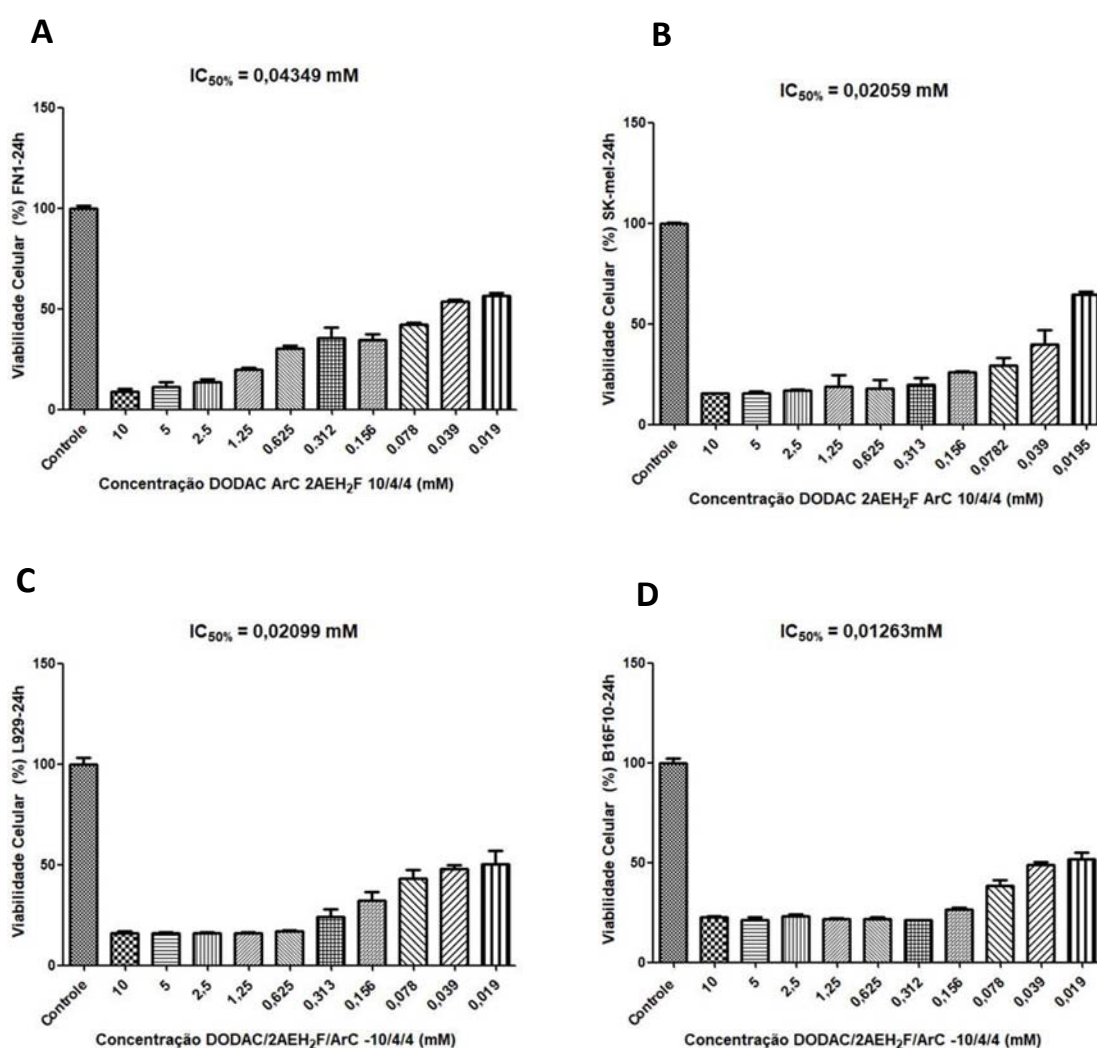


Figura 121. **Determinação da citotoxicidade em fibroblastos e células de melanoma de origem humana e murino, pelo método colorimétrico MTT, tratadas com DODAC/2AEH<sub>2</sub>F/ArC 10/4/4 mM.** As células foram tratadas em diferentes concentrações por meio de diluição seriada no período de 24h. **A:** Fibroblasto humano FN1, IC<sub>50</sub>% 0,04349 mM; **B:** Melanoma humano SKmel-28, IC<sub>50</sub>% 0,02059 mM; **C:** Fibroblasto murino L929, IC<sub>50</sub>% 0,02099 mM; **D:** Melanoma murino B16F10, IC<sub>50</sub>% 0,01263 mM. Os gráficos de colunas demonstram a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$ DP de três experiências independentes.

Análises estatísticas comparando DODAC vazio e as formulações decorrentes dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, em fibroblastos de origem humana FN1 e células de melanoma humano Skmel-28 bem como em fibroblastos de origem murino L929 e melanoma murino B16F10, frente aos tratamentos lipossomais.

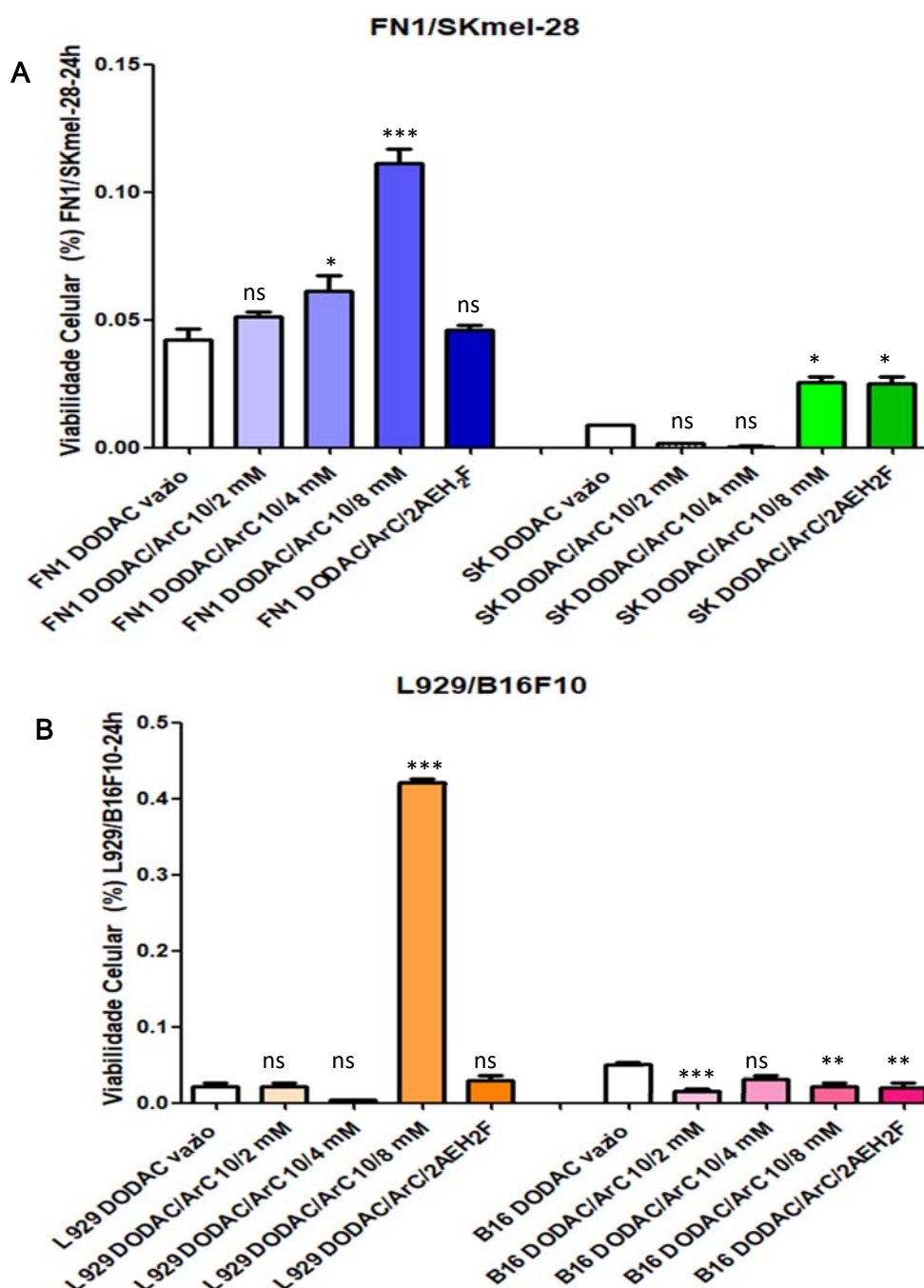


Figura 122. Análises estatísticas dos resultados relativos aos valores obtidos de IC<sub>50</sub>% pelo programa *GraphPad Prism 5*. As diferenças estatísticas foram efetuadas entre os valores obtidos de DODAC vazio e DODAC carregado com as formulações, sendo: DODAC/ArC 10/2: DODAC 10 mM e ArC 2 mM; DODAC/ArC 10/4: DODAC 10 mM e ArC 4 mM; DODAC/ArC 10/8: DODAC 10 mM e ArC 8 mM; DODAC/ArC/2AEH<sub>2</sub>F: DODAC 10 mM, ArC 4 mM e 2AEH<sub>2</sub>F 4 mM. **A**: Fibroblastos de origem humana FN1 e melanoma humano Skmel-28. **B**: Fibroblastos murino L929 e melanoma murino B16F10. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,001^{***}$ . ns=não significativo.

Análises estatísticas comparando os resultados obtidos em fibroblastos de origem humana FN1 com células de melanoma humano Skmel-28 e fibroblastos de origem murino L929 com melanoma murino B16F10, frente aos tratamentos lipossomais.

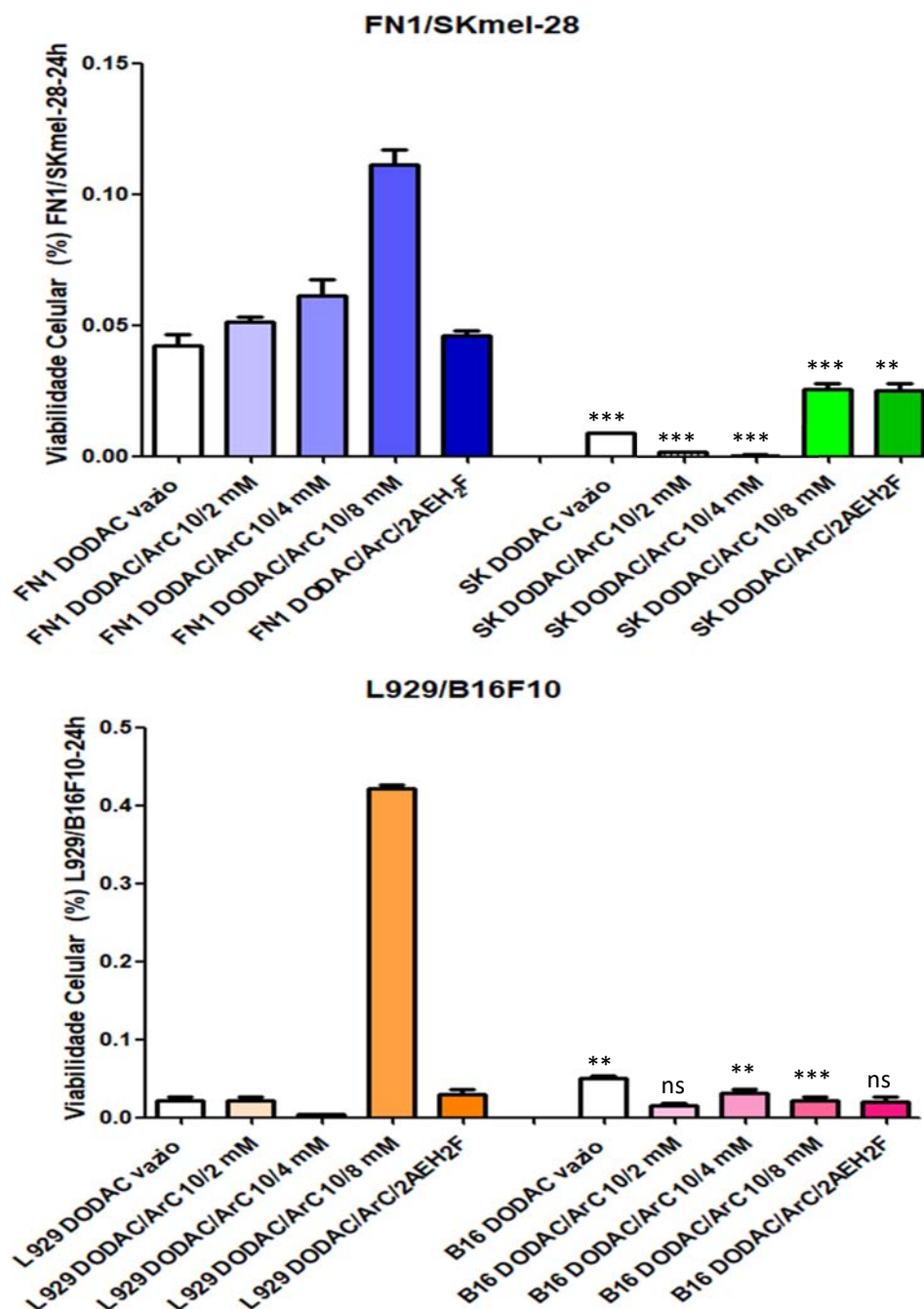


Figura 123. Análises estatísticas dos resultados relativos aos valores obtidos de IC50% pelo programa *GraphPad Prism 5*. As diferenças estatísticas foram efetuadas entre os valores obtidos em fibroblastos em comparação com células de melanoma, humano e murino. **A:** Fibroblastos de origem humana FN1 e melanoma humano Skmel-28. **B:** Fibroblastos murino L929 e melanoma murino B16F10. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ns=não significativo.

## **5.12. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células tumorais SKmel-28 e B16F10**

O grupo de células de melanoma humano, foram tratadas por um período de 12h com as formulações lipossomais e com o extrato ArC. As células tratadas com ArC, foram comparadas com o grupo controle sem tratamento, e com os marcadores nas mesmas condições do grupo tratado. Para os tratamentos com os lipossomas, as células foram tratadas com o DODAC/ArC 10/8 mM e comparadas com o grupo controle tratadas somente com o DODAC vazio, com a finalidade de se verificar as diferenças entre os lipossomas carregados e vazios. As concentrações utilizadas nos tratamentos, foram as obtidas nos ensaios de MTT, expressas em valores de IC50%. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo após marcação com os anticorpos específicos.

Foi possível observar aumento da expressão de p53 em células SKmel-28, tratadas com ArC, produzindo uma diferença significativa com valor de  $p < 0,01$  comparando-se com o grupo controle sem tratamento, caso semelhante ocorreu nas células tumorais murino B16F10, que produziu uma diferença maior que as células SKmel-28. O tratamento com ArC modulou as populações celulares tanto de SKmel-28 como de B16F10, aumentando expressão de Bad e Bax, já os tratamentos com as formulações lipossomais, não produziram aumentos significativos nessas células, somente SKmel-28 para a expressão de Bad, que foi observado um aumento com valor de  $p < 0,05$ .

A expressão de uPA em SKmel-28 diminuiu com o tratamento por ArC, quando comparadas com o controle sem tratamento, por outro lado nessas células, tratadas com DODAC/ArC, houve um aumento na expressão de uPA, porém não significativo. Em B16F10, tratadas com ArC a expressão de uPA diminuiu significativamente, porém, com o tratamento lipossomal, DODAC/ArC, a expressão de uPA produziu um aumento não significativo. A expressão de BCL-2 aumentou em SKmel-28 frente ao tratamento com ArC, porém, esse aumento não foi significativo, no entanto, para B16F10 o aumento foi

Significativo. O tratamento com a formulação lipossomal DODAC/ArC diminuiu significativamente tanto em SKmel-28 como em B16F10.

O tratamento com ArC, aumentou significativamente a expressão de Citocromo C nas células SKmel-28, por outro lado, nas células B16F10, o aumento não foi significativo, nesse sentido, a expressão de Caspase 3, aumentou em SKmel-28, produzindo uma diferença não significativa, e nas células B16F10, também houve um aumento, porém, nessas células o aumento gerou um valor de  $p < 0,01$ , portanto, um aumento maior que nas células SKmel-28. No tratamento com DODAC/ArC 10/8, comparando-se com o tratamento DODAC vazio, a expressão do Citocromo C em SKmel-28, produziu um aumento significativo, o mesmo ocorreu em B16F10, mas a Caspase 3 só aumentou significativamente em SKmel-28.

A expressão de PCNA diminuiu significativamente em SKmel-28 com o tratamento ArC, o mesmo ocorreu em B16F10, no tratamento lipossomal observou-se uma diminuição na expressão de PCNA, porém não significativa em ambas as células. A expressão de TNF-DR<sub>4</sub> aumentou com o tratamento ArC, em ambas as células, mas o aumento só foi significativo em SKmel-28. O tratamento com a formulação lipossomal, gerou aumento significativo em SKmel-28, e um aumento não significativo em B16F10.

A expressão de mTOR diminuiu significativamente com o tratamento ArC em SKmel-28, e B16F10, já a formulação lipossomal, aumentou em SKmel-28 e em B16F10.

Analisando esses resultados, pode-se observar, que a diminuição da expressão da proteína BCL-2 nos tratamentos lipossomais, pode indicar uma via apoptótica nessas células, porém, o tratamento com ArC não produziu o mesmo resultado, mas aumentou a expressão de Citocromo C e conseqüentemente, ocorreu um aumento de Caspase 3, podendo indicar uma via apoptótica mitocondrial. A mesma situação ocorreu em ambas as linhagens B16F10 e SKmel-28 frente ao tratamento lipossomal.

A diminuição de expressão de uPA que está envolvido em remodelação tecidual e migração celular, nas células SKMel-28 e B16F10 tratadas com ArC, pode indicar uma eficiência nesse tratamento.

Outra situação a considerar, é o aumento de BAX e BCL-2 em ambas as linhagens celulares frente ao tratamento com ArC, pois, quando BAX se liga ao BCL-2, interagem promovendo a perda do potencial elétrico mitocondrial que pode estar associado ao aumento do Citocromo C e da proteína pró-apoptótica Caspase 3, sugerindo a capacidade de ativação da via de morte celular regulada por via intrínseca.

No tratamento com a formulação lipossomal DODAC/ArC, em SKMel-28, parece ter mais eficiência no processo apoptótico a expressão de Citocromo C e Caspase 3 do que a expressão de BCL-2 que diminuiu com o tratamento. O aumento de p53 nesse tratamento em SKMel-28, pode não ser determinante no processo apoptótico pela possibilidade de estar mutada nesta linhagem celular.

Na linhagem tumoral B16F10, frente ao tratamento com DODAC/ArC, o que pode ser relevante, é o aumento expressivo de TNF-DR<sub>4</sub>, podendo ser esta uma via apoptótica, a expressão de Citocromo C e de Caspase 3 também aumentaram nesse grupo celular.

O tratamento lipossomal em ambas as células, demonstrou uma diferença entre o DODAC vazio, quando comparado com os resultados de DODAC/ArC, sugerindo que a incorporação de ArC ao lipossoma, proporcionou uma modulação diferenciada nas células tratadas, inferindo uma eficácia dessa formulação.



Gráficos de dispersão *Density Plot* das expressões das proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células tumorais de origem humana Skmel-28 obtidas por citometria de fluxo no comprimento de onda de 488 nm. Grupo controle, sem tratamento.

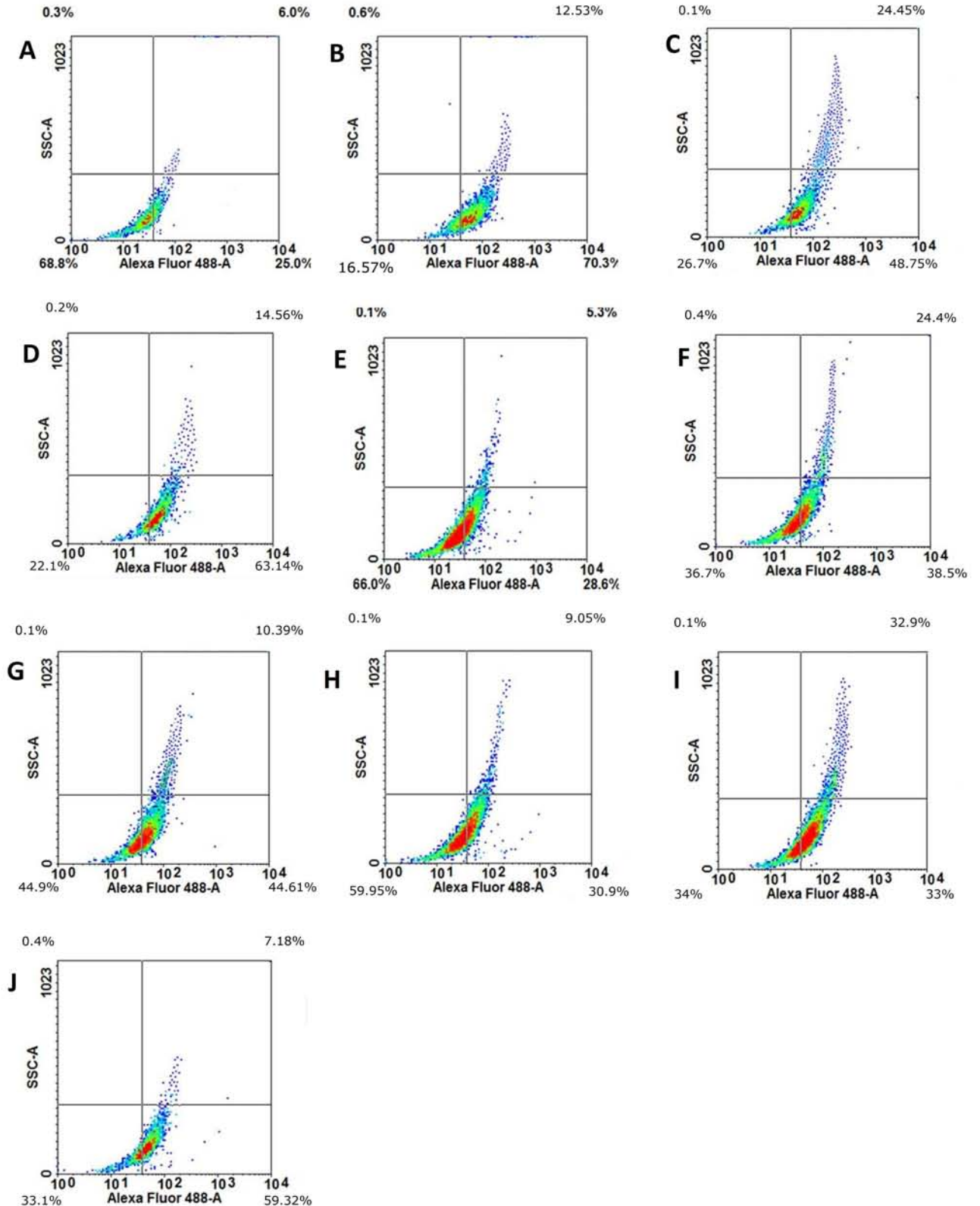


Figura 124. Células SKmel28 sem tratamento. **A:** Controle BAX; **B:** Controle BAD; **C:** Controle uPA; **D:** Controle BCL2; **E:** Controle Caspase 3; **F:** Controle PCNA; **G:** Controle TNF DR<sub>4</sub>; **H:** Controle Citocromo C; **I:** Controle TOR; **J:** Controle p53

Gráficos de dispersão *Density Plot* das expressões das proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células tumorais de origem humana Skmel-28 obtidas por citometria de fluxo no comprimento de onda de 488 nm. Células tratadas com ArC.

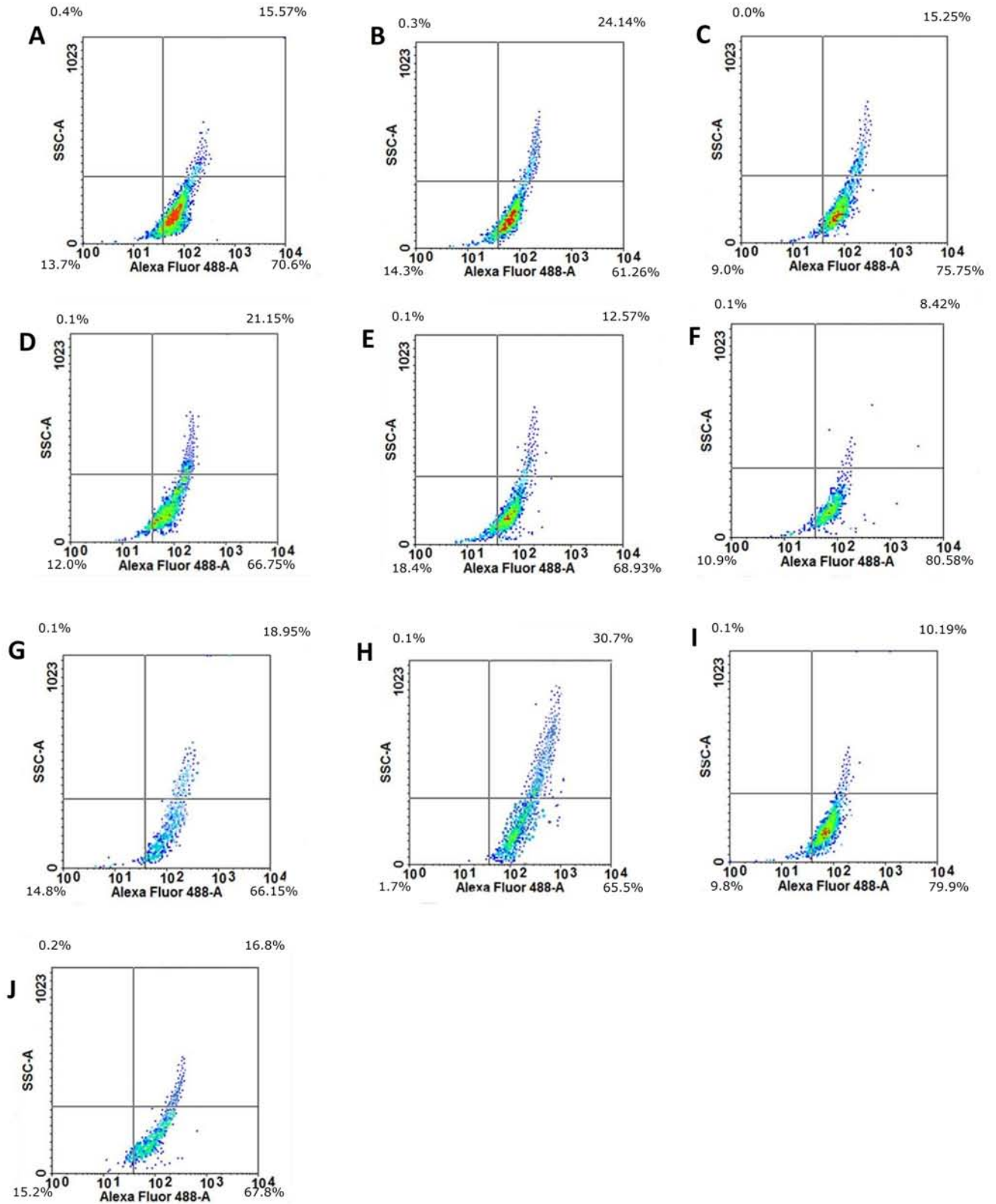


Figura 125. Células SKmel28 tratadas com ArC na concentração de 1,37 mM. A: ArC BAX; B: ArC BAD; C: ArC uPA; D: ArC BCL2; E: ArC Caspase 3; F: ArC PCNA; G: ArC TNF DR<sub>4</sub>; H: ArC Citocromo C; I: ArC mTOR; J: ArC p53.

Gráficos de dispersão *Density Plot* das expressões das proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células tumorais de origem humana Skmel-28 obtidas por citometria de fluxo no comprimento de onda de 488 nm. Células tratadas com DODAC vazio.

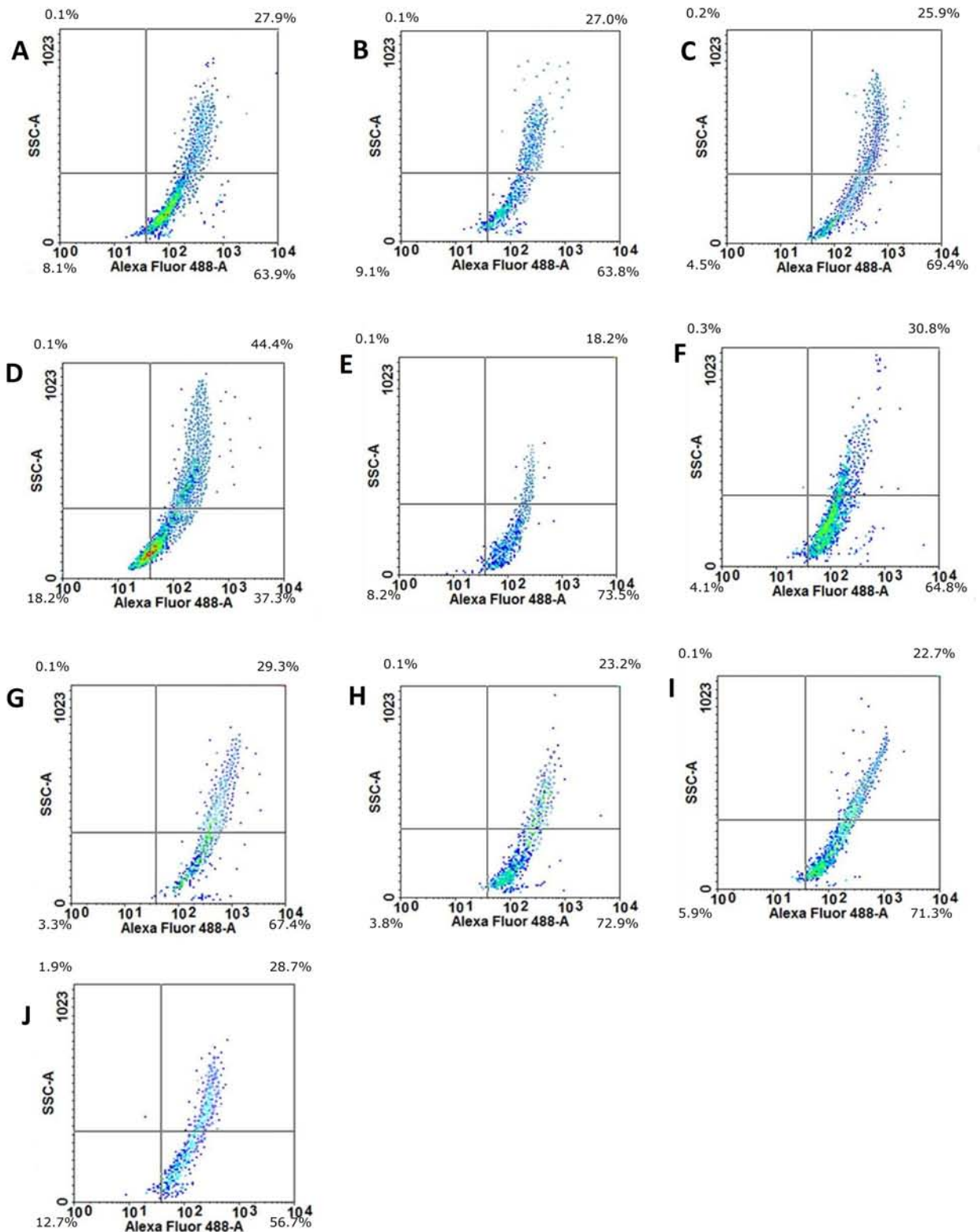


Figura 126. Células SKmel28 tratadas com formulação lipossomal DODAC vazio na concentração de 0,0083 mM. **A:** DODAC Vazio BAX; **B:** DODAC Vazio BAD; **C:** DODAC Vazio uPA; **D:** DODAC Vazio BCL2; **E:** DODAC Vazio Caspase 3; **F:** DODAC Vazio PCNA ; **G:** DODAC Vazio TNF DR<sub>4</sub> ; **H:** DODAC Vazio Citocromo C ; **I:** DODAC Vazio mTOR; **J:** DODAC Vazio p53

Gráficos de dispersão *Density Plot* das expressões das proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células tumorais de origem humana Skmel-28 obtidas por citometria de fluxo no comprimento de onda de 488 nm. Células tratadas com DODAC vazio.

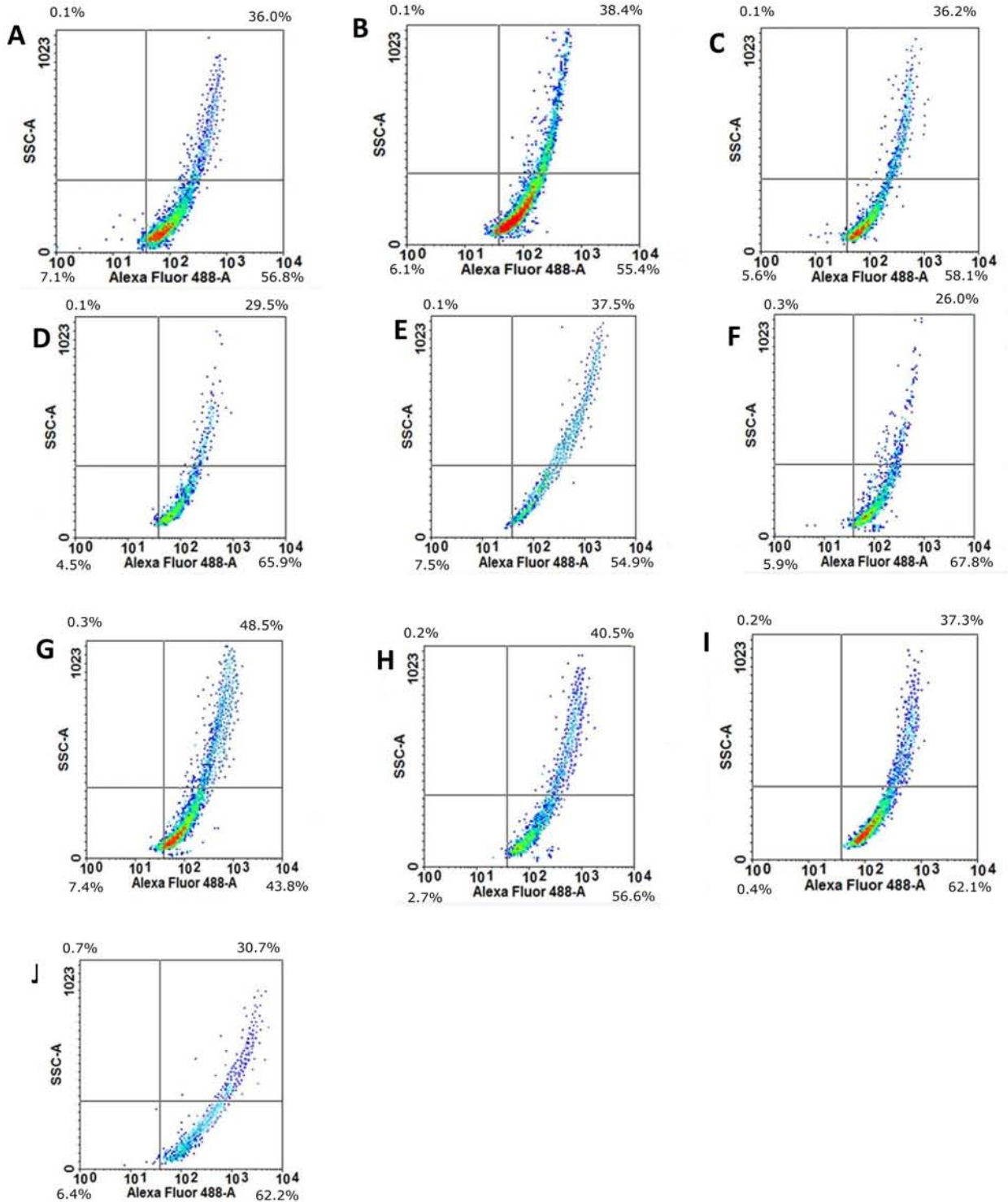


Figura 127. Células SKmel28 tratadas com formulação lipossomal DODAC/ArC na concentração de 0,022 mM (formulação 10/8 mM). **A:** DODAC/ArC BAX; **B:** DODAC/ArC BAD; **C:** DODAC /ArC uPA; **D:** DODAC /ArC BCL2; **E:** DODAC /ArC Caspase 3; **F:** DODAC /ArC PCNA ; **G:** DODAC /ArC TNF DR<sub>4</sub> ; **H:**DODAC /ArC Citocromo C ; **I:** DODAC /ArC mTOR; **J:** DODAC /ArC p53.

Gráficos comparativos das análises estatísticas das expressões dos marcadores em células de melanoma humano Skmel-28.

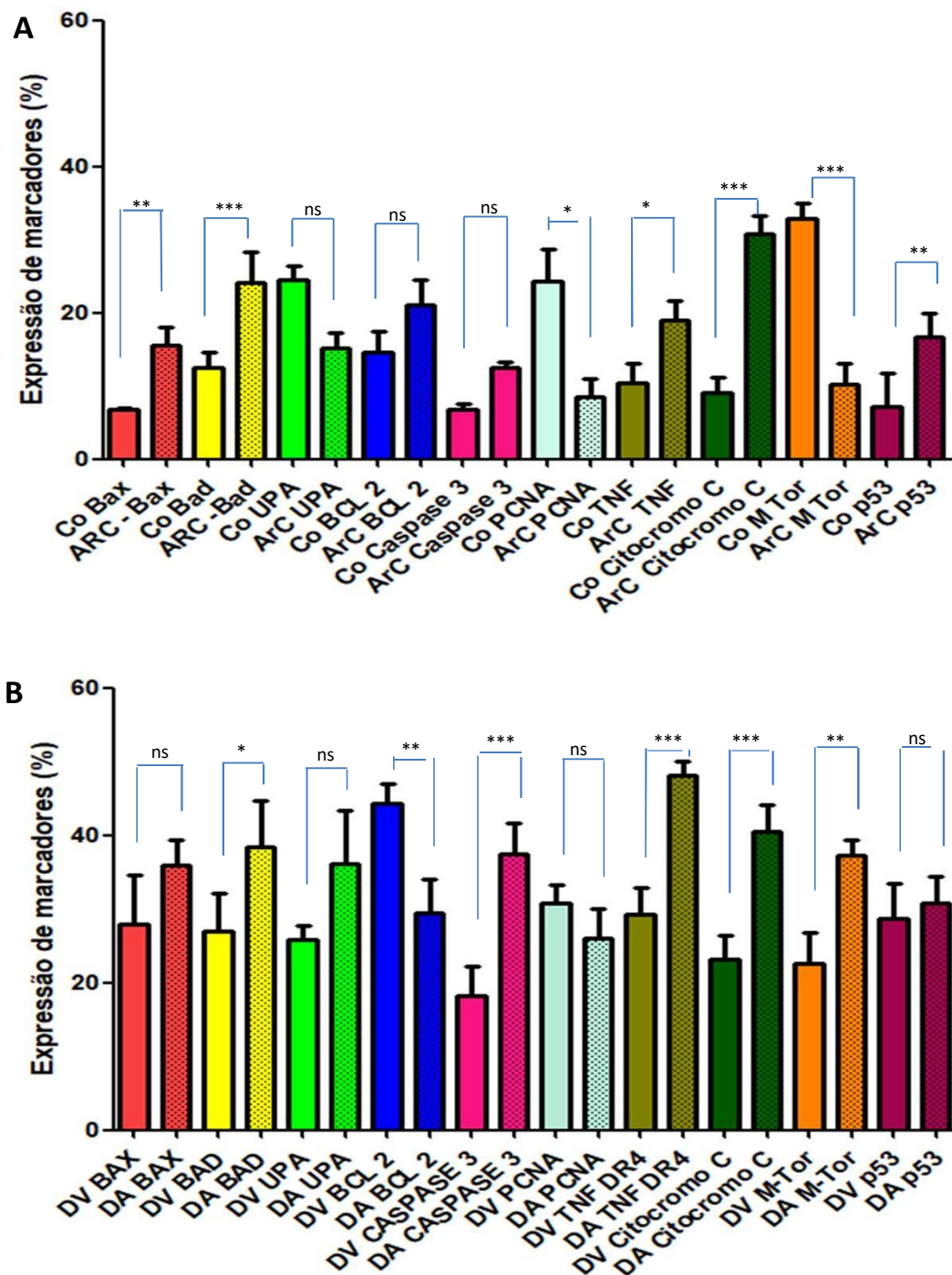


Figura 128. Gráficos comparativos das expressões dos marcadores em células de melanoma humano SKmel28. **A**: Controle / tratadas com ArC à 1,37 mM; **B**: DODAC vazio a 0,0083 mM e DODAC/Arc 0,022 mM (DODAC/Arc na formulação 10/8 mM). Análise estatística realizada pelo programa *GraphPad Prism 5* por One-way ANOVA utilizando-se o método Tukey, considerando-se os seguintes intervalos:  $p < 0,05$  \*;  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,001$  \*\*\*; ns : não significativo.

Co: Controle; ArC: Extrato; DV: DODAC Vazio; DA: DODAC extrato Arc.

Gráficos de dispersão *Density Plot* das expressões das proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células tumorais de origem murino B16F10 obtidas por citometria de fluxo no comprimento de onda de 488 nm. Células sem tratamento.

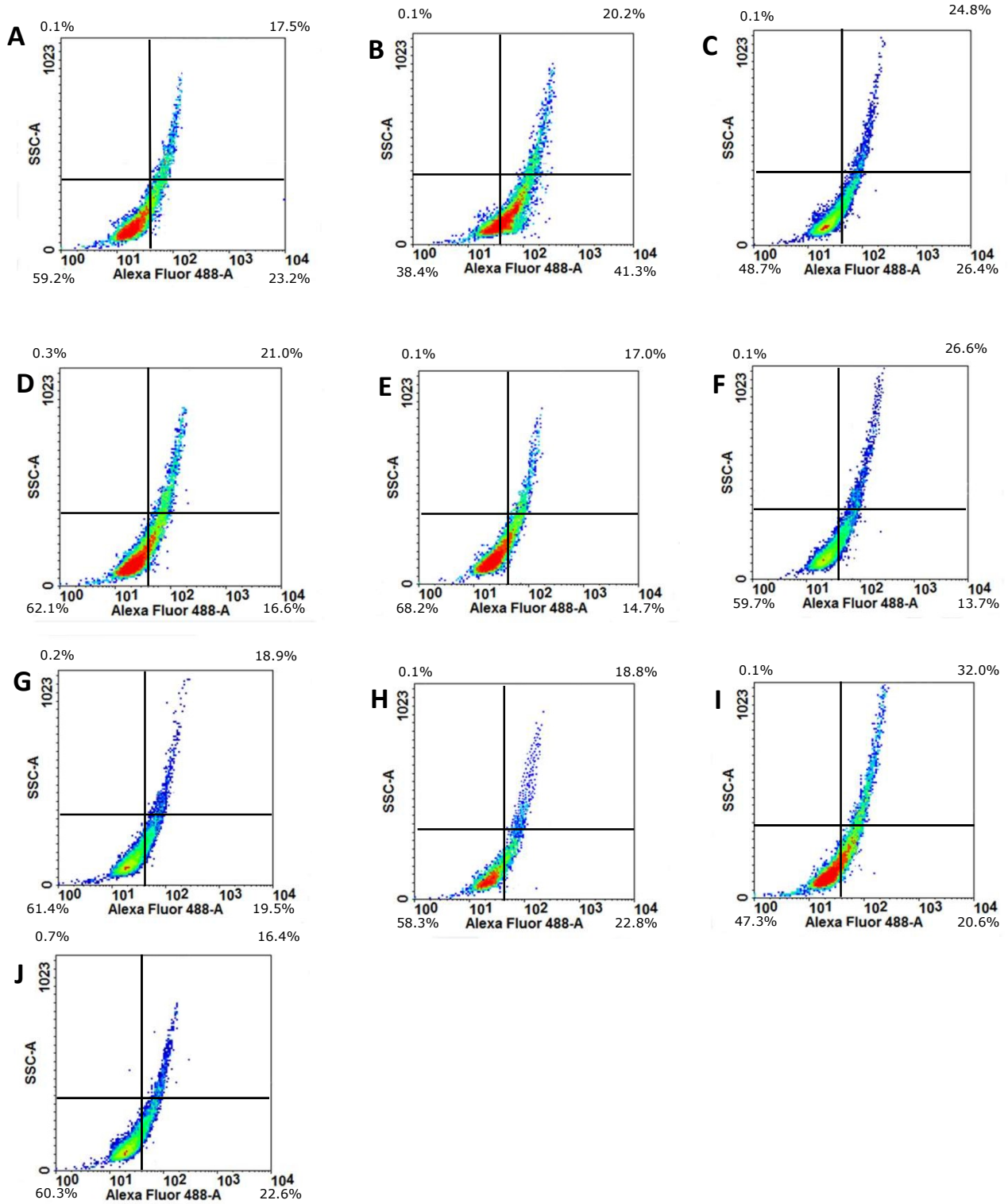


Figura 129. Células B16F10 sem tratamento. **A**: Controle BAX; **B**: Controle BAD; **C**: Controle uPA; **D**: Controle BCL2; **E**: Controle Caspase 3; **F**: Controle PCNA ; **G**: Controle TNF DR<sub>4</sub> ; **H**: Controle Citocromo C ; **I**: Controle M-TOR; **J**: Controle p53

Gráficos de dispersão *Density Plot* das expressões das proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células tumorais de origem murino B16F10 obtidas por citometria de fluxo no comprimento de onda de 488 nm. Células tratadas com ArC.

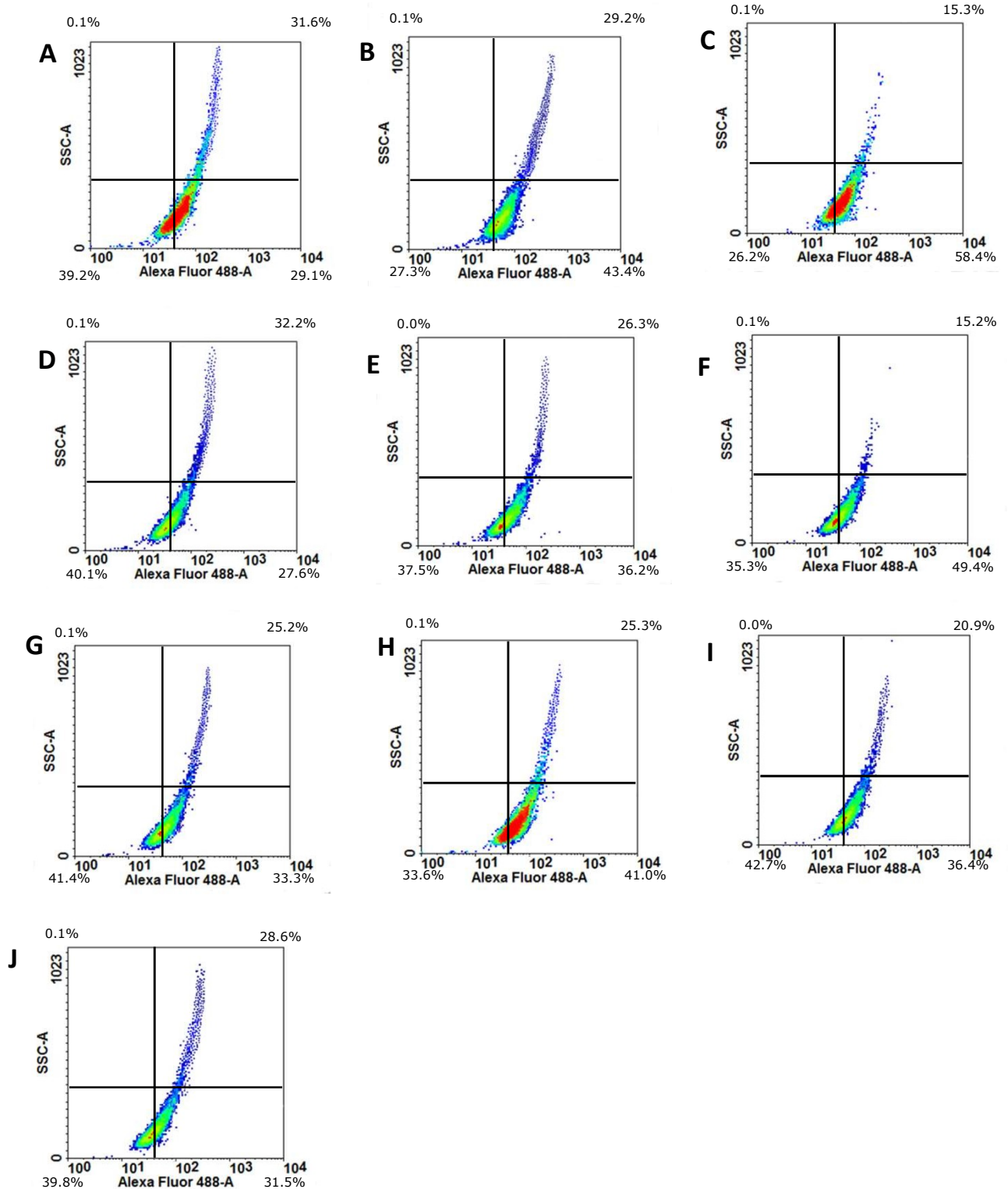


Figura 130. Células B16F10 tratadas com ArC a 0,937 mM. **A:** ArC BAX; **B:** ArC BAD; **C:** ArC uPA; **D:** ArC BCL2; **E:** ArC Caspase 3; **F:** ArC PCNA; **G:** ArC TNF DR<sub>4</sub>; **H:** ArC Citocromo C; **I:** ArC M-TOR; **J:** ArC p53

Gráficos de dispersão *Density Plot* das expressões das proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células tumorais de origem murino B16F10 obtidas por citometria de fluxo no comprimento de onda de 488 nm. Células tratadas com DODAC vazio.

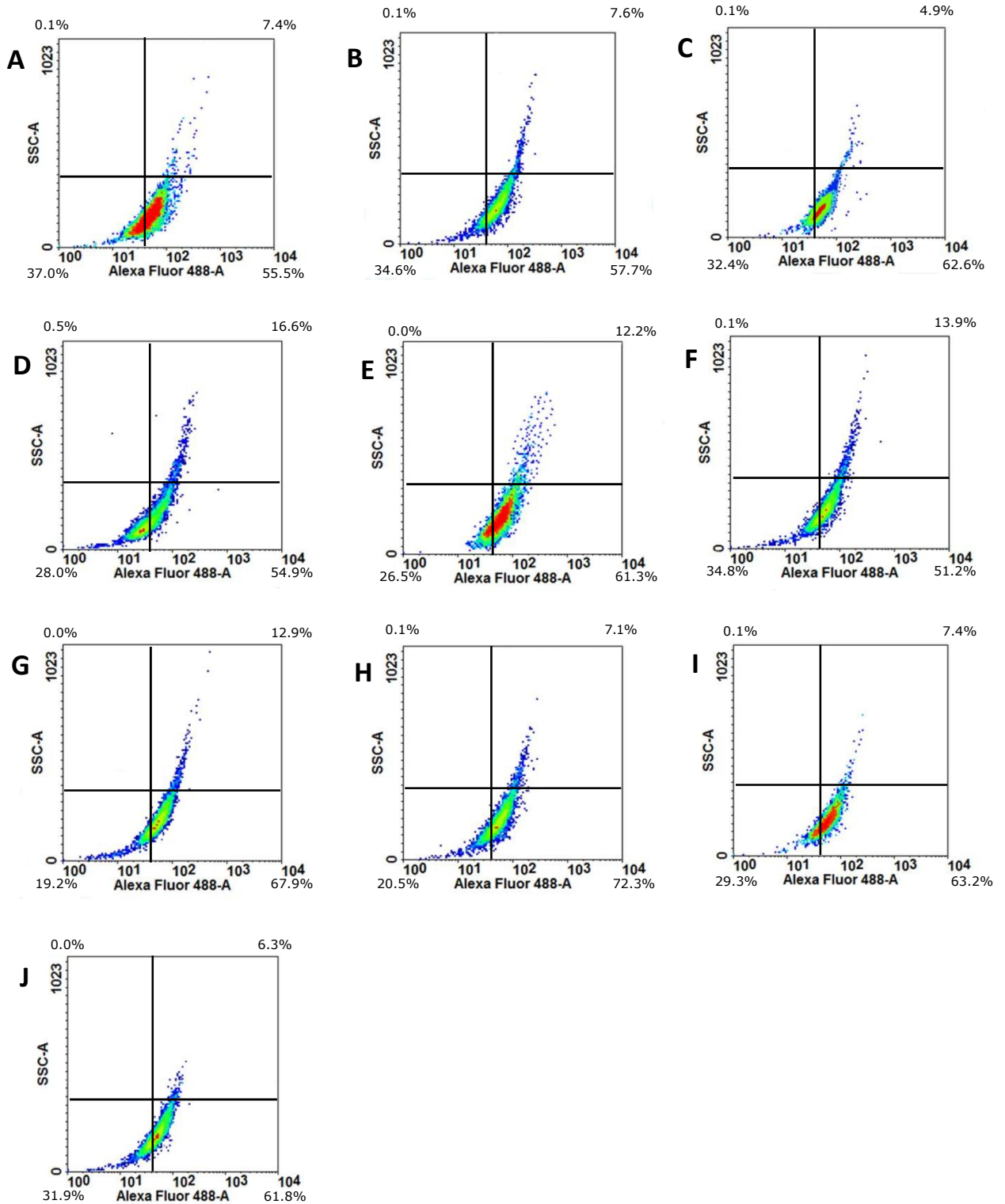


Figura 131. Células B16F10 tratadas com formulação lipossomal DODAC vazio a 0,046 mM. **A:** DODAC Vaz BAX; **B:** DODAC Vaz BAD; **C:** DODAC Vaz uPA; **D:** DODAC Vaz BCL2; **E:** DODAC Vaz Caspase 3; **F:** DODAC Vaz PCNA ; **G:** DODAC Vaz TNF DR<sub>4</sub> ; **H:** DODAC Vaz Citocromo C ; **I:** DODAC Vaz M-TOR; **J:** DODAC Vaz p53.



Gráficos de dispersão *Density Plot* das expressões das proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e proliferação nas células tumorais de origem murino B16F10 obtidas por citometria de fluxo no comprimento de onda de 488 nm. Células tratadas com DODAC/ArC.

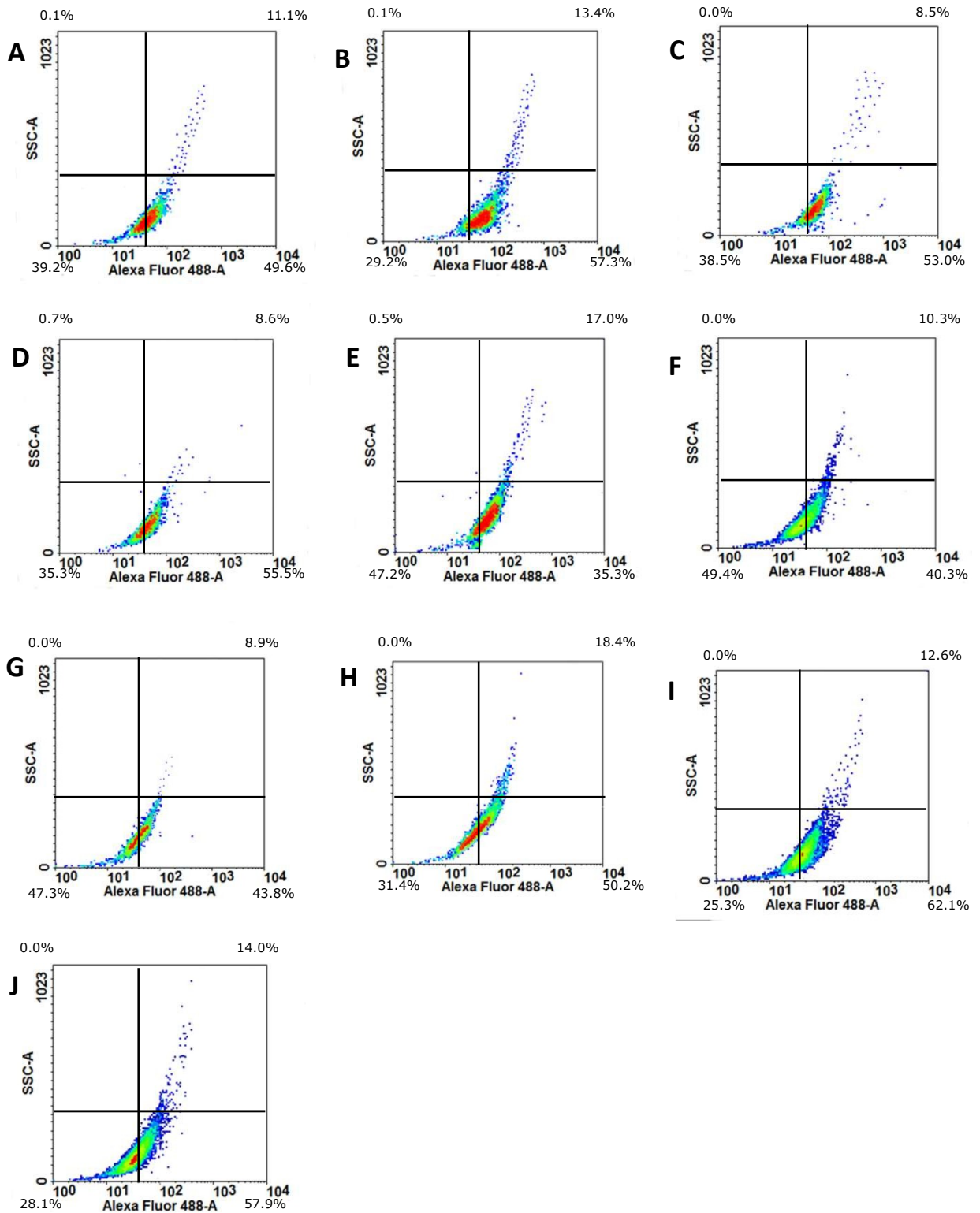


Figura 132. Células B16F10 tratadas com formulação lipossomal DODAC/ArC a 0,013 mM (formulação 10/8 mM). **A:** DODAC/ArC BAX; **B:** DODAC/ArC BAD; **C:** DODAC/ArC uPA; **D:** DODAC/ArC BCL2; **E:** DODAC/ArC Caspase 3; **F:** DODAC/ArC PCNA; **G:** DODAC/ArC TNF DR<sub>4</sub>; **H:** DODAC/ArC Citocromo C; **I:** DODAC/ArC M-TOR; **J:** DODAC/ArC p53.

Gráficos comparativos das análises estatísticas das expressões dos marcadores em células de melanoma murino B16F10.

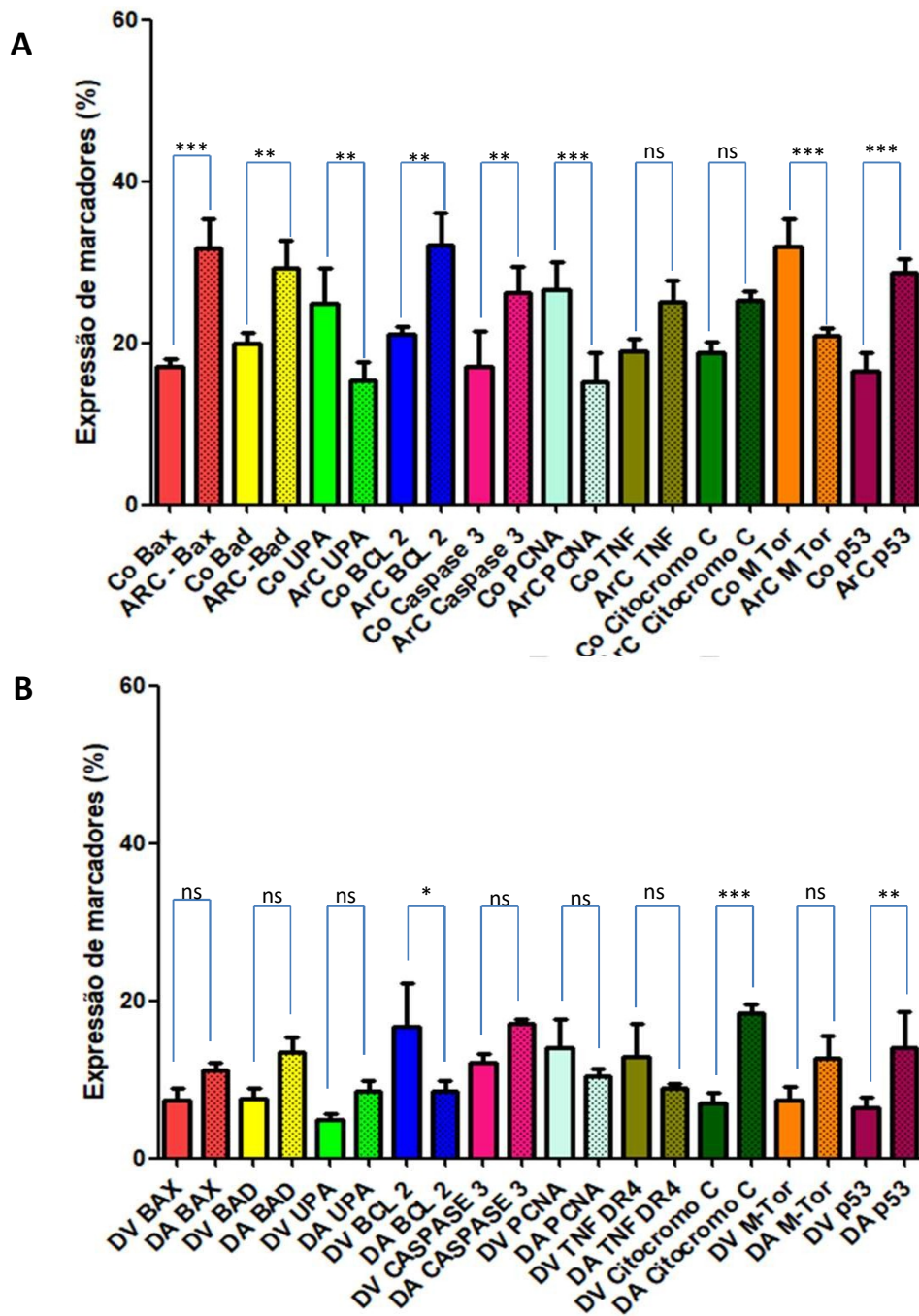


Figura 133. Gráficos comparativos das expressões dos marcadores em células de melanoma murino B16F10. **A**: Controle / tratadas com ArC à 0,937 mM; **B**: DODAC vazio a 0,046 mM e DODAC/Arc 0,013 mM (DODAC/Arc na formulação 10/8 mM). Análise estatística realizada pelo programa GraphPad Prism por One-way ANOVA utilizando-se o método Tukey, considerando-se os seguintes intervalos:  $p < 0,05$  \*;  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,001$  \*\*\*; ns : não significativo.

Co: Controle; ArC: Extrato; DV: DODAC Vazio; DA: DODAC extrato ArC.

### **5.13. Avaliação da expressão mitocondrial com o fluorocromo MitoRed pra análise em microscópio confocal a laser.**

Foi realizada por microscopia confocal a laser nas células tumorais SKmel-28 e B16F10 frente aos tratamentos, utilizando-se os valores de IC50%, conforme tabela 8, ficando para SKmel-28 extrato ArC na concentração de 1,2 mM, dacarbazina na concentração de 1,8 mM, DODAC/ArC 10/8 mM na concentração de 0,02 mM, DODAC/2AEH<sub>2</sub>F 10/4 mM na concentração de 0,07 mM, DODAC/ArC/2AEH<sub>2</sub>F 10/4/4 mM na concentração de 0,020 mM. Para as células de melanoma murino B16F10, as concentrações foram: extrato ArC na concentração de 1 mM, dacarbazina na concentração de 1 mM, DODAC/ArC 10/8 mM na concentração de 0,01 mM, DODAC/2AEH<sub>2</sub>F 10/4 mM na concentração de 0,07 mM, DODAC/ArC/2AEH<sub>2</sub>F 10/4/4 mM na concentração de 0,020 mM.

O marcador MitoRed da *Biosciences, Rockville, USA*, é produz fluorescência vermelha que cora as mitocôndrias em células vivas e seu acúmulo depende de potencial de membrana. Este marcador, já vem preparado com o DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) que é um marcador para o núcleo, se ligando fortemente a regiões de DNA, produzindo uma coloração azul.

No grupo controle, observou-se a fluorescência das mitocôndrias dispersas uniformemente no citoplasma e o núcleo apresentou cromatina com dispersão normal e contorno definido em ambas as células. As células tratadas com ArC, não houve alterações morfológicas no núcleo, por outro lado, no citoplasma as mitocôndrias apresentaram certo grau de condensação, tanto em SKmel-28 como em B16F10. As células tratadas com dacarbazina apresentaram mais alterações nucleares do que as tratadas com ArC. A marcação mitocondrial ficou mais fraca no tratamento com dacarbazina, para ambas as linhagens celulares.

As formulações lipossomais, produziram alterações significativas na constituição da membrana plasmática, aparentando uma dispersão difusa em ambas as linhagens celulares, e as mitocôndrias ficaram sem uma resolução específica, provavelmente por algum tipo de interação com as membranas.

## Microscopia confocal em células de melanoma murino B16F10.

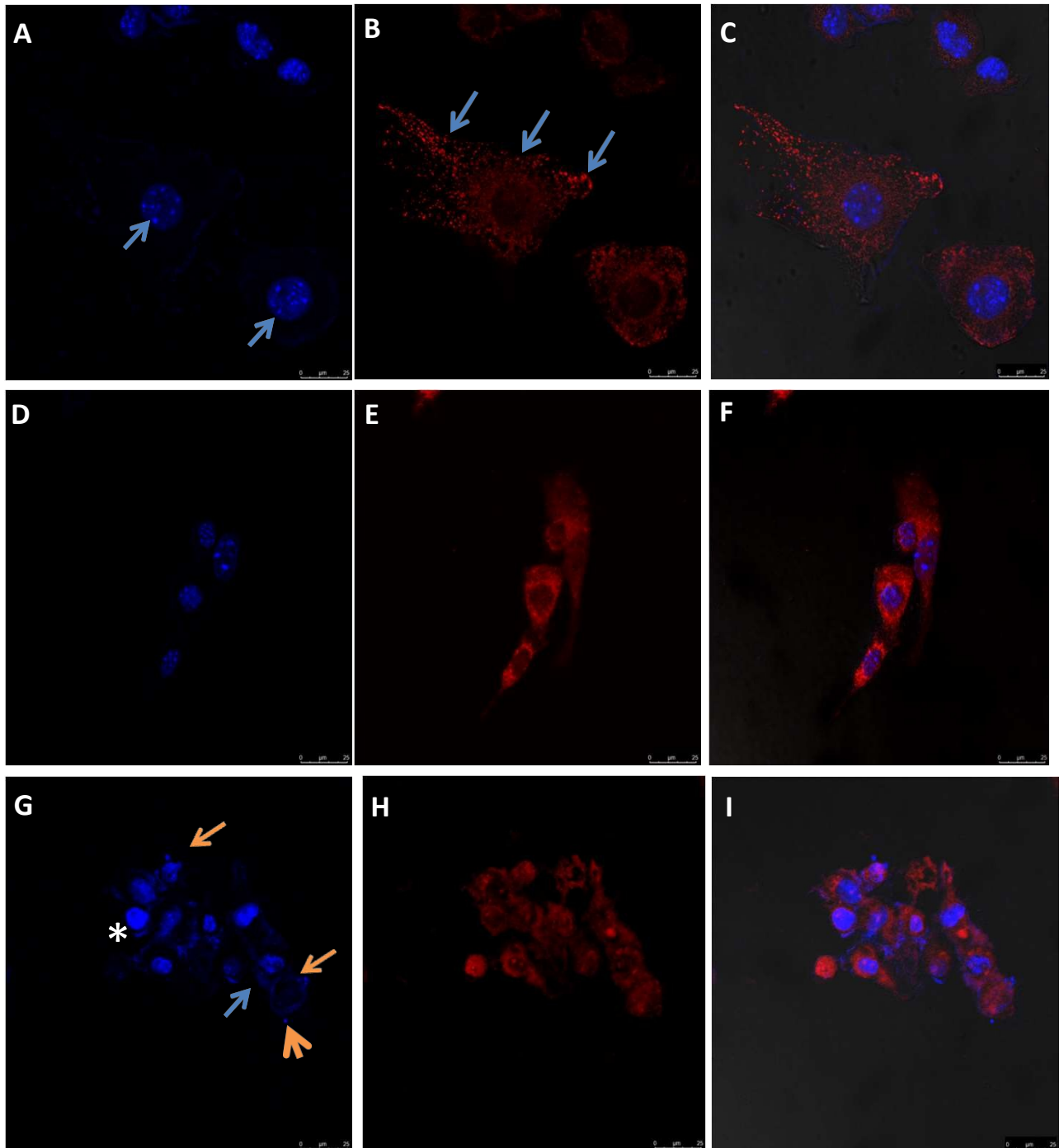


Figura 134. Microscopia confocal em células tumorais B16F10 marcadas com MitoRed, para estudo mitocondrial e DAP para marcação do núcleo. Barras para todas as imagens 25 µm. **A,B e C:** grupo controle. Em **A** núcleo com material interno com dispersão normal, nucléolos (seta); em **B**, conteúdo citoplasmático apresentando mitocôndrias dispersas uniformemente (setas); em **C**, composição das duas marcações. **D,E e F:** células tratadas com extrato ArC na concentração de 1 mM. Em **D**, material nuclear aparentando características morfológicas semelhantes ao controle; **E:** material citoplasmático apresentando certo grau de condensação mitocondrial, citoplasma retraído em relação ao controle; **F**, composição das duas técnicas; **G,H e I:** células tratadas com Dacarbazina na concentração de 1mM; **G**, material nuclear condensado (asterisco) e núcleo apresentando fraca marcação de conteúdo interno (seta azul), provável formação de micronúcleo (seta laranja); **H:** Alteração no contorno da membrana plasmática, mitocôndrias com fraca marcação; **I:** composição das duas técnicas.

## Microscopia confocal em células de melanoma murino B16F10

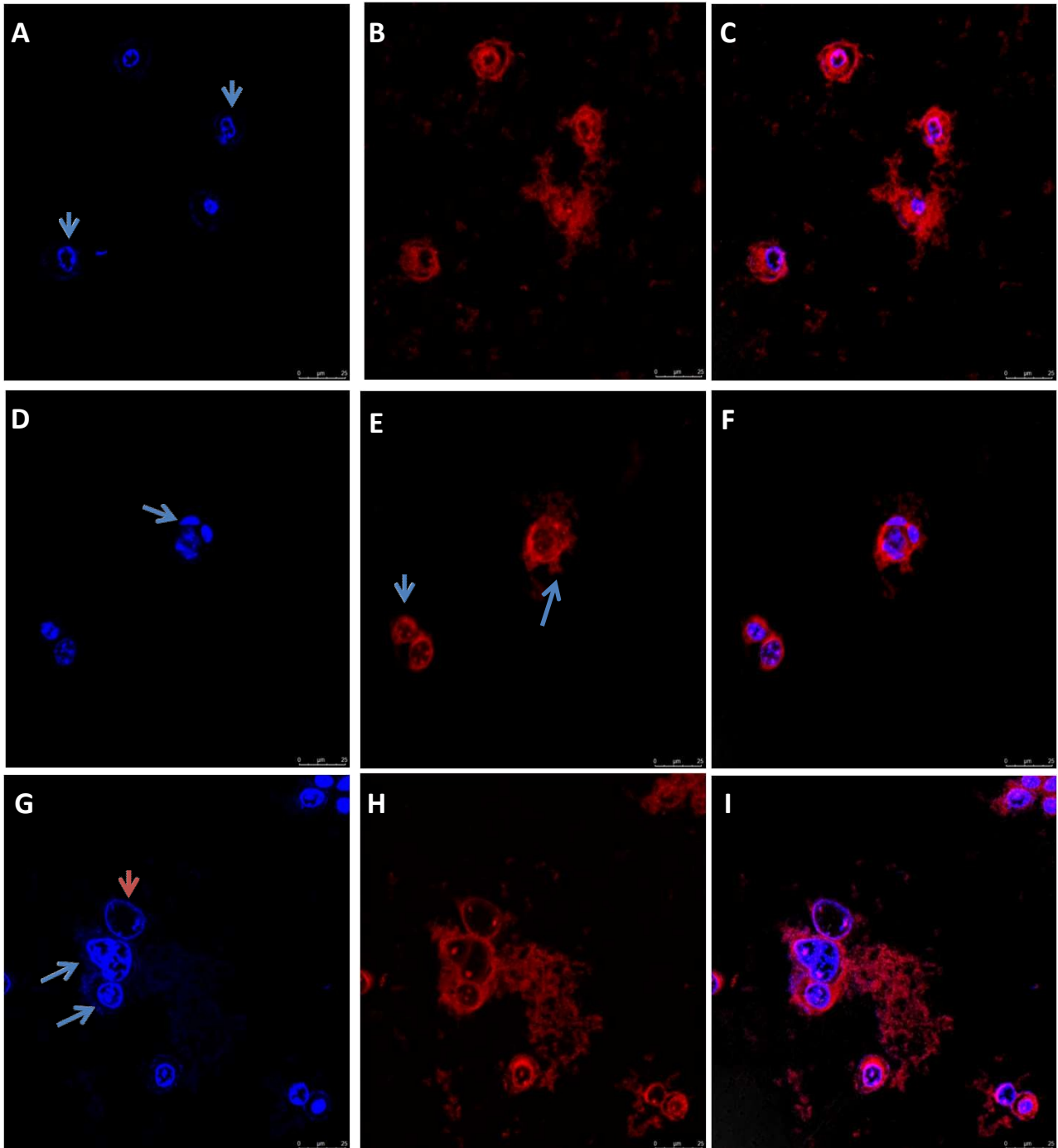


Figura 135. Microscopia confocal em células tumorais B16F10 marcadas com MitoRed, para estudo mitocondrial. Barras 25  $\mu\text{m}$ . **A, B e C:** grupo tratado com DODAC/ArC 10/8 mM na concentração de 0.01 mM. **A:** alteração do conteúdo nuclear, com cromatina condensada no envoltório nuclear (setas); **B:** alteração morfologia e contorno do material citoplasmático com marcação mitocondrial inespecífica; **C:** composição das duas marcações, demonstrando presença de corpos apoptóticos e fragmentação nuclear. **D, E e F:** células tratadas com DODAC/ 2AEH<sub>2</sub>F 10/4 mM na concentração de 0,03 mM. Em **G**, núcleos com condensação alterada da cromatina (setas), **H** alteração citoplasmática; **I:** composição das duas técnicas. **G, H e I:** células tratadas com DODAC/ArC/2AEH<sub>2</sub>F na concentração de 10/4/4 mM na concentração de 0.013 mM. **G:** núcleos com condensação alterada da cromatina (setas) núcleo com baixa contrastação da cromatina (seta laranja); **H** alteração citoplasmática com consequente dispersão de material interno e inespecificidade morfológica mitocondrial, aparentando corpos apoptóticos ; **I:** composição das duas técnicas.

## Microscopia confocal em células de melanoma humano Skmel-28.

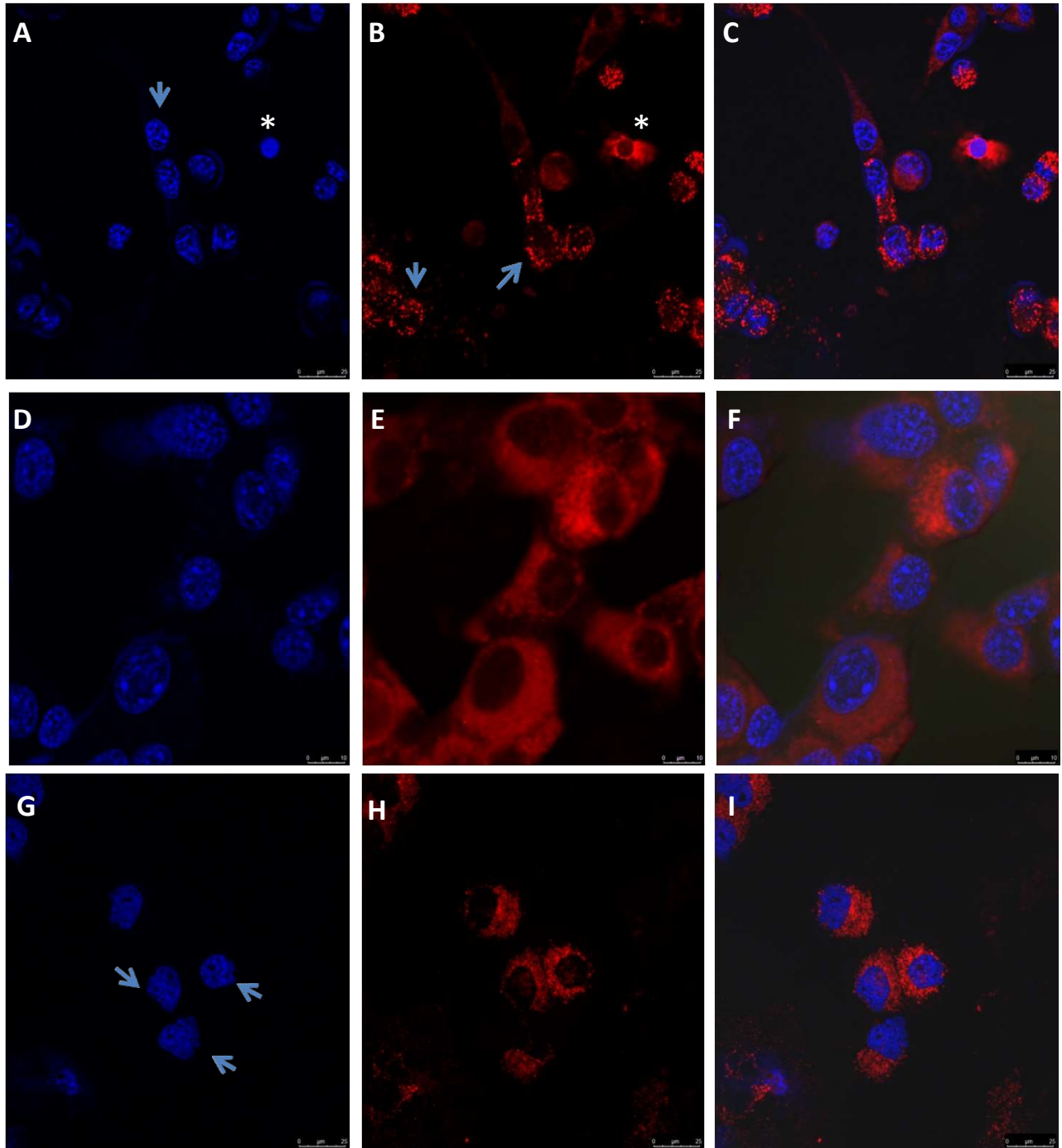


Figura 136. Microscopia confocal em células tumorais de melanoma humano SKMel 28 marcadas com MitoRed para estudo mitocondrial e DAP para marcação do núcleo. Barras 25  $\mu\text{m}$ . **A, B e C**: grupo controle. Em **A** núcleo com material interno em dispersão normal (seta), núcleo com elevada condensação da cromatina (asterisco); **B**, conteúdo citoplasmático apresentando mitocôndrias dispersas uniformemente (setas), célula com dispersão mitocondrial alterada (asterisco); **C**: composição das duas marcações. **D, E e F**: células tratadas com ArC na concentração de 1,2mM. Em **D**, material nuclear apresentando discreta alteração; **E** mitocôndrias inespecificidade morfológica e fraca marcação; **F**, composição das duas técnicas. **G, H e I**: grupo tratado com Dacarbazina na concentração de 1,7mM. **G**: alteração do conteúdo nuclear, com alterações na morfologia do envoltório nuclear (setas); **H**, alteração na distribuição do material citoplasmático com marcação mitocondrial não tão definidas como no grupo controle; **I**, composição das duas marcações, evidenciando retração citoplasmática.

## Microscopia confocal em células de melanoma humano Skmel-28.

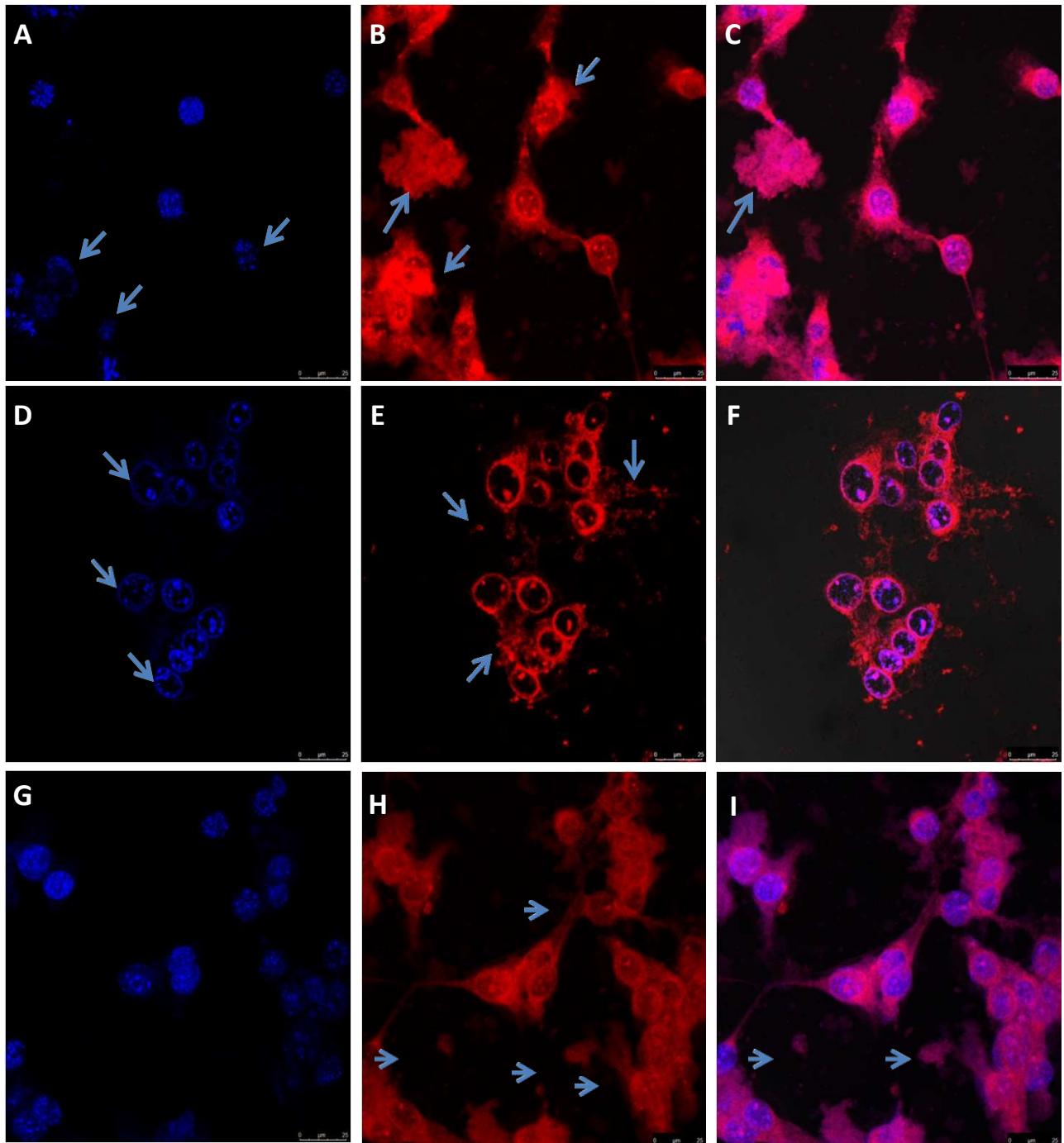


Figura 137. Microscopia confocal em células tumorais SKmel 28 marcadas com MitoRed, para estudo mitocondrial e DAP para marcação de material nuclear. Barras 25  $\mu\text{m}$ . **A, B e C**: grupo tratado com DODAC/ArC 10/8 mM a 0,022 mM. **A**, alteração do conteúdo nuclear, com alterações na morfologia do envoltório nuclear (setas); **B**, alteração na distribuição do material citoplasmático com marcação mitocondrial sem definição e provável rompimento da membrana citoplasmática (setas); **C**: composição das duas marcações, evidenciando alteração citoplasmática (seta). **D, E e F**: Grupo tratado com DODAC/2AEH<sub>2</sub>F 10/4 mM na concentração de 0,07 mM. **D**: Material nuclear com condensação periférica aderido ao envoltório nuclear, característica de células em apoptose (setas); **E**: Conteúdo citoplasmático com dispersão difusa, aparente rompimento da membrana plasmática (setas); **F**: Composição das duas técnicas. **G, H e I**: células tratadas com DODAC/2AEH<sub>2</sub>F 10/4/4 mM, na concentração de 0,02mM. **G**: Material nuclear apresentando características morfológicas semelhantes ao controle; **H**: A marcação do Mito Red não apresentou especificidade e aparentemente houve rompimento das membranas mitocondriais, aparente rompimento da membrana citoplasmática (setas); **I**: composição das duas técnicas, aparente rompimento de membranas citoplasmáticas (setas).

#### 5.14. Coloração pelo método Papanicolaou

A coloração Papanicolaou , foi utilizada por ser uma metodologia muito empregada em exames clínicos para identificação e diferenciação por meio de alterações morfológicas em células de secreções do corpo ou outros materiais com conteúdo celular.

Foram utilizadas para este ensaio células de melanoma humano SKmel-28, e as células foram tratadas por um período de 24 horas, sendo, um o grupo controle, outro tratado com ArC a 1,2 mM, a dacarbazina também foi utilizada para identificar padrão morfológico de morte celular, e o outro tratamento foi com a formulação lipossomal 10/8 mM na concentração de 0,022 mM.

No grupo controle, foram observadas figuras de mitose, com células em telófase, metáfase, prófase, e algumas modificações no citoplasma indicando certa atividade, provavelmente de secreção conforme demonstrado na figura 138 em “F”.

As células tratadas com ArC, não apresentaram figuras de mitose, e houve, alterações citoplasmáticas, como vacuolização, fragmentação e contorno citoplasmático indefinido.

No tratamento com dacarbazina, não foram observadas figuras de mitose, e uma característica neste caso, muitas células perderam a basofilia nuclear, esperada pela ação do corante hematoxilina, por outro lado, o contorno citoplasmático foi preservado apesar do processo de vacuolização.

Quando foram observadas as células tratadas com a formulação lipossomal DODAC/ArC, foi observada uma célula com núcleo em anáfase, porém, com fragmentação citoplasmática, sugerindo que a célula parou nesta fase, e entrou em apoptose por colapso estrutural de organelas. A vacuolização do citoplasma se tornou uma característica corrente na maioria das células tratadas.



Coloração Papanicolaou em células de melanoma humano Skmel-28 sem tratamento.

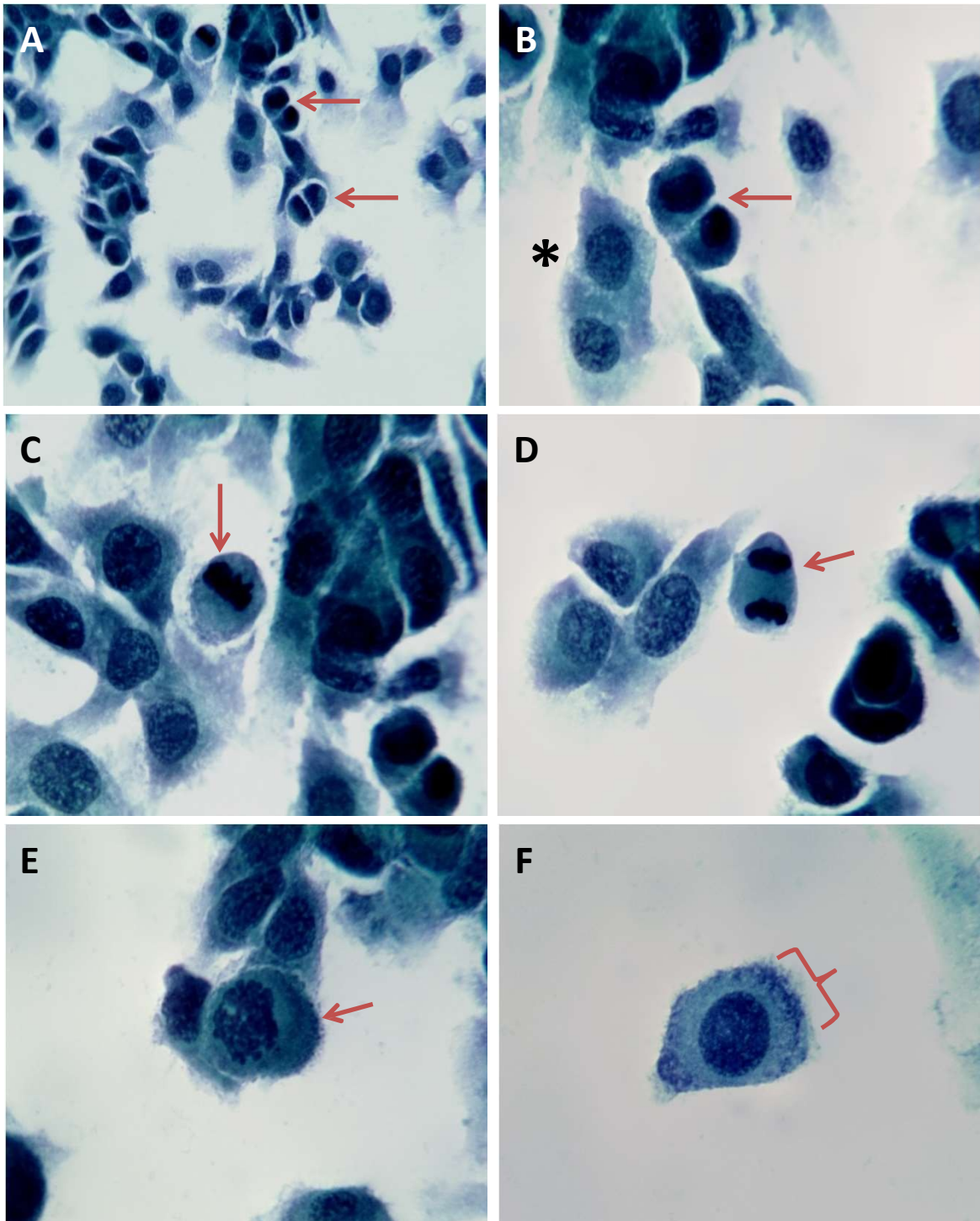


Figura 138. Melanoma humano SKmel 28 grupo controle. **A:** característica das células, figuras de mitose (setas), aumento 500x; **B:** Telófase (seta), células em fase finalizada da mitose (asterisco), aumento 1.250x; **C:** Metáfase (seta); **D:** Telófase final (seta), aumento 1.250x; **E:** Célula com núcleo em prófase, aumento 1.250x; **F:** Região do citoplasma demonstrando basofilia, provavelmente atividade do retículo endoplasmático rugoso, aumento 1.250x. Imagens obtidas em microscópio Zeiss Universal.

Coloração Papanicolaou em células de melanoma humano Skmel-28 tratadas com ArC.

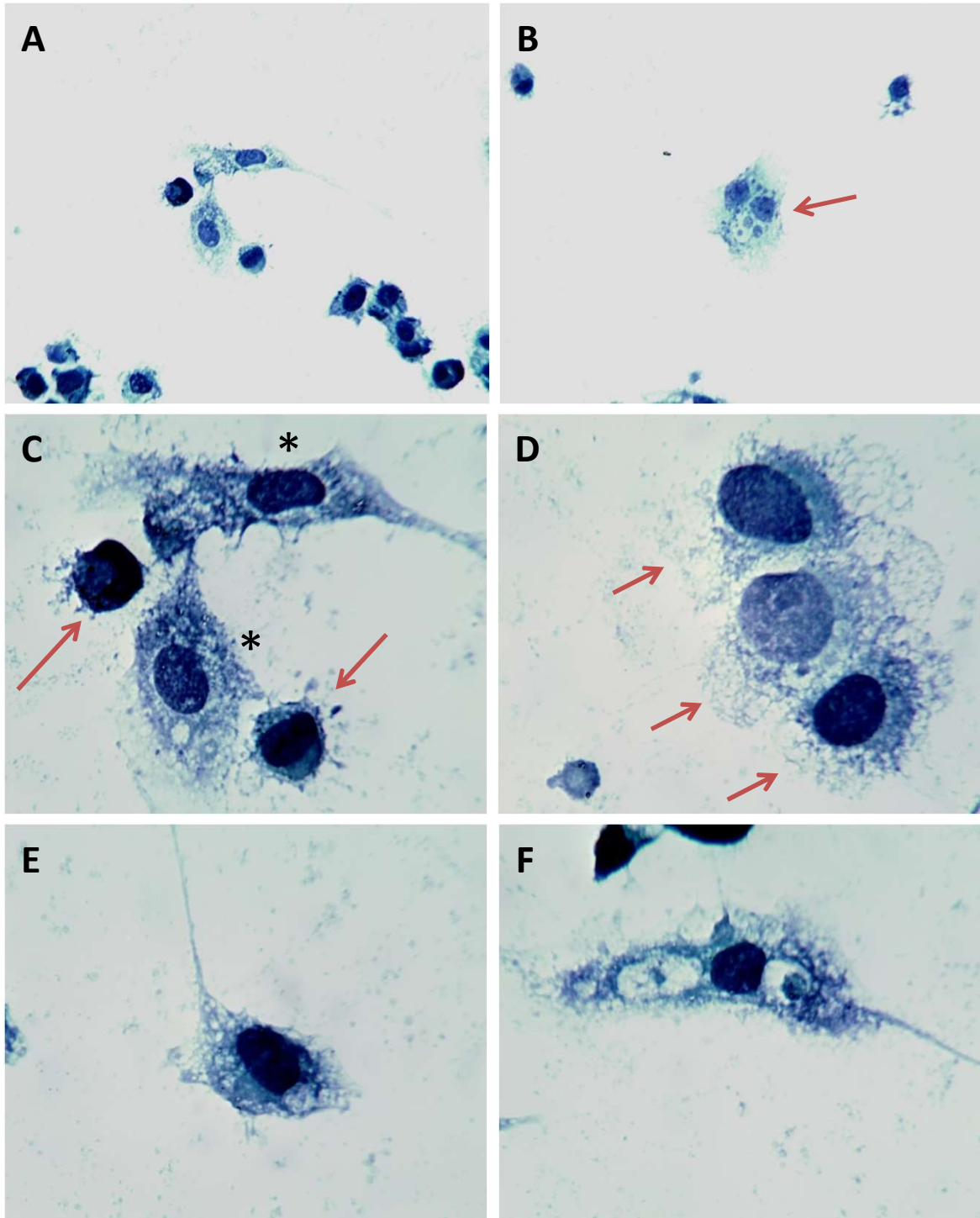


Figura 139. Melanoma humano SKmel 28 grupo tratado com extrato SC 1640 na concentração de 1,2 mM por 24 horas. **A:** característica das células na cultura, ausência de figuras de mitose, aumento 200x; **B:** célula com morfologia atípica (seta) apresentando grânulos basófilos no citoplasma, aumento 200x; **C:** Células com citoplasma vacuolizado (asterisco), células com núcleo apresentando maior basofilia, provavelmente processo mitótico interrompido (setas), aumento 1.250x; **D:** Células apresentando fragmentação citoplasmática com contorno indefinido, aumento 1.250x. **E:** Célula com citoplasma vacuolizado, aumento 1.250x; **F:** Célula com citoplasma vacuolizado em maiores proporções, aumento 1.250x. Imagens obtidas em microscópio Zeiss Universal.

Coloração Papanicolaou em células de melanoma humano Skmel-28 tratadas com dacarbazina .

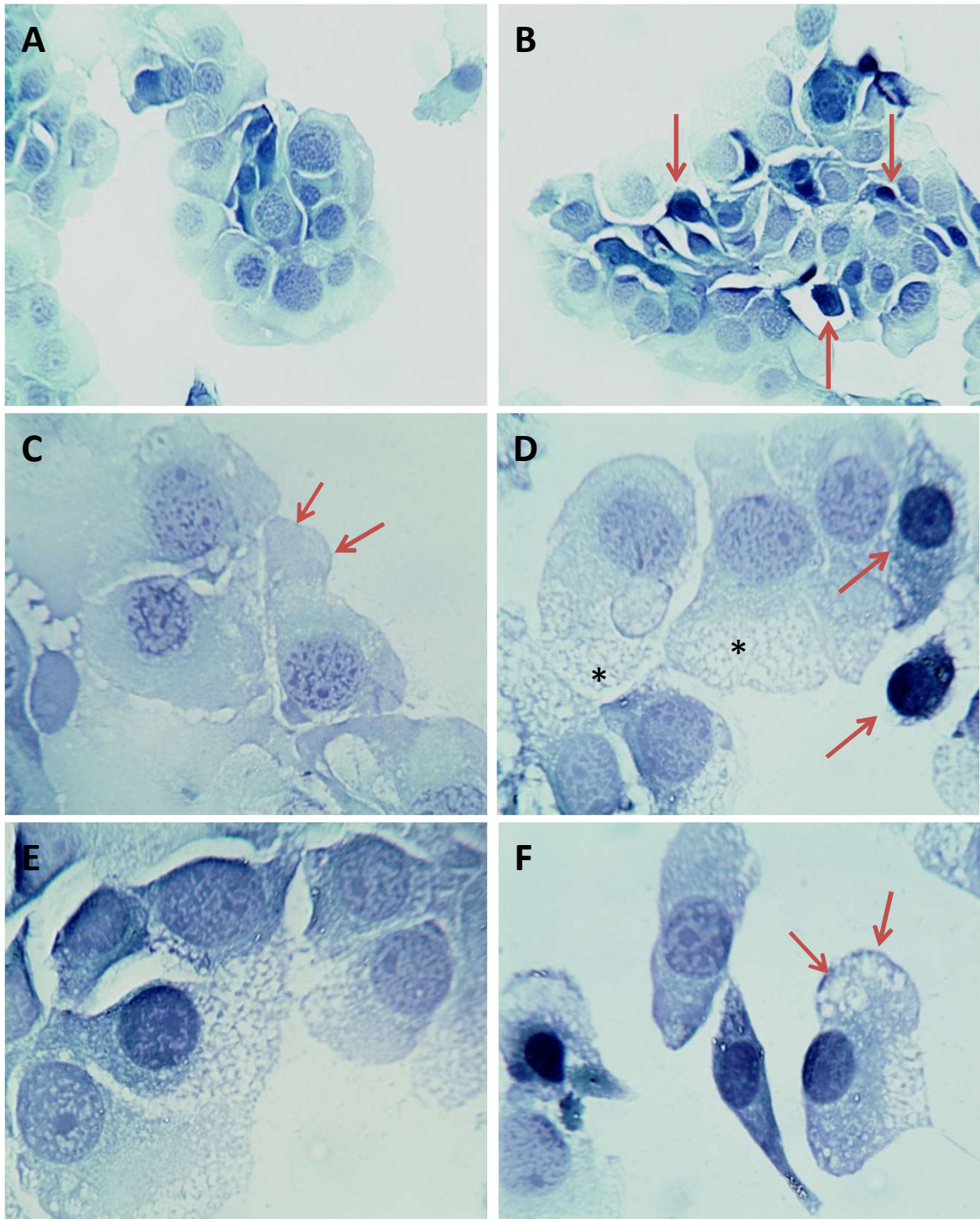


Figura 140. Melanoma humano SKmel 28 grupo tratado com Dacarbazina na concentração de 1,753 mM por 24 horas. **A** : característica das células na cultura, figuras de mitose ausente, aumento 500x; **B**: Características das células na cultura, apresentando poucas células com basofilia nuclear (setas), aumento 200x; **C**: Células com citoplasma vacuolizado, apresentando contorno delineado, formação de *bubbles* (setas), aumento 1.250x; **D**: Células com citoplasma vacuolizado (asterisco), células com núcleo mais basófilo em relação às outras (setas), aumento 1.250x. **E**: Célula com citoplasma vacuolizado, apresentando contorno da membrana celular delineado, aumento 1.250x; **F**: Célula com citoplasma vacuolizado em aparentemente com membrana externa definida, formação de *bubbles* (setas), sem basofilia citoplasmática, aumento 1.250x. Imagens obtidas em microscópio Zeiss Universal.

Coloração Papanicolaou em células de melanoma humano Skmel-28 tratadas com DODAC/ArC na formulação DODAC 10 mM e ArC 8 mM.

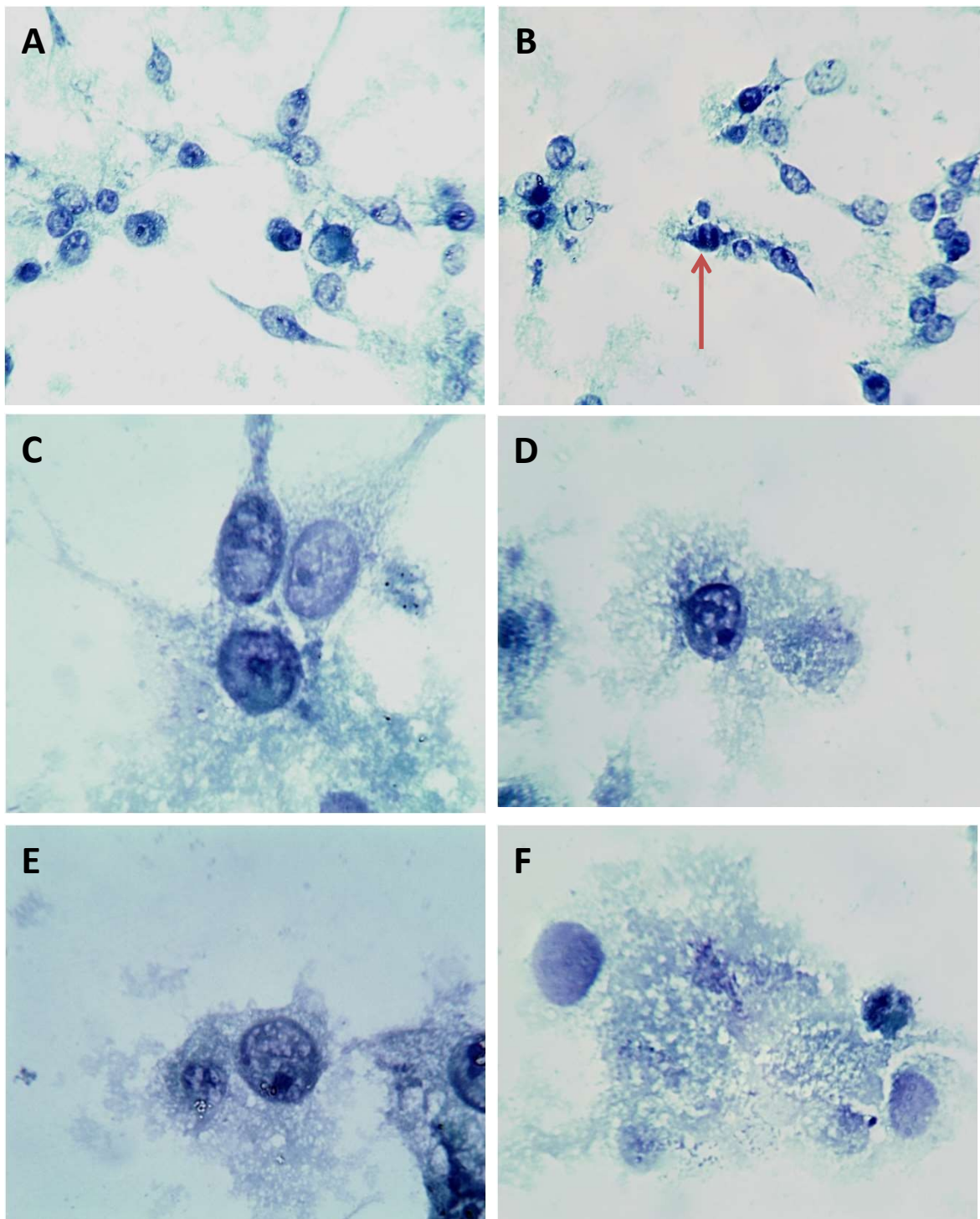


Figura 141. Melanoma humano SKmel 28 grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC a 10 mM e ArC a 8 mM na concentração de 0,022 mM por 24 horas. **A** : característica das células na cultura, figuras de mitose ausentes, aumento 500x; **B**: Características das células na cultura, observa-se uma figura de mitose (seta), provavelmente, célula que parou em anáfase pela condição morfológica do citoplasma, aumento 500x; **C**: Células com citoplasma vacuolizado, sem contorno definido da membrana plasmática, aumento 1.250x; **D**: Células com citoplasma vacuolizado, aumento 1.250x. **E**: Célula com citoplasma vacuolizado, aumento 1.250x; **F**: Célula ou conjunto de células com citoplasma vacuolizado e disforme, aumento 1.250x. AS células nesse tratamento apresentaram maior afinidade citoplasmática ao corante EA-36, caracterizando uma tonalidade esverdeada, podendo ser melhor observado em "A" e "B". Imagens obtidas em microscópio Zeiss Universal.

### **5.15. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em células tumorais B16F10 e SKmel-28**

Essa técnica foi empregada para a avaliação morfológica da interação dos lipossomas nas células e as alterações morfológicas inerentes à este processo, no sentido de contribuir com os outros resultados obtidos. As células foram tratadas por um período de 24 horas com a formulação lipossomal DODAC/ArC 10/8 sendo DODAC 10 mM e ArC 8 mM, aplicando-se a concentração obtida no ensaio MTT no valor de 0,013 mM para B16F10 e 0,022 mM para SKmel-28 conforme tabela 13.

No grupo controle das células de melanoma murino B16F10, observou-se figuras de mitose característica das células aderidas na lamínula, bem como as estruturas de aderência ao substrato.

Nas células B16F10, tratadas como os lipossomas, observou-se modificações morfológicas correspondentes às alterações ocasionadas pelo processo apoptótico, como perda de adesão, formação de corpos apoptóticos e os lipossomas aderidos à membrana conforme figura 143.

O grupo controle das células de melanoma humano SKmel-28, apresentou intensa produção de microvesículas, conforme figura 144, também foram observadas estruturas de ancoragem ao substrato.

Quando tratadas com os lipossomas, as células SKmel-28, apresentaram desestruturação citoplasmática e conseqüente rompimento da membrana externa conforme figura 145 "B". Os lipossomas apareceram aderidos às células, mas, como as vesículas celulares, possíveis exossomas, evidenciaram-se entre os lipossomas, foi utilizado o critério dimensional conforme medidas executadas anteriormente em MEV dos lipossomas isolados e análises por DLS, e também foi utilizado o critério do diferencial da eletrodensidade. Para afirmações mais precisas, a utilização de marcadores específicos podem elucidar melhor essa questão.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em células de melanoma murino B16F10 grupo controle.

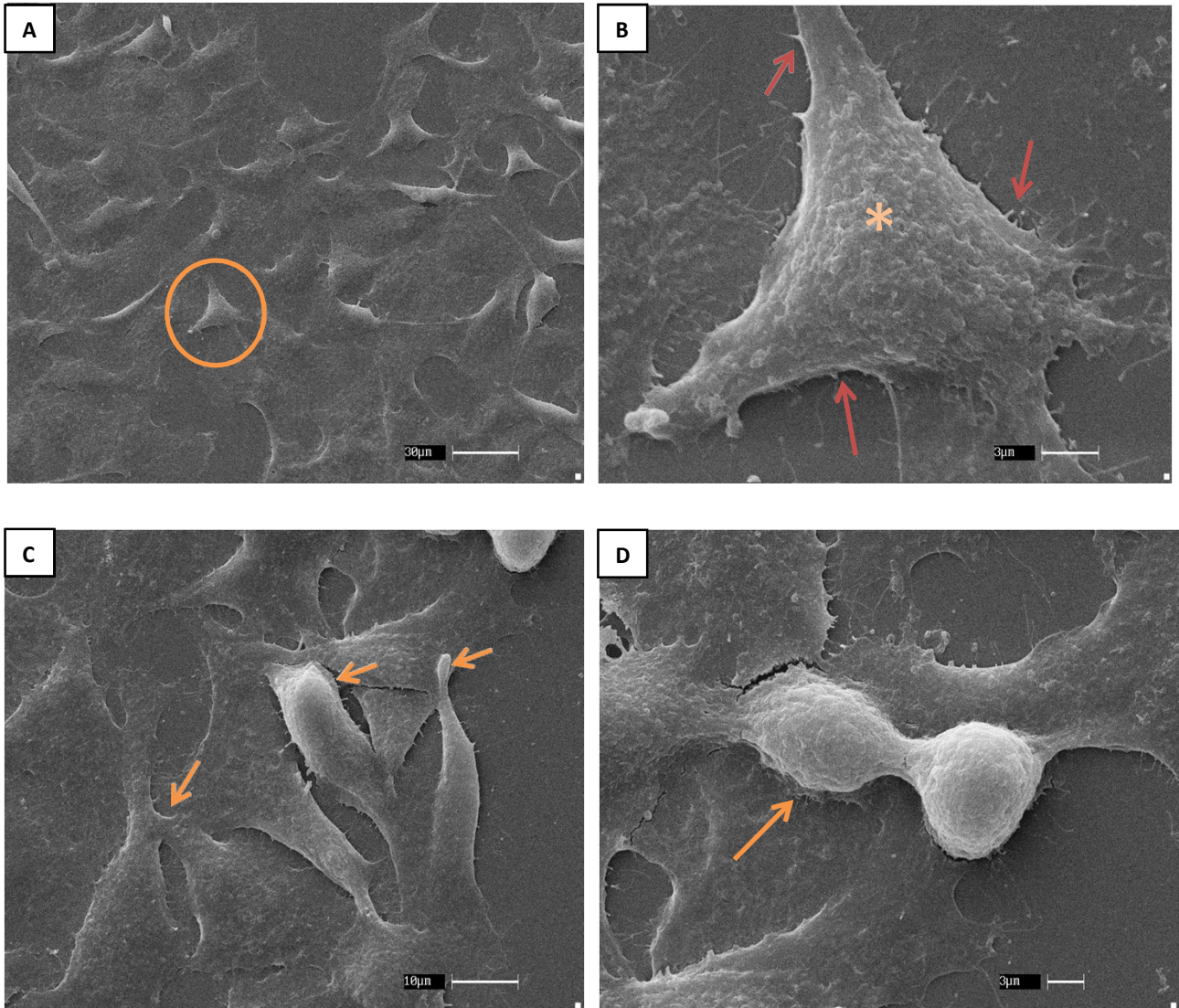


Figura 142. Eletromicrografia de varredura de células do grupo controle de melanoma murino B16F10. **A:** Característica das células aderidas e crescendo em monocamada, no círculo, célula aumentada na figura **B**, barra 30µm. **B:** Célula em maior aumento observando-se estruturas de adesão (setas), superfície da membrana plasmática apresentando irregularidades e pequenas protuberância decorrente do evidenciamento das estruturas citoplasmáticas pela técnica de desidratação, barra 3µm. **C:** Característica do desenvolvimento da cultura celular, demonstrando a interação celular por sobreposição citoplasmática (setas), barra 10µm. **D:** Célula finalizando o processo de divisão mitótica na telófase (seta), barra 3µm.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em células de melanoma murino B16F10 tratadas com lipossomas DODAC/ArC na concentração de 10 mM para DODAC e 8 mM para ArC.

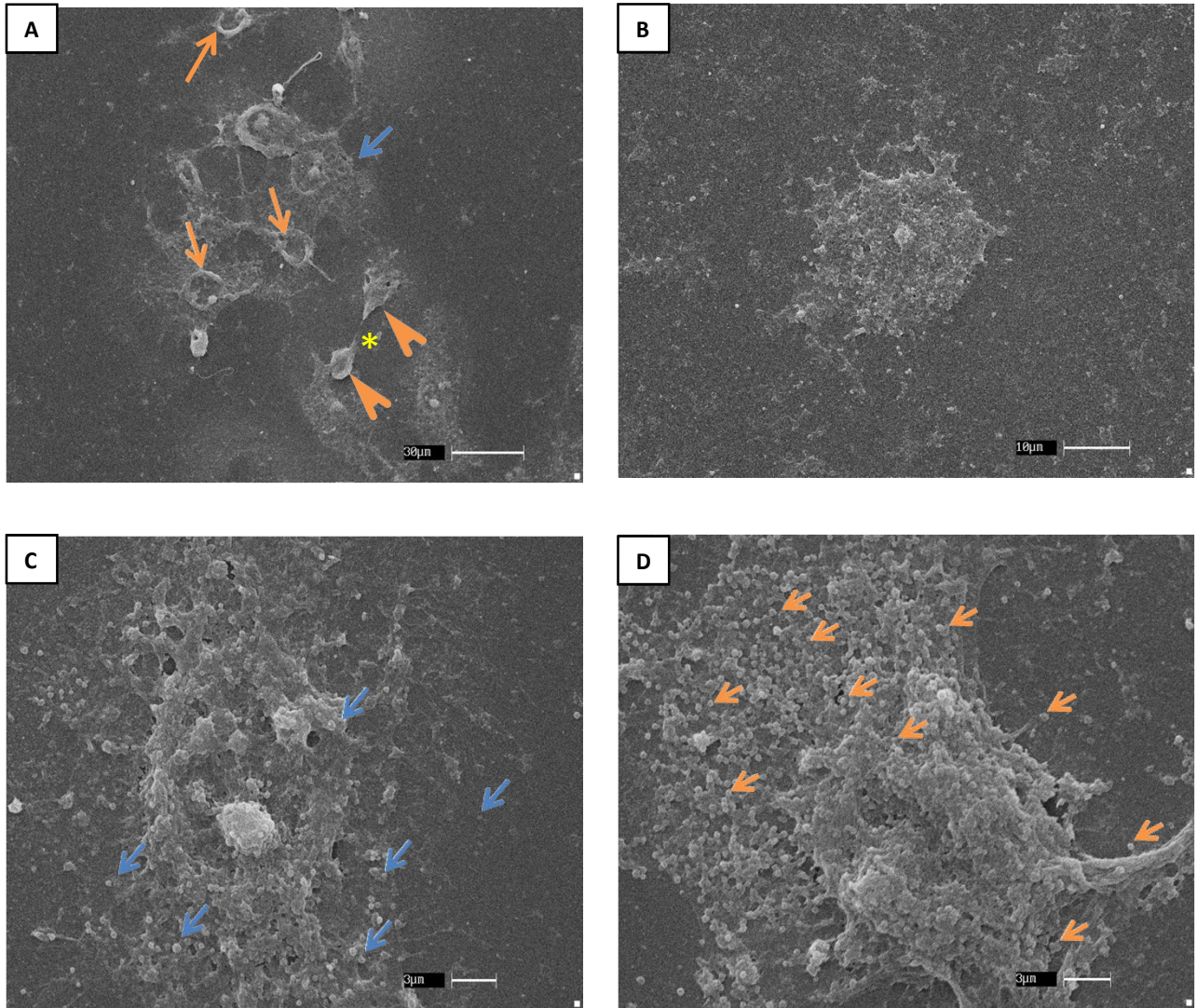


Figura 143. Eletromicrografia de varredura (MEV) de células de melanoma murino B16F10 do grupo submetido ao tratamento após 24h com ArC na formulação lipossomal DODAC/ArC a 0,013mM. **A:** Característica das células tratadas, células com a condensação da cromatina de forma periférica na região da membrana nuclear (setas), figura de mitose anormal (cabeças de setas), podendo-se observar a região de constrição (asterísco), célula com citoplasma vacuolizado (seta azul), barra 30µm. **B:** Célula, em apoptose, citoplasma fragmentado e núcleo picnótico, barra 3µm. **C:**, Célula com características apoptóticas, abundância de estruturas lipossomais (setas), barra 10µm. **D:** Nota-se perda da morfologia celular e estruturas lipossomais aderidas à membrana (setas), barra 3µm.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em células de melanoma de origem humana Skmel-28 grupo controle.

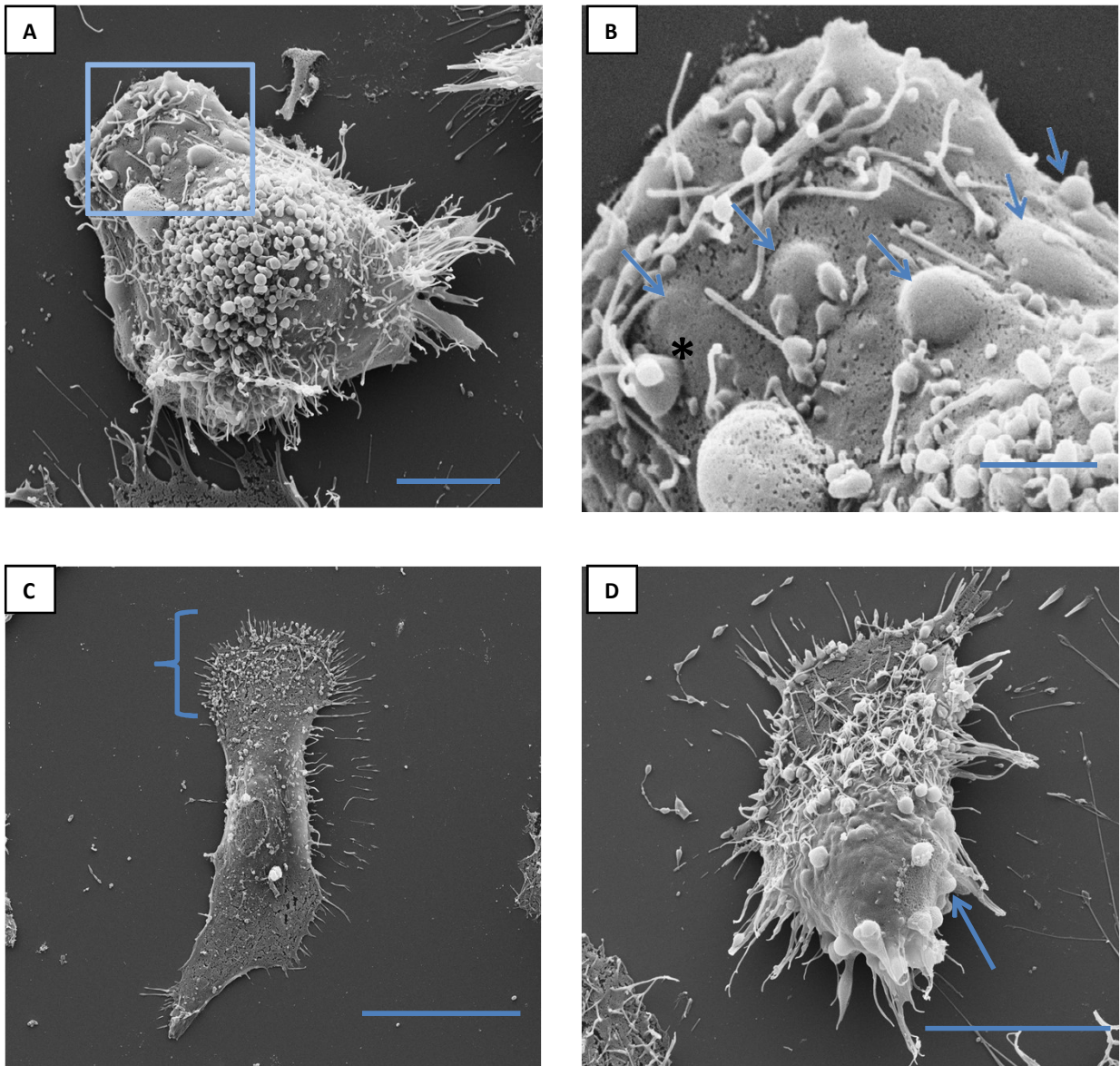


Figura 144. Eletromicrografia de varredura de células do grupo controle de melanoma humano SKmel28. **A:** Característica de uma célula aderida à lamínula, observar o volume de vesículas, detalhe referente a figura **B** (retângulo) aumento 11.532x, barra 5 $\mu$ m. **B:** Detalhe da célula referenciada na figura **A**, superfície da membrana plasmática sugerindo um processo de produção de vesículas em diferentes etapas (setas), estrangulamento da região basal de uma vesícula (asterisco), barra 1 $\mu$ m; **C:** Célula alongada apresentando características de polarização estrutural (chave), aumento 4.334x, barra 20 $\mu$ m; **D:** Célula com numerosas projeções citoplasmáticas, formação de expansão citoplasmática (seta), aumento 10.554x, barra 10 $\mu$ m.



Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em células de melanoma de origem humana Skmel-28 tratadas com lipossomas DODAC/ArC na concentração de 10 mM para DODAC e 8 mM para ArC.

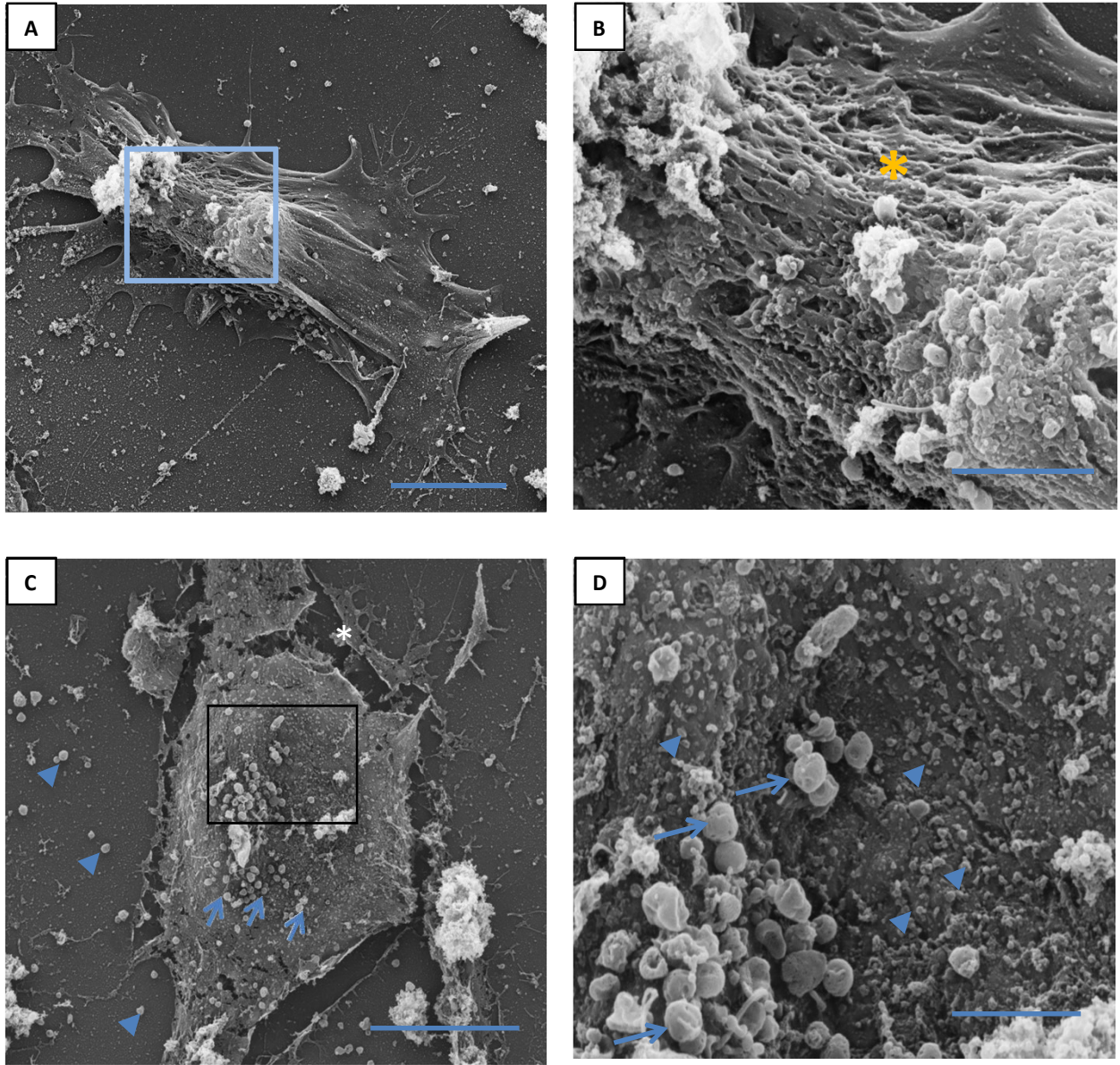


Figura 145. Eletromicrografia de varredura de células de melanoma humano SKmel28 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/ArC 10/8 a 0,022mM. **A:** Célula afetada pelo tratamento, desestruturação e consequente abertura da membrana citoplasmática, detalhe referente à figura “**B**” (retângulo) aumento 6.435x, barra 10 $\mu$ m. **B:** Detalhe da célula referenciada na figura **A**, Membrana plasmática inexistente, expondo rede complexa de microfilamentos, semelhantes ao citoesqueleto (asterisco), aumento 26.358x barra 3 $\mu$ m; **C:** Célula apresentando microvesículas (setas), outras microvesículas ao substrato (cabeça de seta), rompimento da membrana plasmática (asterisco), aumento 8.138x, barra 10 $\mu$ m; **D:** Detalhe da superfície celular evidenciada na figura “**C**”, apresentando numerosas estruturas globulares, sugerindo, pelo fator dimensional e diferencial em eletrodensidade, vesículas celulares semelhantes a exossomas (setas), lipossomas (cabeça de seta), aumento 35.763x, barra 2 $\mu$ m.

### 5.16. Avaliação das ultraestruturas das células de melanoma humano SKmel-28 por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

As células foram tratadas por um período de 24 horas com os seguintes tratamentos: ArC a 1,2 mM, dacarbazina a 1,75 mM, e a formulação lipossomal DODAC/ArC 10/8 mM na concentração de 0,022 mM.

As células do grupo controle apresentaram morfologia variada, mas uma característica observada, foi o grande volume na produção de vesículas provavelmente exossomos, pode-se observar o Complexo de Golgi e as vesículas ao redor das cisternas figura 147 "C", também foi possível observar projeções da membrana plasmática em formação de vesícula, com conteúdo citoplasmático em seu interior figura 147 "E". Nesse grupo controle, foi possível observar cisternas do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) , mitocôndrias, Complexo de Golgi, complexo do poro nuclear, envoltório nuclear preservado, alterações na eletrodensidade em certas regiões da membrana plasmática, podendo ser a formação de *lipid raft*, e as formações de vesículas, em algumas, aparentando a presença de estruturas diferenciadas na superfície da membrana citoplasmática figura 147 "F".

No tratamento com ArC houve expansão no processo de vacuolização, mas mesmo assim, observou-se a formação de vesículas. Observou-se também algumas mitocôndrias com aparente rompimento de membrana, observado na figura 148 "F", nesta mesma figura, algumas mitocôndrias aparecem em formato esférico, podendo ser em decorrência do plano de corte, ou alteração morfológica.

As células tratadas com dacarbazina apresentaram alterações nucleares, como dismorfismo e núcleo bilobulado. As alterações no contorno celular foram típicas desse tratamento, como *bubbles* de membrana, em algumas, com cisterna de RER. Foram observados corpos apoptóticos em variados níveis de maturação.

O tratamento com lipossoma, também foram observados um aumento de vacuolização citoplasmática, alterações morfológicas em mitocôndrias, núcleo bilobulado, formação de vesículas e prováveis estruturas lipossomais.

## Células de melanoma humano Skmel-28 sem tratamento

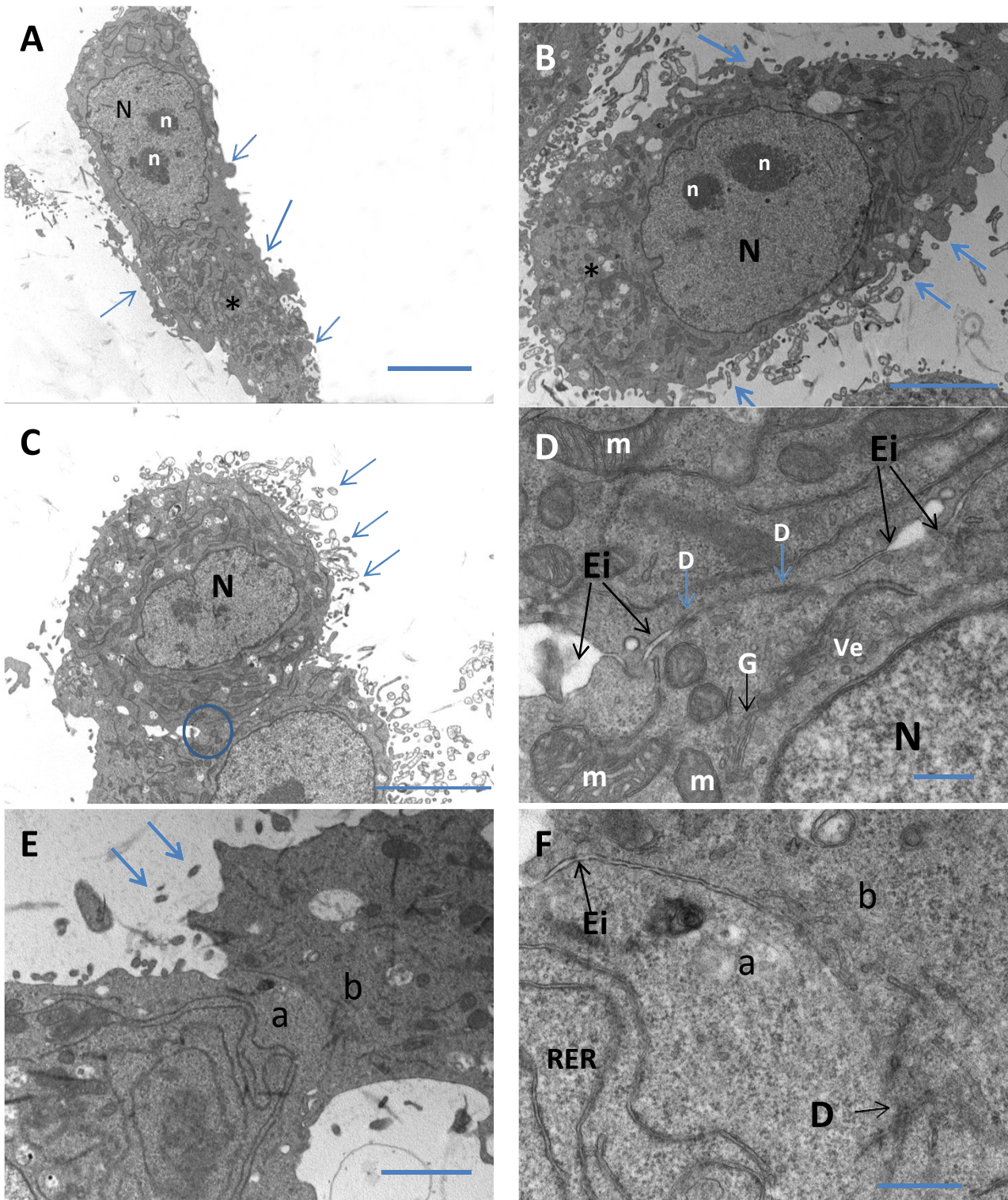


Figura 146. Células de melanoma humano grupo controle. **A e B**: Características morfológicas de células isoladas, Núcleo (N), nucléolo (n), região apresentando polarização de organelas (asterisco), citoplasma com características de intensa atividade de formação vesicular (setas), "A", aumento de 2.784x, "B", aumento de 3.597, barras 5 $\mu$ m; **C**: Células apresentando estrutura de complexo juncional, no círculo, região detalhada em maior aumento em "D", Núcleo (N), vesículas de secreção (setas); **D**: Detalhe de complexo juncional, espaço intercelular (Ei), desmossomos (D), mitocôndrias (m), cisternas de um Complexo de Golgi (G), vesículas (Ve), núcleo (N), aumento 21.560x, barra 500nm. **E**: Duas células justapostas aparentemente em momentos metabólicos distintos, em decorrência da diferença em elétron-densidade, em "a" apresentando substância um pouco mais difusa do que em "b", ficando essa diferença mais visível na figura "F", vesículas de secreção (setas), aumento 7.750x, barra 2 $\mu$ m. **F**: as referências "a" e "b" são relativas à duas células distintas, espaço intercelular (Ei), Desmossomo (D), Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), aumento 27.800x, barra 500 nm. Imagens obtidas em microscópio Zeiss LEO do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

Células de melanoma humano Skmel-28 sem tratamento.

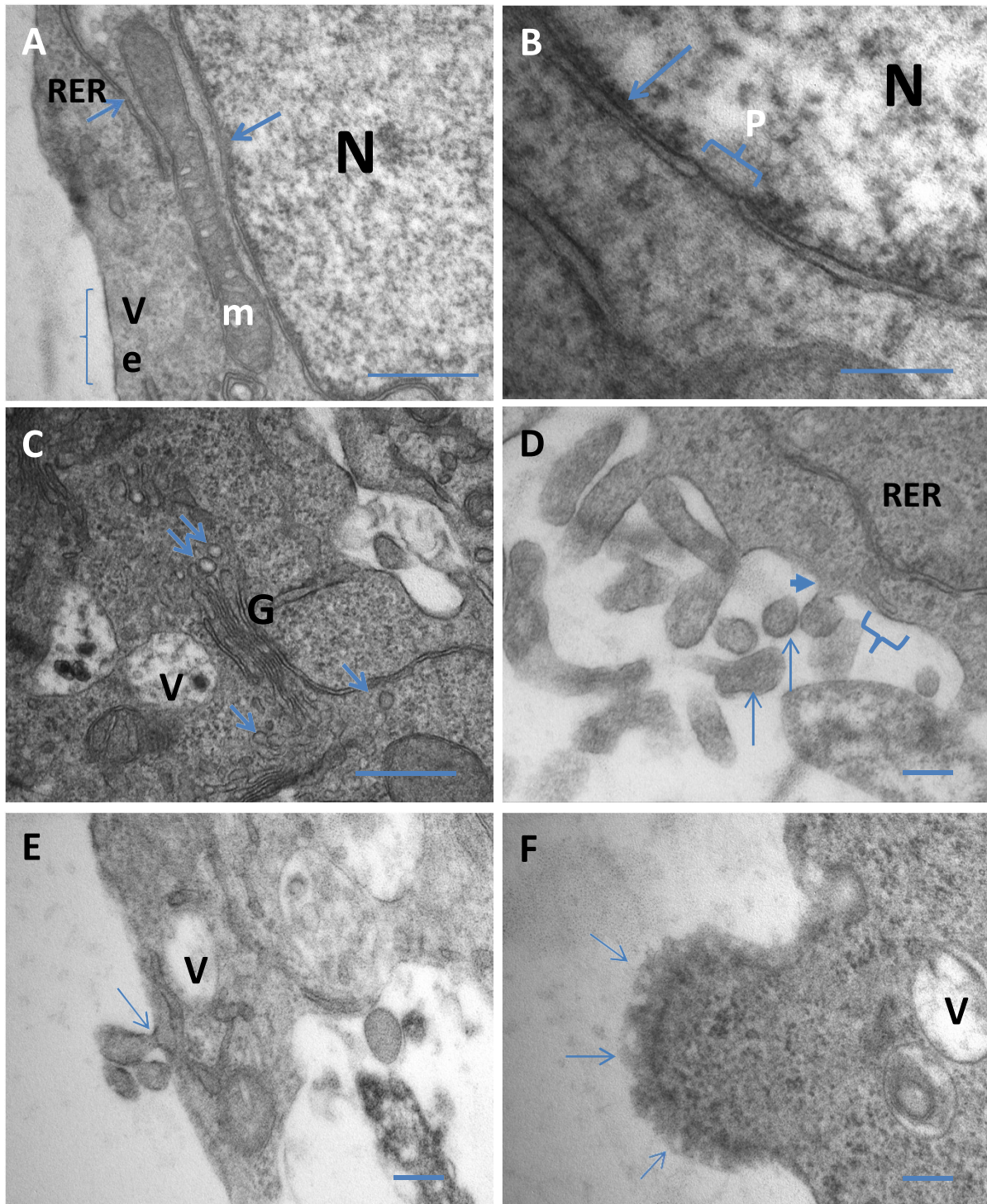


Figura 147. Células de melanoma humano grupo controle continuação. **A:** Região da célula onde observa-se Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), mitocôndria (m), Vesículas (Ve), alteração na elétron-densidade da membrana plasmática (chave), Núcleo (N), cromatina associada à lâmina interna do envoltório nuclear (seta), aumento 35.970x, barra 500 nm; **B:** Detalhe de uma região onde observa-se um poro nuclear (P), Núcleo (N), Cromatina associada à lâmina interna do envoltório nuclear (seta), aumento 100.000x, barra 200 nm; **C:** Região onde observa-se Complexo de Golgi (G), Vacúolo citoplasmático (V), vesículas de secreção, provavelmente, rede trans de Golgi (setas), aumento 35.970x, barra 500 nm; **D:** Região da membrana celular onde observa-se a liberação de vesículas para o meio extracelular (setas), vesícula em processo de liberação (seta cheia), observar aumento da elétron-densidade na membrana celular, provável Balsa lipídica (chave), Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), aumento 46.460x, barra 200nm. **E:** Região da membrana citoplasmática com liberação de vesículas, observar na ponta da seta diferenciação na elétron-densidade na região basal do prolongamento (seta), Vacúolo citoplasmático (V), aumento 46.460x, barra 200 nm. **F:** Projeção da membrana citoplasmática apresentando um revestimento específico (setas), Vacúolo citoplasmático (V), aumento 46.460x, barra 200 nm. Imagens obtidas em microscópio Zeiss LEO do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

## Células de melanoma humano Skmel-28 tratadas com extrato ArC.

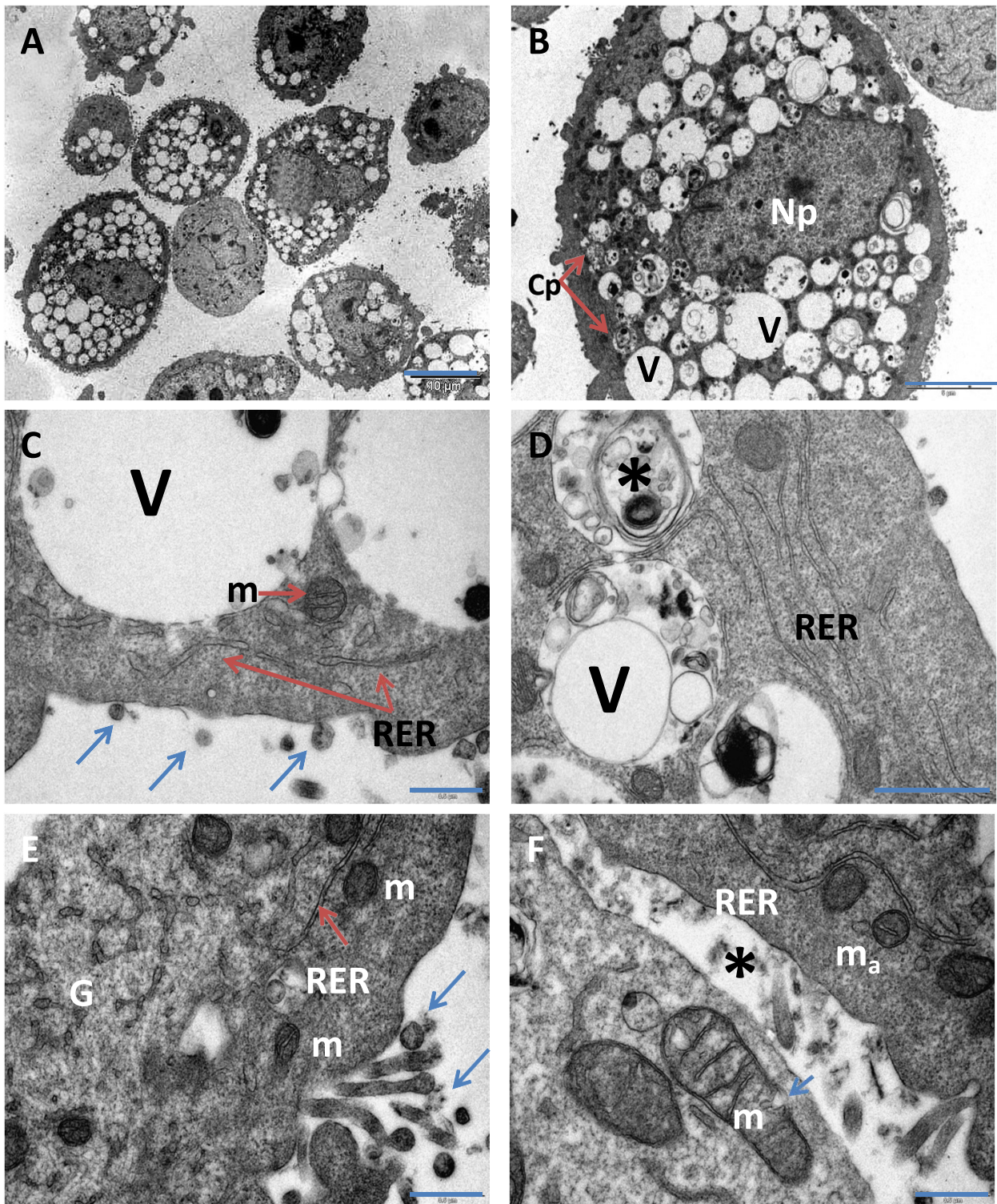


Figura 148: Células de melanoma humano SKmel grupo tratado com SC1640 na concentração de 1,2 mM. **A:** Células vacuolizadas em processo apoptótico, aumento 2.700x, barra 10 µm; **B:** Detalhe de célula vacuolizada, observa-se núcleo picnótico (Np), Vacúolos (V), Corpos apoptóticos (Cp), aumento 4.800x, barra 8 µm; **C:** Vacúolos citoplasmático (V), Vesículas secretadas (setas), cisternas de Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), mitocôndria aberrante (m), obs: o diagnóstico de mitocôndria se dá pela presença de duplamembrana e cristas, aumento 42.370x, barra 500 nm; **D:** Vacúolo citoplasmático apresentando restos celulares em seu interior (asterisco), Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) com cisterna permeando os vacúolos citoplasmáticos, aumento 27.460x, barra 1µm. **E:** Membrana citoplasmática com prolongamentos e liberação de vesículas (setas), Cisternas do Complexo de Golgi com morfologia atípica (G), Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), mitocôndrias (m), aumento 43.460x, barra 500 nm. **F:** Região entre duas células (asterisco), mitocôndrias (m) com provável lesão de membrana (seta), mitocôndrias com morfologia atípica (m<sub>a</sub>), Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), aumento 46.460x, barra 500 nm. Imagens obtidas em microscópio eletrônico Morgani 268D do Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem – CADI, FMVZUSP.

Células de melanoma humano Skmel-28 tratadas com o quimioterápico dacarbazina.

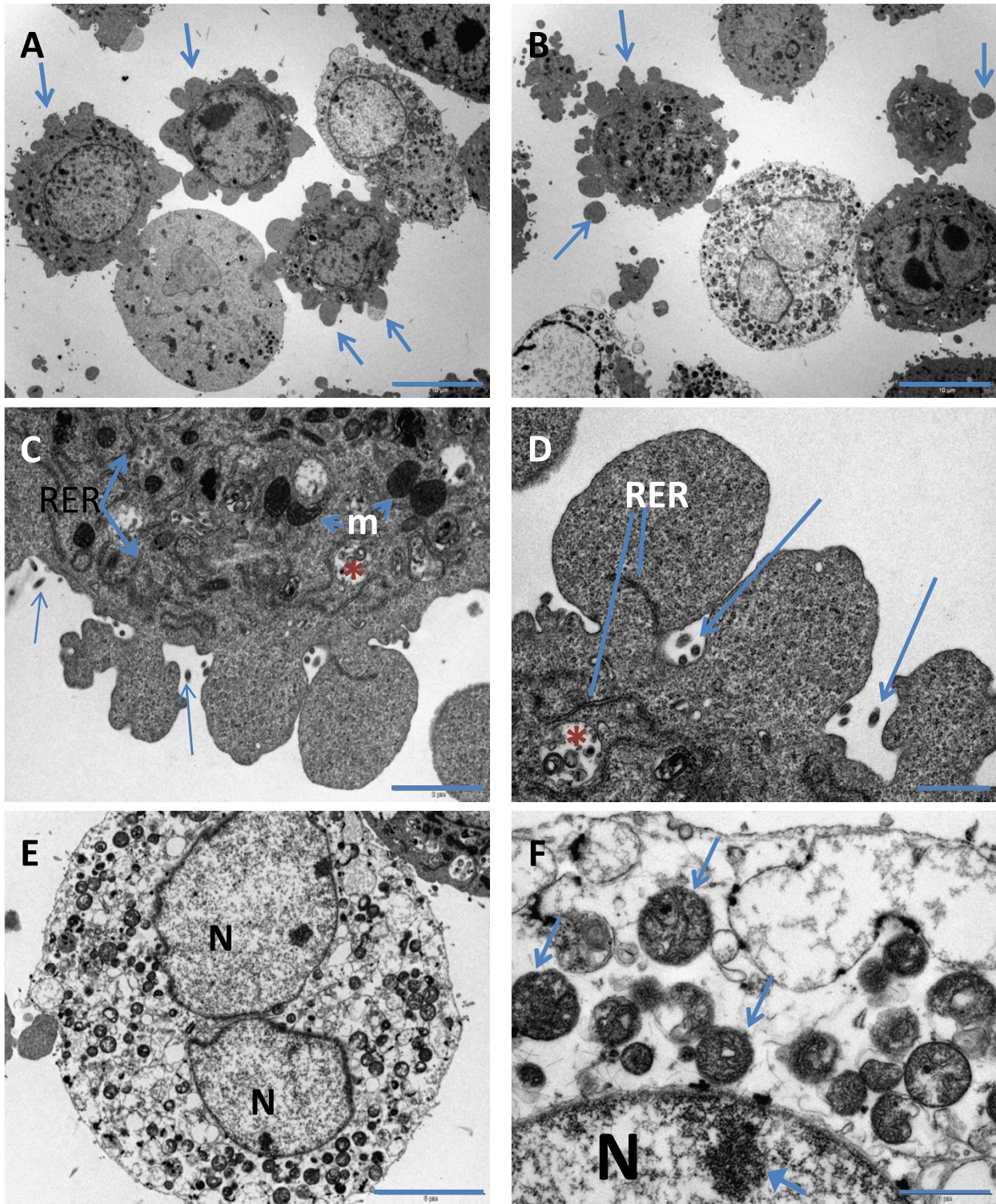


Figura 149. Células de melanoma humano SKmel tratadas com dacarbazina na concentração de 1,75 mM. **A e B:** Células em processo apoptótico, apresentando alterações morfológicas no contorno citoplasmático em forma de bolhas (setas), aumento 2.700x, barra 10  $\mu$ m; **C:** Reticulo Endoplasmático Rugoso (RER), mitocôndria com morfologia aberrante (m), formação de corpos apoptóticos (asterisco), vesículas de secreção (setas), aumento 21.370x, barra 2  $\mu$ m; **D:** Reticulo Endoplasmático Rugoso (RER), formação de corpos apoptóticos (asterisco), vesículas de secreção (setas), aumento 40.260x, barra 1  $\mu$ m; **E:** Núcleo bi-lobulado (N), formação de corpos apoptóticos e vacúolos distribuídos no citoplasma, aumento 4.800x, barra 5  $\mu$ m; **F:** Detalhe da célula descrita em "E", Núcleo (N) apresentando cromatina dispersa com baixa elétrion-densidade e condensação da cromatina na face interna da lâmina do envoltório nuclear (seta cheia), corpos apoptóticos com morfologia variada e em diferentes fases de maturação, aumento 46.460x, barra 1  $\mu$ m. Imagens obtidas em microscópio eletrônico Morgani 268D do Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem – CADi, FMVZUSP.

Células de melanoma humano SKmel-28 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/ArC na concentração de 10 mM para o DODAC e 8 mM para ArC.

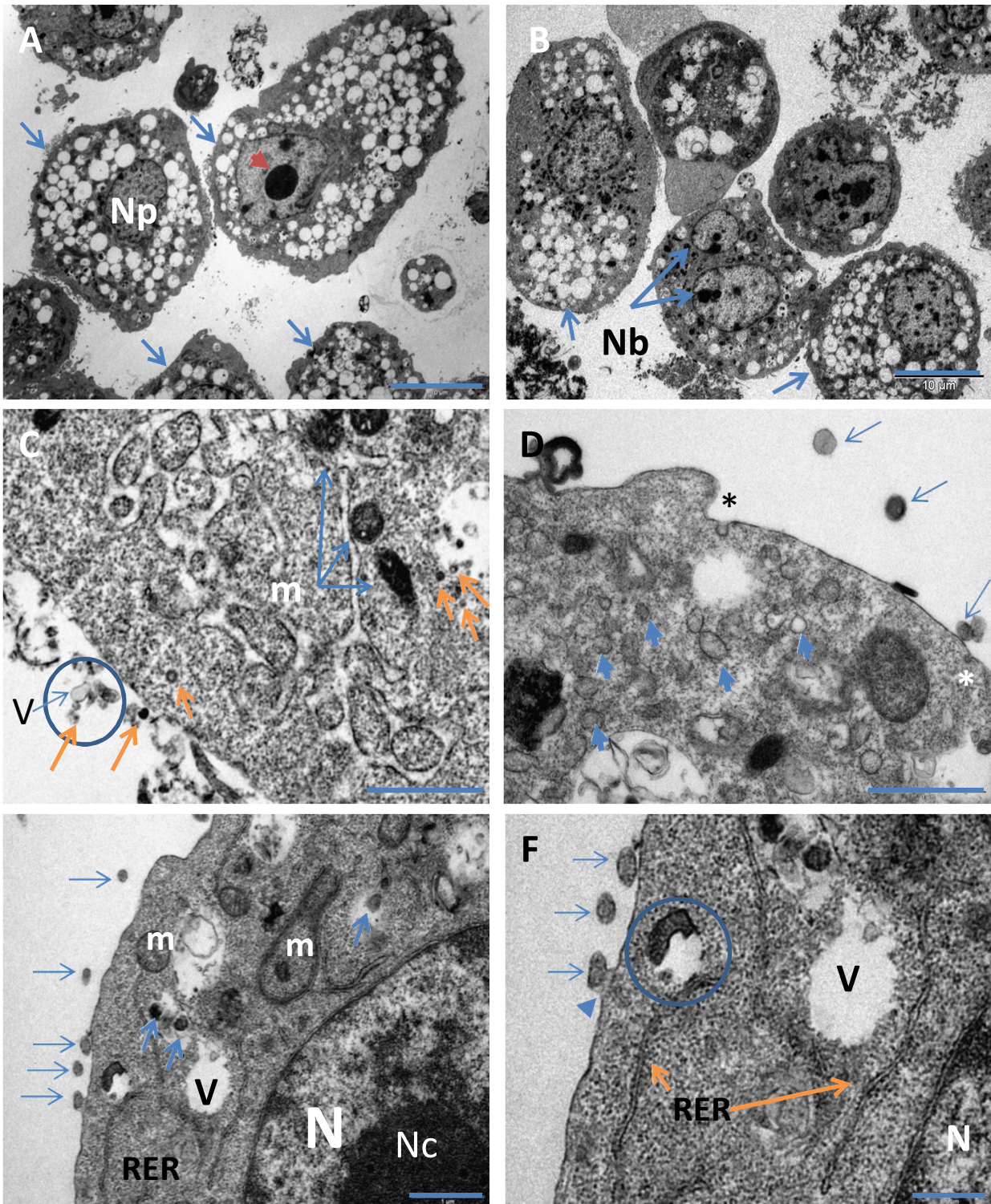


Figura 150. Células de melanoma humano SKmel grupo tratado com formulação lipossomal 10/8 na concentração 0,022 mM. **A e B:** Células em processo apoptótico, apresentando citoplasma vacuolizado (setas), Núcleo picnótico (Np), cromatina condensada de forma anormal (seta cheia), Núcleo bilobulado (Nb), aumento 2.700x, barra 10  $\mu$ m; **C:** Detalhe de célula em apoptose, mitocôndrias morfológicamente alteradas (m), no círculo observa-se uma possível vesícula celular aderida a estruturas esféricas de menor dimensão e elétrondensidade diferente, possíveis estruturas lipossomais (setas), 21.370x, barra 1  $\mu$ m; **D:** Formação de cavéols (asteriscos), Vesículas no meio extracelular (setas), 42.350x, barra 500nm; **E:** Célula em processo inicial de apoptose, Núcleo (N) com dispersão normal da cromatina envoltório nuclear preservado, Nucléolo (Nc), mitocôndrias com aspectos atípicos (m), Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), presença de vesículas no meio extracelular e no interior do citoplasma (setas), Vacúolos (V) com aparente degradação em seu contorno, 20.260x, barra 1  $\mu$ m; **F:** Detalhe da célula descrita em "E", Vesículas no meio extracelular (setas), região de interação de uma vesícula com a membrana celular (cabeça de seta), Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), Vacúolo (V), vacúolo com organela semelhante a mitocôndria em seu interior (círculo), Núcleo (N), aumento 46.460x, barra 500 nm. Imagens obtidas em microscópio eletrônico Morgani 268D do Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem – CADI, FMVZUSP.

### 5.17. Ensaio de migração celular

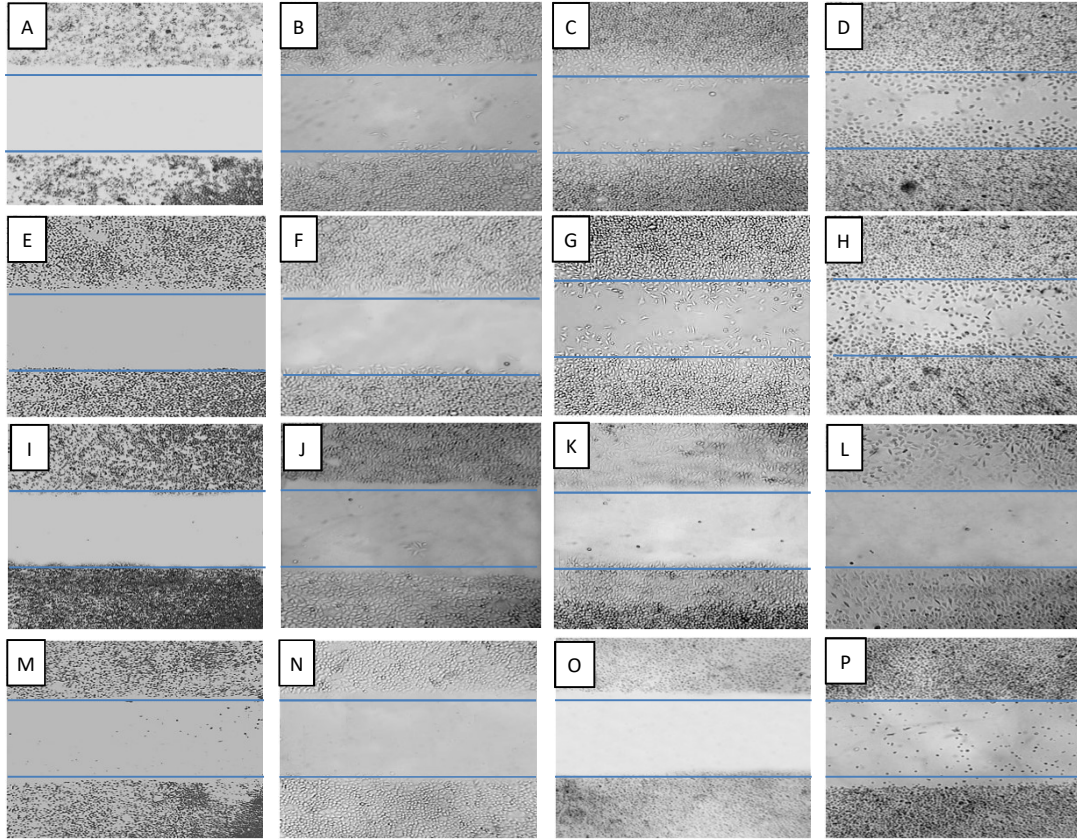
Este ensaio teve o objetivo de verificar a capacidade de migração celular, após a realização dos tratamentos, através de um área previamente aberta, através da realização de um corte transversal na monocamada da cultura celular.

As células utilizadas neste ensaio, foram: fibroblastos normais de origem humana FN1, melanoma humano SKmel-28, fibroblastos normais murino L929, e células de melanoma murino B16F10, frente aos tratamentos: ArC, dacarbazina, paclitaxel, formulações lipossomais DODAC/ArC 10/2 mM, DODAC/ArC 10/4 mM, DODAC/ArC 10/8 mM, DODAC/ArC/2-AEH<sub>2</sub>F na formulação 10/4/4 mM e DODAC vazio. As concentrações utilizadas, foram as descritas na tabela 8, do item 5.7, relativas aos resultados dos ensaios de MTT e para as formulações lipossomais, as concentrações utilizadas, foram as constantes na tabela 13 do item 5.11. Para a obtenção dos resultados, as células foram fotografadas nos tempos de 0 hora; 6 horas, 24 horas e 48 horas. A área aberta propositalmente pela passagem da ponteira foi fotografada conforme os tempos acima descritos e as imagens obtidas, foram cortadas por programa de processamento de imagens, conforme metodologia descrita em 4.16, posteriormente, foram submetidas à análise pelo programa *Image J*, para contagem das células, com a finalidade de obter gráficos evolutivos.

Nos tratamentos com dacarbazina e paclitaxel nas linhagens avaliadas, não produziram o efeito de migração celular que pudesse ser realizada uma contagem, e nos tratamentos lipossomais, as células perderam aderência da placa, provavelmente inativas, portanto, a obtenção de imagens nessa situação, com células soltas e ocupando todo o campo, não representaria a realidade.

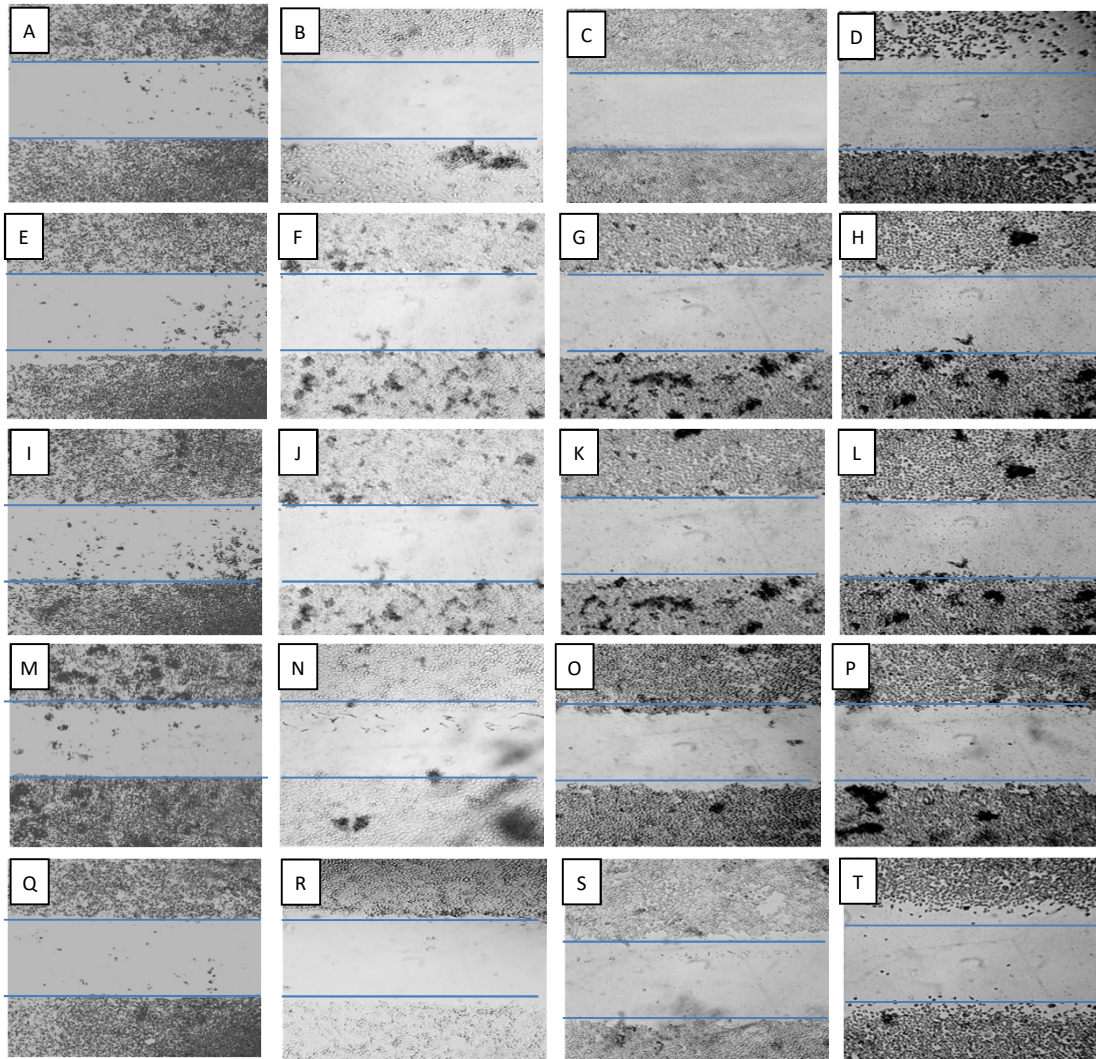


### Fibroblastos normais de origem humana FN1



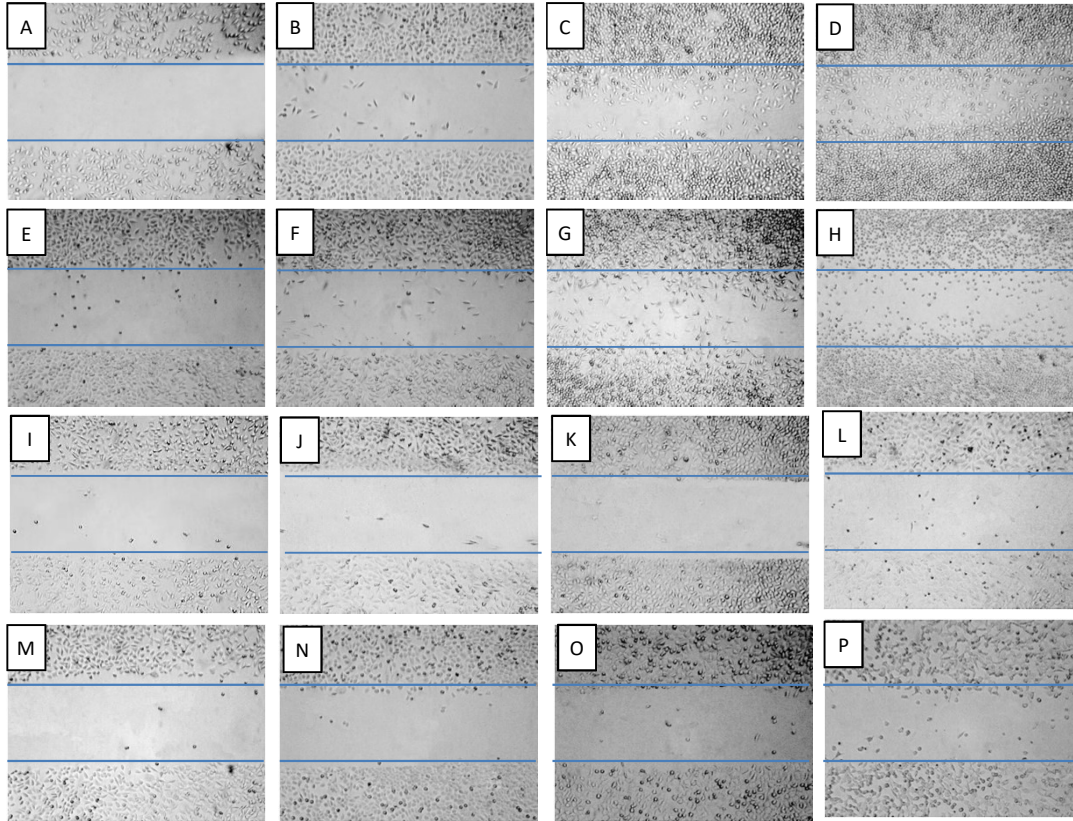
**Figura 151. Fibroblastos normais de origem humana FN1.** **A-D:** Controle; **(A)**T00h; **(B)**T06h; **(C)**T24h; **(D)**T48h. **E-H:** ArC na concentração para o tratamento de 2,5mM. **(E)**T00h; **(F)**T06h; **(G)**T24h; **(H)**T48h. **I-L:** Dacarbazina na concentração para o tratamento de 2,2mM; **(I)**T00h; **(J)**T06h; **(K)**T24 e **(L)**T48h. **M-P:** Paclitaxel na concentração para o tratamento de 37,5µM **(M)** T00h, **(N):** T06h, **(O)**T24h, **(P):** 48h.

## Fibroblastos normais de origem humana FN1



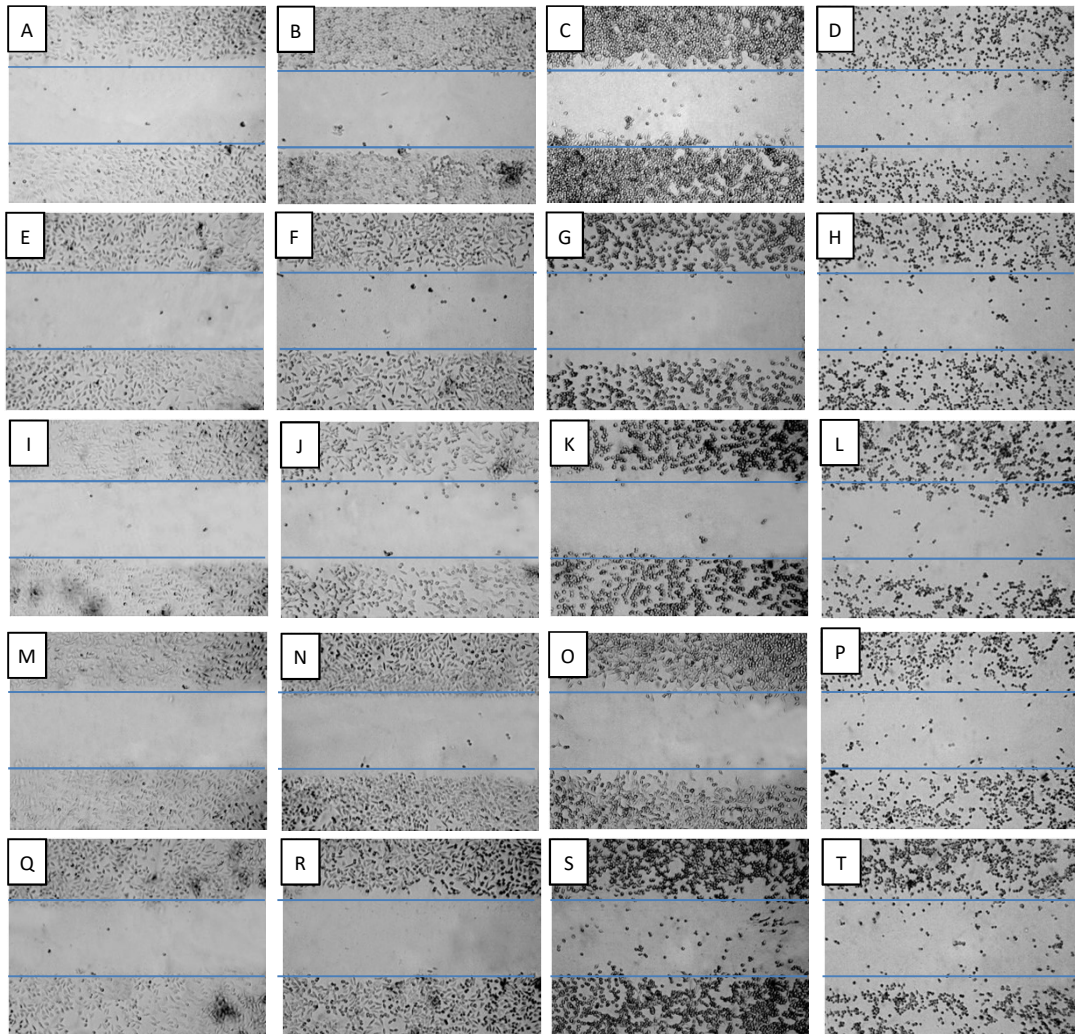
**Figura 152. Fibroblastos normais de origem humana FN1. A-D:** DODAC/ArC 10/2 mM, formulação DODAC 10 mM e ArC 2mM na concentração para o tratamento de 0,05mM; **(A)**T00; **(B)**T06; **(C)**T24 e **(D)**T48h. **E-H:** DODAC/ArC 10/4mM formulação DODAC 10 mM e ArC 4mM na concentração para o tratamento de 0,06mM **(E)**T00; **(F)**T06; **(G)**T24 e **(H)**T48h. **I-L:** DODAC/ArC 10/8mM formulação DODAC 10 mM e ArC 8mM na concentração para o tratamento de 0,1 mM; **(I)**T00; **(J)**T06; **(K)**T24 e **(L)**T48h. **M-P:** DODAC/2AEH<sub>2</sub>F/ArC 10/4/4 mM formulação DODAC 10 mM, 2AEH<sub>2</sub>F 4 mM e ArC 4mM na concentração para o tratamento de 0,04 mM; **(M)**T00; **(N)**T06; **(O)**T24; **(P)**T48h. **Q-T:** DODAC vazio 10 mM na concentração para tratamento de 0,04mM; **(Q)**T00; **(R)**T06; **(S)**T24 e **(T)**T48h .

## Fibroblastos normais murino L929



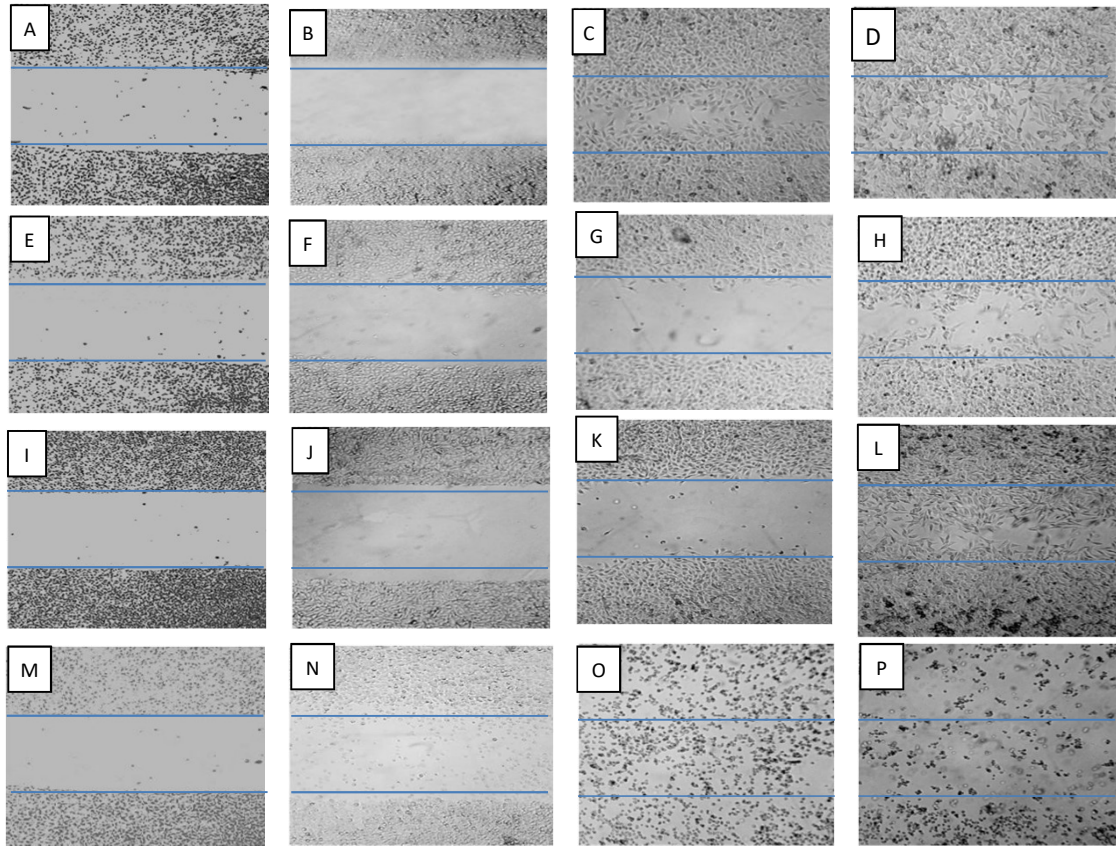
**Figura 153 . Fibroblastos murino L929** A-D: Controle; (A)T00h; (B)T06h; (C)T24h; (D)T48h. E-H: ArC na concentração para o tratamento de 2,8 mM. (E)T00h; (F)T06h; (G)T24h; (H)T48h. I-L: Dacarbazina na concentração para o tratamento de 1,5 mM; (I)T00h; (J)T06h; (K)T24 e (L)T48h. M-P: Paclitaxel na concentração para o tratamento de 31  $\mu$ M (M) T00h, (N): T06h, (O)T24h, (P): 48h.

## Fibroblastos normais murino L929.



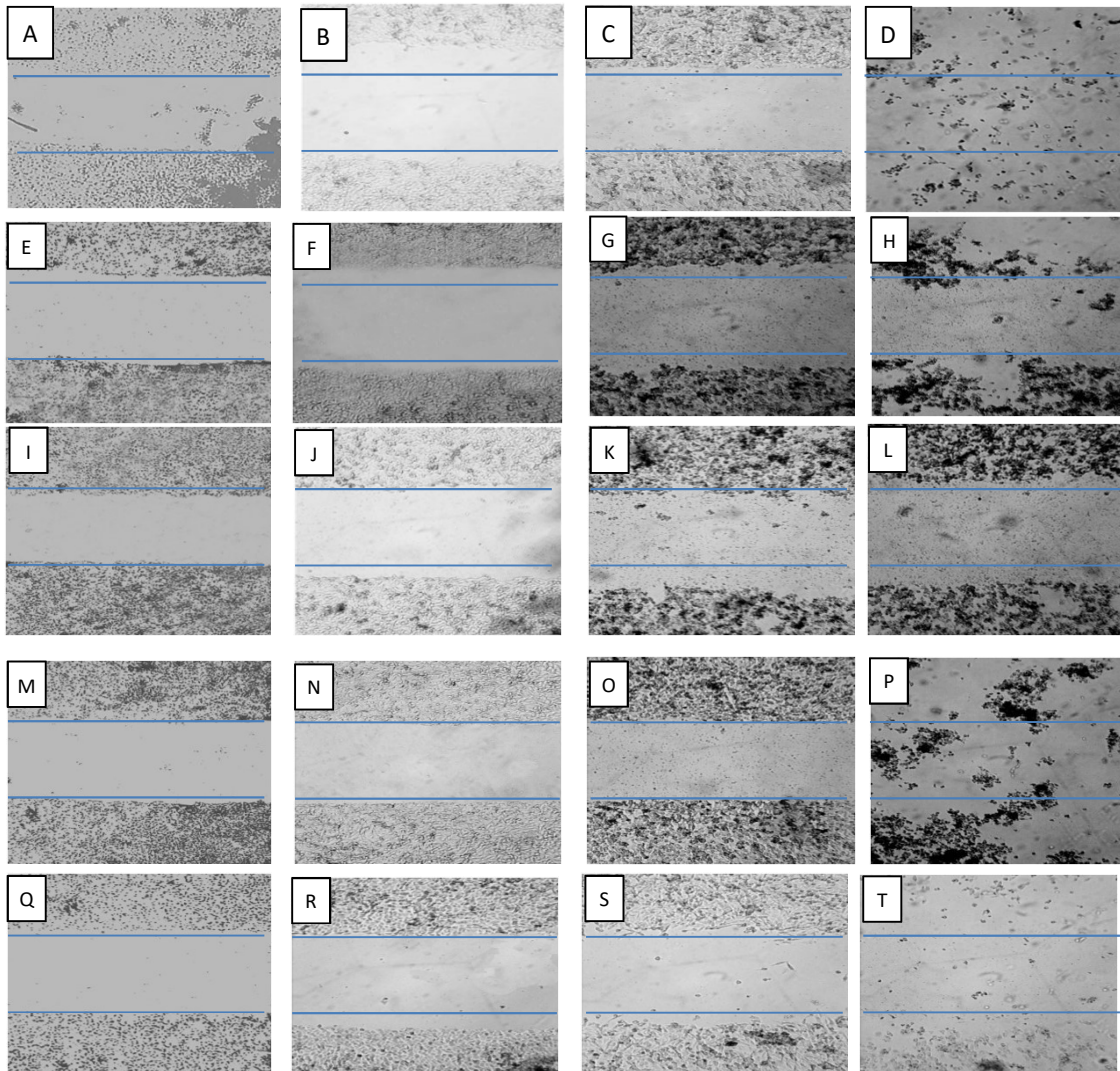
**Figura 154 . Fibroblastos murino L929** A-D: DODAC/ArC 10/2mM formulação DODAC 10 mM e ArC 2mM na concentração para o tratamento de 0,015mM; (A)T00; (B)T06; (C)T24 e (D)T48h. E-H: DODAC/ArC 10/4mM formulação DODAC 10 mM e ArC 4mM na concentração para o tratamento de 0,003mM (E)T00; (F)T06; (G)T24 e (H)T48h. I-L: DODAC/ArC 10/8mM formulação DODAC 10 mM e ArC 8mM na concentração para o tratamento de 0,4mM; (I)T00; (J)T06; (K)T24 e (L)T48h. M-P: DODAC/2AEH<sub>2</sub>F/ArC 10/4/4 mM formulação DODAC 10 mM, 2AEH<sub>2</sub>F 4 mM e ArC 4mM e na concentração para o tratamento de 0,02mM; (M)T00; (N)T06; (O)T24; (P)T48h. Q-T: DODAC vazio 10 mM na concentração para o tratamento de 0,015mM; (Q)T00; (R)T06; (S)T24 e (T)T48h .

## Melanoma murino B16F10



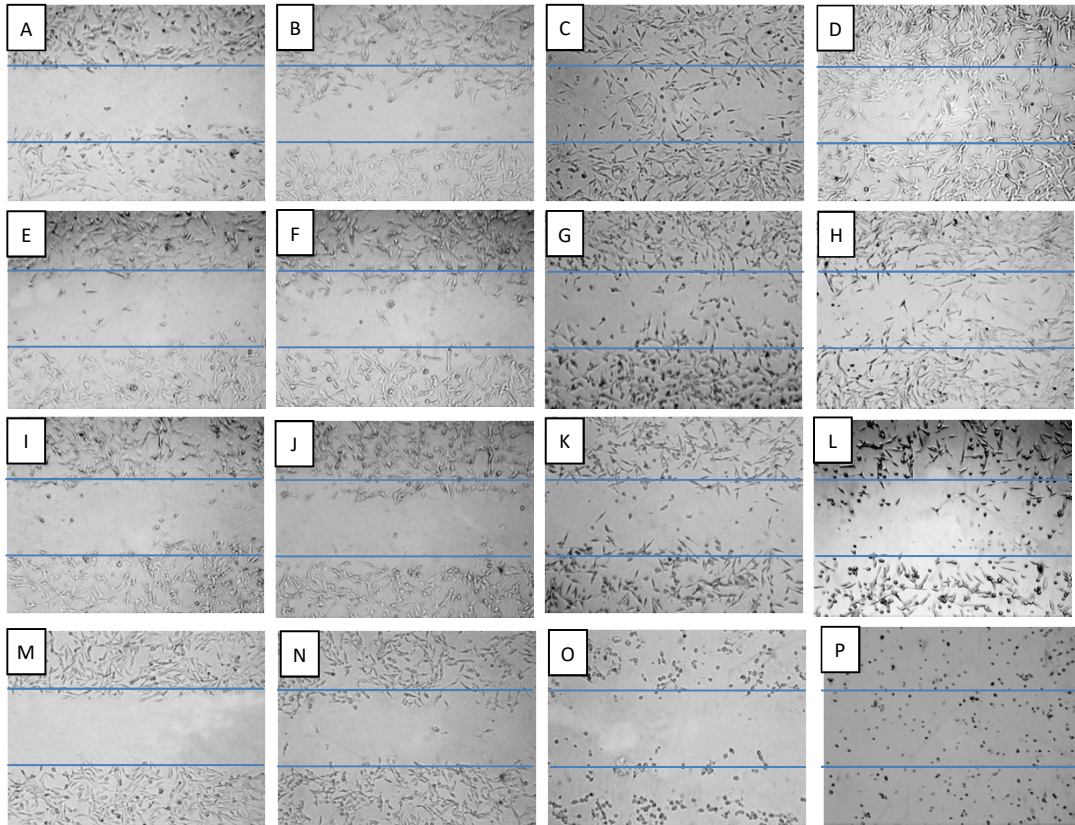
**Figura 155 . Células de melanoma murino B16F10 A-D: Controle; (A)T00h; (B)T06h; (C)T24h; (D)T48h. E-H: ArC na concentração para o tratamento de 1mM. (E)T00h; (F)T06h; (G)T24h; (H)T48h. I-L: Dacarbazina na concentração para o tratamento de 1mM; (I)T00h; (J)T06h; (K)T24 e (L)T48h. M-P: Paclitaxel na concentração para o tratamento de 17  $\mu$ M; (M) T00h, (N): T06h, (O)T24h, (P): 48h.**

## Melanoma murino B16F10



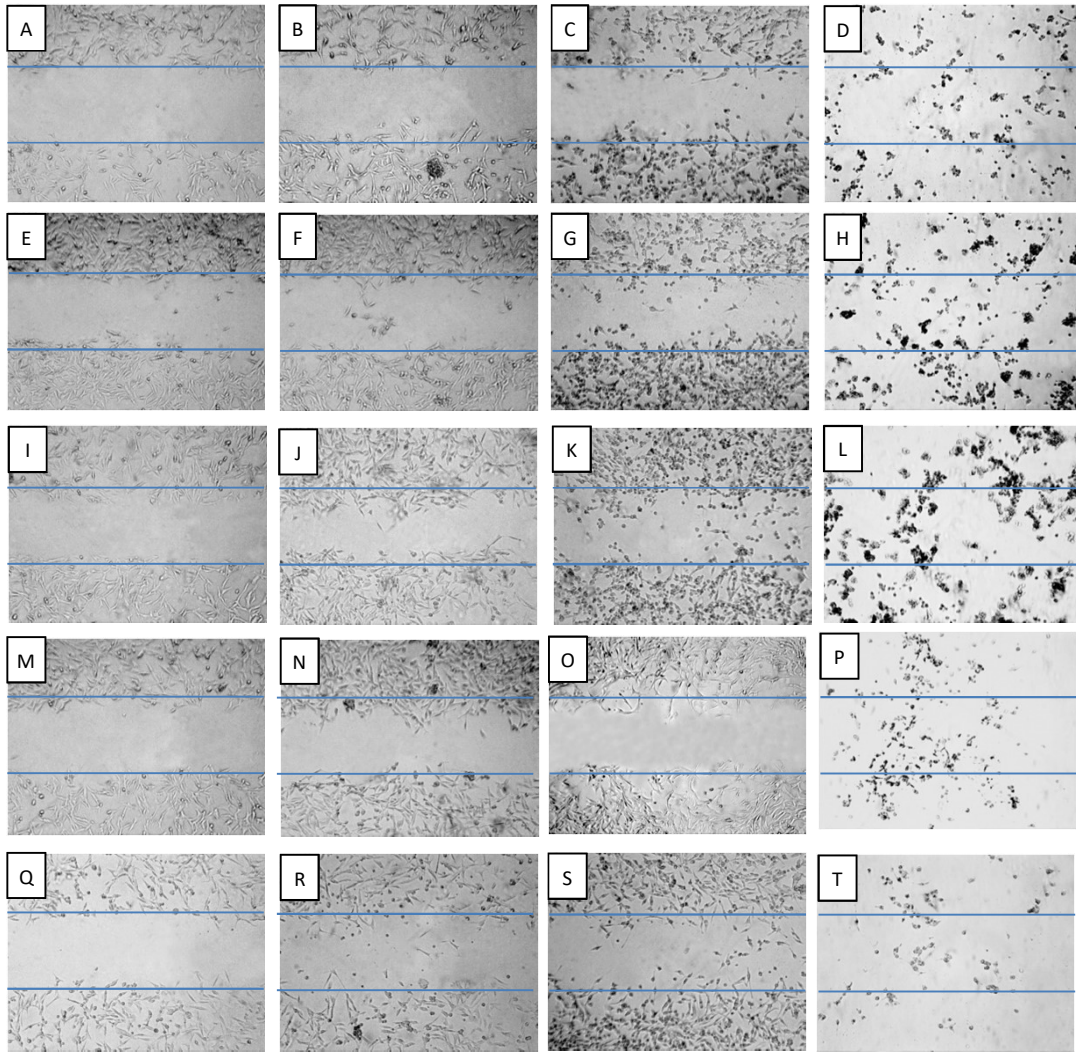
**Figura 156 . Células de melanoma murino B16F10** A-D: DODAC/ArC 10/2mM, formulação DODAC 10 mM e ArC 2 mM na concentração para o tratamento de 0,013 mM; (A)T00; (B)T06; (C)T24 e (D)T48h. E-H: DODAC/ArC 10/4mM formulação DODAC 10 mM e ArC 4 mM na concentração para o tratamento de 0,026mM; (E)T00; (F)T06; (G)T24 e (H)T48h. I-L: DODAC/ArC 10/8mM formulação DODAC 10 mM e ArC 8 mM na concentração para o tratamento de 0,01mM ; (I)T00; (J)T06; (K)T24 e (L)T48h. M-P: DODAC/2AEH<sub>2</sub>F/ArC 10/4/4 mM formulação DODAC 10 mM, 2AEH<sub>2</sub>F 4 mM e ArC 4 mM na concentração para o tratamento de a 0,012 mM ; (M)T00; (N)T06; (O)T24; (P)T48h. Q-T: DODAC vazio 10 mM na concentração para o tratamento de 0,05 mM; (Q)T00; (R)T06; (S)T24 e (T)T48h .

## Melanoma humano Skmel-28.



**Figura 157 . Células de melanoma humano SKmel28 A-D: Controle; (A)T00h; (B)T06h; (C)T24h; (D)T48h. E-H: ArC na concentração para o tratamento de 1,2mM. (E)T00h; (F)T06h; (G)T24h; (H)T48h. I-L: Dacarbazina na concentração para o tratamento de 1,7 mM; (I)T00h; (J)T06h; (K)T24 e (L)T48h. M-P: Paclitaxel na concentração para o tratamento de 24  $\mu$ M; (M) T00h, (N) T06h, (O)T24h, (P): 48h.**

## Melanoma humano Skmel-28.



**Figura 158 . Células de melanoma humano SKmel-28** **A-D:** DODAC/ArC 10/2mM, formulação DODAC 10 mM e ArC 2 mM na concentração para o tratamento de 0,02mM; **(A)**T00; **(B)**T06; **(C)**T24 e **(D)**T48h. **E-H:** DODAC/ArC 10/4mM formulação DODAC 10 mM e ArC 4 mM na concentração para o tratamento de 0,025mM; **(E)**T00; **(F)**T06; **(G)**T24 e **(H)**T48h. **I-L:** DODAC/ArC 10/8mM formulação DODAC 10 mM e ArC 8 mM na concentração para o tratamento de 0,01mM ; **(I)**T00; **(J)**T06; **(K)**T24 e **(L)**T48h. **M-P:** DODAC/2AEH<sub>2</sub>F/ArC 10/4/4 mM formulação DODAC 10 mM, 2AEH<sub>2</sub>F 4 mM e ArC 4 mM na concentração para o tratamento de 0,07 mM ; **(M)**T00; **(N)**T06; **(O)**T24; **(P)**T48h. **Q-T:** DODAC vazio 10 mM na concentração para o tratamento de 0,05 mM; **(Q)**T00; **(R)**T06; **(S)**T24 e **(T)**T48h .



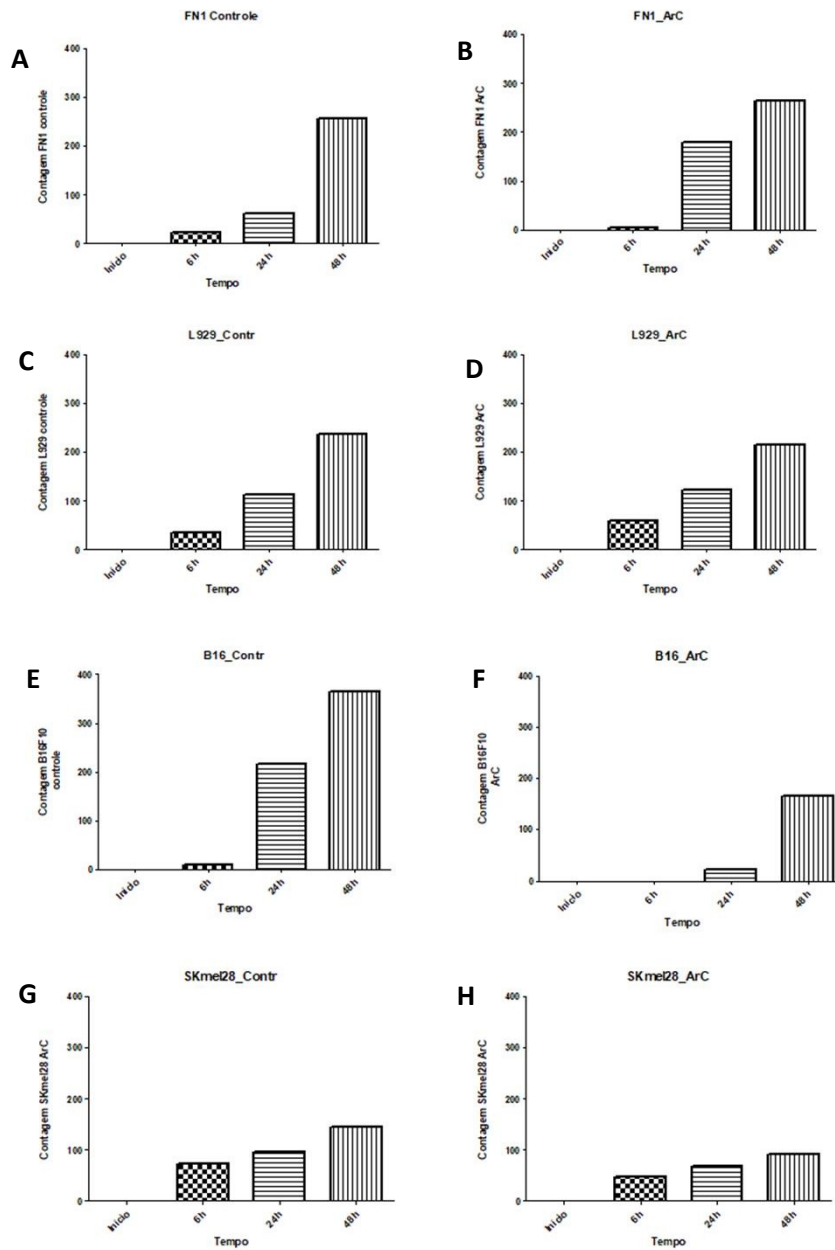


Figura 159. Gráficos referentes aos procedimentos de contagem de células pelo programa Image-J, sendo T0, T6, T24 e T48 (Tempo em horas) igual (=) ao número de células contadas. **A:** Fibroblastos FN1 controle, T0=0, T6=24, T24=62, T48=256; **B:** FN1 tratadas com extrato ArC a 2,5 mM, T0=0, T6=5, T24=176, T48=265; **C:** Fibroblastos L929 controle, T0=0, T6=34, T24=113, T48=237; **D:** Fibroblastos L929 tratados com extrato ArC a 2,5 mM, T0=0, T6=59, T24=122, T48=214; **E:** Melanoma murino B16F10 controle, T0=0, T6=9, T24=217, T48=364; **F:** Melanoma murino B16F10 tratados com extrato ArC a 1 mM, T0=0, T6=0, T24=23, T48=165; **G:** Melanoma humano SKme28 controle, T0=0, T6=73, T24=96, T48=141; **H:** Melanoma humano tratado com o extrato ArC a 1,37 mM, T0=0, T6=47, T24=69, T48=91.

Os gráficos foram expressos em média  $\pm$ DP.

Obs: Para este ensaio, nos outros tratamentos, as células perderam a aderência do fundo da placa nos tempos de 24 e 48 horas, impossibilitando a contagem.

## 6. DISCUSSÃO

A coleta do alecrim-do-campo para a produção do extrato, foi efetuada em São Sebastião da Grama, no estado de São Paulo, maiores informações estão descritas no item 5.1 “Resultados”. O município recebeu esse nome devido às vastas pastagens, dominadas por gramíneas, então, a área recebeu o referido nome “grama” (fonte, site IBGE), sendo este ambiente, propício para o crescimento do alecrim-do-campo (LORENZI, 2008).

A avaliação morfológica e estrutural do alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia* foi realizada em outro indivíduo, independente do coletado para extração dos bioativos, a identificação da espécie foi realizada conforme descrito no item 4.2.1. em “Materiais e Métodos”. Foram obtidas imagens macroscópicas e posteriormente, fragmentos foram analisados por microscopia de luz e por microscopia eletrônica de varredura, revelando uma complexa estrutura de filamentos, células, estômatos, tricomas, tricomas flagelados e tricomas bisseriados. Os tricomas, são estruturas responsáveis por secreções resinosas, contendo substâncias lipofílicas e polissacarídeos, esses polissacarídeos contemplam os terpenos, óleos essenciais, resinas, ceras e flavonóides (OLIVEIRA e BASTOS, 1998; BUDEL, *et al.*, 2018).

O grande desafio na extração de compostos bioativos vegetais é obter o produto da extração sem degradação, mantendo seus aspectos quantitativos e garantir a separação completa do solvente, através de um processo limpo com baixo impacto ambiental, essas características podem ser atribuídas ao processo de extração supercrítico, superando os métodos tradicionais (SILVA, 2016).

O processo de extração de princípios ativos pelo método supercrítico, disponibiliza melhores características do produto final em comparação à metodologias somente por meio de solventes, porém, houve época em que esse método, era considerado oneroso para linha de produção em escala industrial, pelo baixo rendimento e elevado custo. Decorrente de melhorias operacionais, por meio do aperfeiçoamento na geometria do sistema interno dos equipamentos, e da possibilidade de ajuste da fluidez dos solventes utilizados, através do controle da temperatura na linha de produção, tornou viável a relação custo benefício (PAULA, *et al.*, 2016), mesmo assim, esse

processo já era utilizado com finalidades para uso na indústria alimentícia (SÁNCHEZ-CAMARGO, *et al.*, 2014).

Comparando a qualidade do produto de extração do método supercrítico com a metodologia tradicional, por meio de solventes como etanol ou metanol, o método supercrítico em câmara de CO<sub>2</sub> foi mais seletivo que o álcool, para extrair compostos fenólicos (PIANTINO, *et al.* 2008). Por meio da manutenção da integridade do extrato final, este método pode ser considerado como potencial promotor de novas descobertas no campo farmacêutico *Drug Discovery*, e *Plant Based*, garantindo a estabilidade dos processos em escala industrial (KHAW, *et al.* 2017).

A proposta de inovação do presente trabalho, consiste na formulação lipossomal do extrato proveniente do alecrim-do-campo, extraído pelo método supercrítico para fins terapêuticos. Foram feitas análises por CG/MS e cromatografia líquida do extrato e a separação por HPLC obtendo-se oito frações oriundas desse extrato e com posterior análise por CG/MS nos mesmos parâmetros da análise do extrato completo, que serão discutidas a seguir.

Acoplada “in tandem” ao CG/MS a biblioteca espectral NIST 14 (National Institute of Standards and Technology) Shimadzu, disponibiliza para cromatografia gasosa, 82.868 compostos com suas estruturas cobrindo as colunas de compostos polares e apolares, fornecendo nome dos elementos presentes, similaridade estrutural, fórmula, estrutura molecular, peso molecular, lista de picos e sinônimos.

Na análise do extrato de *Baccharis dracunculifolia*, foram encontrados compostos variantes de hidrocarbonetos constituídos de moléculas com peso molecular entre 170 e 618, alguns descritos na literatura, outros, sem muitas referências, ou nenhuma, assim, entre o tempo de retenção de 13,004 e 22,207, foram definidos vinte compostos, entre os tempos de retenção de 27,148 até 39,742, foram identificados mais vinte compostos e comparados com a literatura (CHAMMAS, *et al.* 2023).

Dentre esses compostos, foram identificados sesquiterpenos e compostos carbocíclicos como *alpha e gamma-muurolene*, *naphthalene*, *kauran*, *ledo*, *alpha-cadinol*, *spatulenol*, *neophytadiene*, ácido hexadecanóico, fitol,

heneicosano, álcool acifílico, *decahidronaftol*, ácido fenilpropanóico, beta-fenilpropionato, supraene, tetrahidrocanabinol, metiloctacosano, *tetratetracontane*, oxirano, pectolinaringenina, octacosanal, condriasterol, norusa, conforme tabelas 4 e 5.

A seguir, os compostos serão discutidos com base na literatura para caracterização de seus efeitos biológicos. Os tempos de retenção estão referenciados no início das frases, permitindo a rastreabilidade nas tabelas 4 e 5 para o extrato completo e na tabela 6 referente às frações. Nestas tabelas, outras informações estão disponíveis como número do CID (PubChem), peso molecular, fórmulas, etc. As estruturas químicas e outras informações estão contempladas no Apêndice A.

Substâncias como *Bicyclo* no tempo de retenção de 13,004 da tabela 4, CID 5452236 é considerado um produto natural normalmente encontrado em vegetais como *Valeriana officinalis* e *Dumortiera hirsuta* (GRÄNICHER, *et al.*, 1995; Saritas, *et al.* 1998), tendo sido reportado, atividades biológicas importantes como fator de necrose tumoral relacionado à inflamação (ISHIBASHI, *et al.* 2021), foi primeiramente isolado de organismos marinhos como nudilibrânquios e corais, produzindo efeito antiadesão para que os corais se defendam da adesão de cracas marinhas *Balanus amphitrite* (CHEN, *et al.* 2013)

O sesquiterpeno *1H-Cycloprop[e]azulene*, detectado no tempo de retenção de 13,318, foi encontrado na planta *Annona reticulata*, planta da família da fruta-do-conde. A casca dessa planta tem sido utilizada como poderoso adstringente, tônico, agente anti-inflamatório, na cicatrização de feridas, ansiolítico, antiestresse, antimutagênicos e espasmolíticos, também, produziu efeito analgésico em camundongos contra estímulos de dor induzida por calor (CHAVAN, *et al.* 2012).

O tempo de retenção 13,866, apresentou o composto *naphthalene*, ou *hexahydronaphthalene* encontrado em óleos aromáticos do vegetal *Bupleurum chinense*, sendo seu extrato conhecido como plantas medicinais chinesas usadas para tratar a epilepsia, por outro lado, esse extrato contém 63 elementos, entre eles, o *naphthalene* C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> (LI, *et al.*, 2022). Também foi identificado em estudo por cromatografia gasosa em *Agathis borneensis*, árvore de 55 metros de altura nativa da região da Indonésia, sendo muito utilizado o chá feito da madeira, contra dores de cabeça, dores musculares e

contra febre, também foram relatadas atividades contra *Plasmodium falciparum* (ADAM, *et al.* 2017).

No tempo de retenção de 14,462 o sesquiterpeno *Gamma-murolene* CID 12313020 SI: 94, um composto de cadeia carbocíclica e membro de octahidronaftalenos, um metabólito natural, e foi detectado em *Xylopiá aromática* e *Xylopiá laevigata*, entre outros organismos, *Xylopiá* é um gênero botânico da ordem da Magnoliales, e conforme estudo realizado em *X. laevigata*, através de seu óleo essencial, entre 44 compostos detectados, um grupo de seus maiores constituintes o  $\gamma$ -murolene,  $\delta$ -cadinene, germacrene B,  $\alpha$ -copaene, germacrene D, bicyclogermacrene, e (E)-caryophyllene demonstraram efeitos significativos contra células tumorais em estudos *in vitro* e *in vivo* (QUINTANS, *et al.* 2013).

*Alpha-Murolene* é um sesquiterpeno encontrado em espécies vegetais como *Xylopiá aromática*, *Xilópiá serica*, entre outras, onde estudos sobre óleos essenciais contendo *alpha-murolene*, através de análise *in silico*, verificaram a viabilidade como um componente antiviral contra covid-19 (AMAPRO *et al.*, 2021) nesse sentido, compostos naturais são encontrados em óleos essenciais como vegetais do gênero *Larix*, que produzem o *gamma-Murolene* bem como espécies do gênero *Myrciaria*, verificando-se atividade citotóxica do óleo essencial contendo entre outros compostos o *gamma-Murolene* contra alvos enzimáticos de *Leishmania* (SILVA-BARBOSA, *et al.*, 2022).

No tempo de retenção de 14,573 o composto *Naphthalene* aparece novamente, identificado pelo programa NIST 14, assim, este composto foi identificado no tempo de retenção de 13,866 e 14,573, sendo que o primeiro com SI:93 e este último, SI:90. As fórmulas são compostas por dois anéis benzênicos, característico dos naftalenos, porém no tempo de retenção de 14,573, analisando a estrutura química 2D, observa-se uma diferença na posição da saturação, conforme APÊNDICE A figura 162 referente ao tempo de retenção de 13,866 e figura 164 referente ao 14,573, podendo se tratar de uma situação de isômeria ótica. Uma análise mais criteriosa poderia ser feita, mas para este estudo, a referência em questão é o resultado do programa NIST 14.

O *dodecatrien* aparece no tempo de retenção de 15,132 CID 5284507 SI:95, denominado como Nerolidol, um sesquiterpenóide farnesano com grupos metil nas posições 3, 7 e 11 com grupo hidroxila na posição 3. É um

produto natural presente em várias flores e plantas produzindo odores específicos. Aparecem dois isômeros geométricos, sendo um na forma *trans* e outro *cis*. É muito utilizado em cosméticos, na produção de perfumes, também como agente flavorizante alimentício (PubChem). Possui papel importante na comunicação interespecies, comunicação intracelular e proteção contra predadores, sendo um composto de interesse farmacológico (KARUPPIAH, *et al.* 2017).

Outro sesquiterpenóide no tempo de retenção de 15,481, CID 13854255, SI:95, o *Spathulenol* possui um papel como metabólito de origem natural (PubChem) encontrado em *Tussilago farfara*, planta da família Asteracea, foi verificado em ensaios *in vitro* atividade inibitória *Mycobacterium tuberculosis* (ZHAO, *et al.*, 2014) , o espatulenol demonstrou também atividade citotóxica em células de neuroblastoma (MANJIMA, *et al.* . 2021). Em análise do extrato e frações de *Phyllanthus nivosus* foram encontrados 53 elementos entre eles, o *spathulenol* ou espatulenol e mediante testes *in vitro*, foram constatadas atividades favoráveis a terapias contra o protozoário Plasmodium (JONHSON, *et al.* 2022) .

No tempo de retenção de 15,564, CID 536366, com SI: 88 observa-se um fato potencialmente relevante, sendo que para este composto, foi realizado um estudo com células de melanoma B16F10, da mesma linhagem utilizada no presente trabalho, assim, o *kauran* foi isolado do extrato metanólico do vegetal *Annona squamosa* pertencente à família Annonaceae, a partir desse extrato, verificou-se efeito antiproliferativo em células de melanoma murino B16F10, por meio da fosforilação da p38, sugerindo os autores, que esse extrato possa ter uma ação antitumoral e também aplicação dermatológica no combate à hiperpigmentação entre outras doenças da pele (KO, *et al.* 2019).

O tempo de retenção 15,691, apresenta o composto *1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol* , um sesquiterpeno alcoólico, com o número CID 6432543 e SI 95, foi encontrado em extrato de uma planta muito utilizada por possuir propriedades medicinais, a *Psidium guajava* , originária da América tropical, planta popularmente conhecida como goiabeira. O estudo foi realizado a partir do extrato isopropanólico das folhas, com o objetivo de identificar por meio de CG/MS, os compostos constituintes dessa planta, muito utilizada na Nigéria com atividades contra alguns tipos de câncer, também utilizada contra

infecções bacterianas, inflamações e dores em geral (IGWE and ABII, 2014).

Este composto, foi identificado também em *Bryophyllum pinnatum*, conhecida como “folha-da-fortuna”, tradicionalmente utilizada na Nigéria como planta medicinal, como terapia adjuvante em casos de câncer, também contra malária, febre tifoide e muitas outras doenças (IGWE and ABII, 2014).

O *Ledol* é referenciado em RT 15,858, CID 6432561, SI de 94, verificou-se atividade antifúngica em difusão de disco agar, desse composto através do óleo essencial de *Rhododendron tomentosum*, vegetal da família Ericaceae (JUDZENTIENE, *et al.* 2020). Em testes de toxicidade *in vivo*, revelou atividade tóxica nos ensaios com óleo essencial de *Rhododendron tomentosum*, o *ledol* entre os dois maiores compostos (RAAL, *et al.*, 2014; JUDZENTIENE, *et al.* 2020). O *ledol* também apresenta efeitos contra agentes patogênicos, em extrato obtido pelo método supercrítico em câmara de CO<sub>2</sub>, oriundo de vegetais como *Angelica archangelica*, *Rhododendron tomentosum* e *Tanacetum vulgare* (KORPINEN, *et al.* 2021). O composto *cycloprop[e]azulen* como o *ledol* anteriormente descritos, possuem características estruturais semelhantes, como observado na plataforma *PubChem*.

No tempo de retenção 17,366 o composto *4-Hexen-1-ol,2-ethenyl-2,5-dimethyl*, com SI de 90, foi descrito em um estudo sobre a composição volátil de *Ficus hispida*, como um, entre outros compostos, atuantes no atrativo de vespas polinizadoras, por ser esta planta, dependente dessa interação interespecífica para garantir o sucesso reprodutivo (SONG, *et al.* 2001). Este composto também foi encontrado em extrato de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), realizado em um estudo sobre a associação ente o efeito de aciclovir em conjunto com o extrato do alecrim, o princípio desse estudo se baseia na relação entre citomegalovírus e vários tipos de câncer, entre eles, o glioblastoma. A conclusão desse estudo *in vitro*, é que a associação entre o aciclovir e o extrato do alecrim, exerceu uma contribuição efetiva contra o desenvolvimento de células de glioblastoma (ÖZDEMIR and GÖKTÜRK, 2019).

O composto *neophytadiene* no tempo de retenção 18.875, aparece com um SI 92, é um diterpeno e possui um papel como agente anti-inflamatório anti-microbial, sendo um metabólito de plantas e algas. Uma formulação de poliervas denominada de “Imusil” contendo *neophytadiene* foi considerado

como uma nova estratégia no tratamento contra COVID-19 agindo como anti-inflamatório (RATHEESH, *et al.*, 2022). Foi isolado Neofitadieno de algas marinhas como *Turbinaria ornata*, e verificou-se em estudos *in vitro* e *in vivo* ação modulatória de resposta inflamatória em macrófagos RAW 264 e em ratos “Sprague Dawley” (BHARDWAJ, *et al.* 2020).

Ácido palmítico ou ácido hexadecainóico no tempo de retenção de 20,412, com SI de 95, é um ácido graxo de cadeia longa, óleo de palma, utilizado na fabricação de manteigas e margarinas, queijos e em outros alimentos sólidos. Também é um metabólito de *Escherichia coli*, *Daphnia magna* e algas. Em um estudo de isolado de *Caulerpa cylindricea*, alga verde, verificou-se atividade contra SARS-CoV-2 (EROL, *et al.* 2022).

No tempo de retenção de 22,207, o composto *phytol* aparece com um SI de 97, conferindo elevado grau de similaridade com a biblioteca NIST. Um estudo utilizou um macerado em meio etanólico de *Xestospongia testudinaria*, um espongiário marinho, onde através de cromatografia gasosa de massas, isolou entre outros compostos o *phytol*, avaliando seus efeitos contra linhagens de células tumorais, concluindo que o extrato inibiu o crescimento de células HeLa (SWANTARA, *et al.* 2019). Este composto também foi isolado de *Annona muricata*, fruta conhecida como graviola, por meio de maceração e extração alcoólica, identificado por espectrometria de massas (SHIBULA, *et al.* 2015).

O tempo de retenção de 28,151 identificou o composto *heneicosane*, com um SI de 96, e também foi identificado no tempo de retenção 29,057 SI:97. Este bioativo, isolado do vegetal *Plumbago zeylanica*, planta da família Plumbaginaceae, apresentou atividade antimicrobiana, demonstrando excelente ação contra *Streptococcus pneumoniae* e contra o fungo *Aspergillus fumigatus* (Vanitha, *et al.* 2020), por outro lado, o *heneicosane* demonstrou atividade como um fator importante na atuação, como um componente fisiológico, na orientação do vôo em *Aedes aegypti* fêmeas, no processo de ovodeposição (SEENIVASAGAN, *et al.*, 2009).

No tempo de retenção 29,414, o *Supraene* aparece com SI 96, tendo como sinônimos o *Squalene*, *Spinacene*, *trans-Squalene*. Esqualeno ou supraeno é um triterpeno (Tab 5 Linha 09) CID 638072, possui um papel no metabolismo humano, participando no processo da síntese de colesterol



endógena, é constituinte da membrana do Retículo Endoplasmático Liso (REL), participa também do metabolismo de vegetais e em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (PubChem). Squaleno é um triterpeno de cadeia linear e foi primeiramente obtido, a partir de óleo de peixes cartilagosos como os tubarões, que deu origem ao nome, designação dos peixes esqualídeos, *squalus* em latim, e *Esqualidae* que é uma família de tubarões. O esqualeno é um metabólito intermediário na síntese do colesterol (PubChem), não sendo este composto, susceptível a peroxidação lipídica, distribui-se ubiquamente nos tecidos humanos onde é transportado no soro, geralmente em associação com lipoproteínas de densidade muito baixa. O esqualeno é investigado como uma terapia adjuvante contra o câncer (PubChem).

As principais fontes vegetais de esqualeno, são sementes de amaranto e óleo de oliva virgem e no reino animal, o esqualeno pode ser obtido através do óleo de fígado de peixes cartilagosos (LOZANO-GRANDE, *et al.*, 2018). Muitos estudos relataram benefícios do esqualeno à saúde, nesse sentido, a ingestão de esqualeno em associação a baixas doses de pravastatina, revelou ser um método seguro para tratamento da hipercolesterolemia em pacientes idosos (CHAN, *et al.*, 1996). Outro estudo relatou testes com squaleno e *hydroxytyrosol* obtidos de azeite de oliva virgem, através de ingestão suplementada com coenzima Q(10) em coelhos, com a finalidade de verificar a diminuição dos efeitos de uma dieta aterosclerótica. No tecido gengival, foi verificado que esqualeno reduziu fibrose, o estudo sugeriu que a associação de squaleno com *hydroxytyrosol* com coenzima Q(10), reverteram os efeitos negativos da dieta aterosclerótica no sistema vascular gengival (BULLON, *et al.*, 2009).

O esqualeno tem demonstrado ser um eficiente inibidor de processos de carcinogênese de pele através de aplicações tópicas, nesse sentido, demonstrou atividade em câncer de pele em camundongos, utilizado em dois estágios de desenvolvimento tumoral (SMITH, 2000). Por outro lado, o acúmulo de esqualeno, pode ser benéfico para alguns tipos de câncer, enquanto em outros, pode ser prejudicial, considerando o envolvimento da base molecular nutricional, em termos de dependência e vulnerabilidade seletiva das células tumorais, portanto, um dos principais desafios no desenvolvimento de novas drogas anticâncer é o entendimento das bases moleculares dos nutrientes das

células tumorais (PAOLICELLI and WIDMANN, 2019; GARCIA-BERMUDEZ, *et al.*, 2019).

No tempo de retenção de 29,704, SI: 96, e no tempo de retenção de 32,298, foi identificado o *2-methyloctacosane* e foi relatado em extratos vegetais verificando-se efeitos medicinais (VEERASWAMY, *et al.*, 2023), em óleos essenciais como *Rosa damascena* (NAQUVI, *et al.*, 2014), e em revestimento cutâneo de moscas de frutas, onde, o aumento da quantidade de *2-methyloctacosane*, está relacionado com a idade mais avançada desses insetos, e a variação de *n-heneicosene*, *n-heneicosane*, e *n-tricosene* na constituição do revestimento cutâneo desses insetos, pode estar relacionado com o comportamento reprodutivo (CARAVANTES-VILLATORO, *et al.*, 2021).

No tempo de retenção de 30,148 com SI: 96, e no tempo de retenção 32,913, o programa identificou o *tetratetracontane* ou *n-tetratetracontane*, um alcano. Em análise por CG/MS em *Allium chinense*, foi identificado entre outras substâncias, o *tetratetracontane*, esse estudo concluiu que o conjunto dos compostos, em particular a elevada quantidade de terpenos, conferem as propriedades medicinais da planta (RHETSO, *et al.*, 2020), por outro lado, foram relatados efeitos antimicrobiais em extrato de *Ehretia abyssinica*, pequeno arbusto da família Boraginaceae, conhecido por suas propriedades medicinais (GUMGUMJEE, *et al.*, 2015).

O composto *Oxirane, 2,2-dimethyl -3-(3,7,12,16,20-pentametamethyl-3,7,11,15,19)*, foi detectado no tempo de retenção de 30,615 com SI de 90. Um estudo avaliou atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium spp.* trazendo uma abordagem promissora no tratamento dessas doenças parasitárias em combinação com outros métodos terapêuticos (Peixoto, *et al.* 2023).

Em 31,993 o composto *n-octacosanal* um aldeído, foi identificado com um SI de 95, Reisinger demonstrou que a presença do aldeído octacosanal, tem um papel importante no complexo processo da interação entre o fungo da ferrugem do milho e a planta hospedeira (REISINGER, *et al.* 2006), por outro lado, o composto *ocatcosanal* estimulou a ovoposição da fêmea da mosca *Mayetiola destructor*, praga dos cereais, (MORRIS, *et al.*, 2000), além dessas interações entre hospedeiro parasita, o *octacosanal* demonstrou atividades medicinais como, anti-Parkinson, regulação do metabolismo de lipídios, proteção cardiovascular, proteção do fígado, proteção de células epiteliais,

entre outras, podendo ser encontrado em alimentos como, casca de maçã, grãos, camarões de água gelada, tomates, cera de abelhas, farelo de arroz, entre outras fontes (ZHOU, *et al.*, 2022).

O fracionamento do extrato por meio do método HPLC, resultou em oito frações, posteriormente enviadas para análise por CG/MS na Central Analítica da Universidade de São Paulo, utilizando-se os mesmos parâmetros da análise do extrato. Nesta análise nem todos os compostos atingiram um índice de similaridade (SI) acima de 90, conforme a biblioteca NIST 14, portanto, em decorrência da complexidade do processo de extração e do tempo decorrido, consideraram-se os compostos com picos acima de 7% e não foram considerados os valores de SI como critério de exclusão. O processo de separação das frações produziu quantidades em torno de 600 µg de cada fração, então os ensaios biológicos, ficaram limitados ao ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT.

A fração 1 (Fr1) foi caracterizada pelo composto *1,3-dihexadecyl-1,1,3,3-tetramethyl*, contendo silício em sua fórmula, (C<sub>36</sub>H<sub>78</sub>OSi<sub>2</sub>), caracterizado por um único pico no tempo de retenção de 81,187 com SI de 91, com altura de 42,86%. Compostos contendo derivados de silício em sua fórmula, podem proporcionar passagem de fármacos pela membrana celular, de forma passiva por difusão, por proporcionarem certa lipofilicidade, sendo utilizados com eficiência em tratamentos contra tumores, como por exemplo, silaplatina, análogo à cisplatina (ALMENNINGEN, *et al.*, 1963).

Outros compostos orgânicos contendo silício em suas estruturas, denominados como disiloxane, demonstraram efeitos contra a resistência à doxorubicina em tratamentos em linhagem celular de câncer de cólon humano (WESOŁOWSKA, *et al.*, 2020). Efeitos semelhantes foram relatados por meio da aplicação de compostos organossiliconados em linhagens de células de sarcoma e tumorais de pulmão, concluindo os autores, que disiloxane induz a polimerização de tubulinas e comprometendo a estabilidade de microtúbulos (WESOŁOWSKA, *et al.*, 2020).

Os ensaios para avaliação de citotoxicidade com a fração 1 (Fr1) demonstraram um efeito protetivo nos fibroblastos de 21% em relação às células de melanoma murino produzindo uma diferença significativa com valor de  $p < 0,0001$ .

Na fração 2 (Fr2) foi evidenciado um único pico no tempo de retenção de 38,510, com um SI de 85, denominado de *oplopanone*, ocorre que, este composto possui semelhança estrutural com o composto identificado no tempo de retenção 17,710 na análise do extrato (Tabela 4), podendo se tratar de um caso de isomeria ótica (APÊNDICE C figura 214) .

A literatura disponível sobre esse composto acaba por não tratar exatamente dessa sobreposição de orbital na ligação do hidrogênio. Na análise do extrato, o composto no tempo de retenção de 17,710 entrou no processo de exclusão, por ter um índice de similaridade de 83. Artigos tratam do composto *Oplopanone*, proveniente do extrato de *Turnera diffusa* conhecida popularmente como Damiana, planta arbustiva utilizada por suas propriedades medicinais, então, associaram o extrato liofilizado à nanopartículas de ouro, demonstrando efeitos positivos como elevada capacidade antioxidante demonstrando também, efeitos antibacterianos, com características de baixa citotoxicidade e atenuou a produção de espécies reativas de oxigênio (REYES-BECERRIL, *et al.*, 2021).

Na avaliação da fração 2 (Fr2) no que tange ao ensaio de MTT, demonstrou um efeito seletivo, mais protetivo aos fibroblastos em relação ao melanoma B16F10, apresentando uma diferença significativa estatisticamente, em percentual de 23%.

A fração 3 (Fr3) apresentou dois picos de interesse, sendo um com altura de 9,45% no RT 68,785 e outro com altura de 18,3 % em 69,480, com SI de 79 e 92 respectivamente, sendo a nomenclatura do composto de menor intensidade o *3-phenylpropionic acid* e o *squalene* com maior intensidade. Essa fração, como as outras anteriores no ensaio de MTT, reagiu com efeito mais protetivo aos fibroblastos provavelmente em decorrência da presença do *phenylpropionic acid*, pois, na Fr4, o *Squalene* surge praticamente com um pico de maior evidência, porém esta fração Fr4 não produziu diferenciação significativa entre fibroblastos e tumorais.

O *squalene* foi discutido na análise do extrato no tempo de retenção de 29,414, essa questão demanda uma análise mais apurada para avaliar se o *squalene* produziu um efeito protetivo para ambas as linhagens. Análise em experimentos através da suplementação de squalene por meio de dietas, produziu efeito protetivo em mitocôndrias nas células de fígado de

camundongos idosos (BUDDHANA, *et al.*, 2007), portanto o *squalene* tem demonstrado efeitos protetivos, anti-inflamatórios e antioxidante atuando também como promotor da saúde cardiovascular (IBRAHIM, and MOHAMED, 2021).

Observamos na fração 5 (Fr5) quatro picos de referência, um em RT 43,537, o *trimethyltricyclododecane*, o segundo pico em RT 47,504 o *pentadecanoic acid*, em RT 53,592 o *octadecanoic acid* e em RT 61,225 o *phenol*. Poucos artigos de referência no tocante ao composto *trimethyltricyclododecane*, contudo, pesquisadores o isolaram do eucalipto e descreveram atividades moluscicida, produzindo um eficiente controlador de origem natural de *Oncomelania hupensis*, um molusco de água doce (YIN, *et al.*, 2014). O outro composto RT 47,504 o pentadecanoato de etila ou *pentadecanoic acid* é um éster de ácido graxo, oriundo de metabolitos vegetais, e o consumo alimentício por humanos tem reservado observações metabólicas e nutricionais, podendo estar vinculado a estados de saúde e doenças, principalmente cardiovasculares (JENKINS, *et al.*, 2015; YOO, *et al.*, 2017; VENN-WATSON, *et al.*, 2020).

O composto *octadecanoic acid* possui papel como metabólito vegetal e é um éster etílico de ácido graxo de cadeia longa, um éster octadecanoato. Foi encontrado através de CG/MS em cogumelos da espécie comestível *Pleurotus*, conferindo atividades benéficas à saúde humana, por meio de atividades antioxidantes, antimicrobianas (MKHIZE, *et al.* 2023) e do isolado de *Azadirachta indica* planta da família Meliaceae apresentou atividade acaricida (DUA, *et al.* 2009). No ano 2000 Bryan descreveu a estrutura química de *2,4-bis(1-methyl-1-phenylethyl)phenol*,  $C_{24}H_{26}O$  (BRYAN, 2000), que através do óleo essencial de *Parkinsonia aculeata*, vegetal da família das Fabaceae, apresentou atividade bactericida e antifúngica (AL-YOUSSEF, *et al.*, 2015).

Na fração 6 (Fr6) através do RT 66,222, foi identificado o *oxirene*, identificado e comentado na análise do extrato no RT 30,615. No ensaio de citotoxicidade a Fr6 produziu efeito significativo na comparação entre os fibroblastos e as células tumorais, (tabela 7.)

A fração 7 (Fr7) produziu três picos sendo um no RT 47,492 *pentadecanoic acid*, outro no RT 53,586 o *Tetradecanoic acid* e o terceiro pico em RT 61,211 *Phenol*, estes resultados da extração da Fr7 apresentaram dois

compostos constantes na Fr5 sendo o *Pentadecanoic Acid* RT 47,505 e o *Phenol* RT 61,225. O composto *tetradecanoic acid* não foi identificado na Fr5 nem no extrato, somente na fração 7, e é descrito na literatura como flavorizante de alimentos e bebidas (WU, *et al.*, 2009; SHEN, *et al.*, 2022; MORAIS, *et al.*, 2022). No ensaio de citotoxicidade, a Fr7 apresentou um resultado significativo estatisticamente, considerando a diferença entre a linhagem de fibroblastos e a linhagem tumoral conforme tabela 7 e figura 13.

No RT 47,513 o *hexadecanoic acid* aparece como composto da Fr8, com um único pico em evidência de 30,12% e SI 87, composto este, presente também na análise do extrato no RT 20,412 e discutido anteriormente referente à este tempo de retenção. Seria de extrema valia considerar uma análise um pouco mais detalhada, no que tange ações antitumorais sobre este composto, onde, apresentou um valor de  $p < 0,0001$  e o valor do percentual da diferença entre os fibroblastos e células tumorais foi de 35% proporcionando maiores condições de viabilidade celular aos fibroblastos, em comparação às outras frações. Essa diferença ficou igual ao valor obtido no ensaio realizado nas mesmas condições com o extrato completo, sendo que esta fração 8, obteve-se o melhor resultado, e o extrato em comparação às outras frações obteve melhor desempenho, conforme tabela 7.

Os dados publicados relativos aos efeitos e atividades antitumorais do *hexadecanoic acid*, pesquisadores o detectaram em extrato de *Kigelia pinnata*, vegetal da família Bignoniaceae, através de extrato obtido por maceração em clorofórmio, verificando citotoxicidade significativa contra células de carcinoma colorretal humano (RAVI and KRISHNAN, 2017). Outro estudo isolou este composto da alga marrom *Turbinaria ornata* verificando potencial ação antioxidante e atividade antitumoral em células tumorais de cólon (BHARATH, *et al.*, 2021). Outro estudo realizado através do extrato de *Halymenia durvillei* uma espécie de alga Rhodophyta da família Halymeniaceae verificou atividade antitumoral em células de câncer de mama triplo negativo, agindo por meio da disfunção da membrana mitocondrial, induzindo as células à apoptose (SANGPAIROJ, *et al.*, 2022).

O *hexadecanoic acid*, foi obtido por meio de extração por solvente etanólico de *Saueda monoica*, vegetal da família Amaranthaceae, de característica arbustiva e originária do Sul e da costa Leste da África, Oriente

Médio e Índia. O extrato foi analisado por meio de CG/MS, obtendo-se 20 compostos, sendo o *Hexadecanoic Acid* um dos mais abundantes. O extrato demonstrou significativa atividade em células de câncer hepático (AL-SHAWI, *et al.*, 2020). Outro estudo por meio de macerado etanólico de *Sargassum crassifolium* alga castanha da família Sargassaceae, distribuída geograficamente na maioria dos oceanos, obtiveram um extrato analisado por meio de CG/MS, contendo o *hexadecanic acid*, mostrou potencial citotoxicidade, estatisticamente significativa contra células de melanoma murino B16F10 (MARTYASARI, *et al.*, 2021).

Variações na estrutura química dos ácidos graxos evidenciados na fração 5 e no extrato, conforme APÊNDICE C, figura 215, induz a necessidade de uma avaliação mais específica antes de definir as vias celulares pelas quais atuam, essas diferenças estruturais, apesar da proximidade constitutiva, podem apresentar efeitos biológicos distintos (CHURRUCA, *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos pelo ensaio de MTT em fibroblastos murino L929 e células de melanoma B16F10, demonstraram que o extrato completo teve um desempenho mais adequado às finalidades propostas, do que as frações isoladas, a não ser o resultado da fração 8 (Fr8) que ficou semelhante ao resultado do extrato. Deve-se considerar que esta proposição não é determinante, sugerindo para isto, novas análises por meio de processos de separação, mesmo que nos mesmos moldes deste estudo, porém com mais recurso de tempo. Uma avaliação mais detalhada dos compostos depende de uma verificação exaustiva pela complexidade sistêmica das estruturas químicas que podem estar interagindo sinergicamente entre si, portanto a composição química das resinas tem papel decisivo no produto final.

O Alecrim-do-campo é considerado umas das mais importantes fontes vegetais constituintes do própolis verde, muitos estudos relatam a extração e análise de compostos bioativos do própolis verde por outras vezes do própolis marrom, quando as abelhas polinizam locais onde brotam o alecrim-do-campo, encontrando nessas análises o artepelin C como um bioativo constituinte oriundo dessa fonte vegetal (KUROPATNICKI, *et al.*, 2013; DING, *et al.*, 2021; VEIGA, *et al.*, 2017; AGA, *et al.*, 1994; MARCUCCI, *et al.*, 2001; KUROPATNICKI, *et al.*, 2013). Considerando o fato de que as abelhas não alteram ou contribuem pouco na composição química da matriz vegetal do

própolis (DEZMIREAN, *et al.*, 2021), o artepelin C poderia ter sido encontrado nas análises realizadas para o desenvolvimento deste estudo.

Para a caracterização desse composto, foi feito um refinamento na análise dos picos obtidos por CG/MS, em busca da massa 300,4 g/Mol, inerente ao artepelin C e no RT de 29,550 aparece a massa 299 M<sup>+</sup>, podendo ser o composto em questão. Além desse refinamento, foi feita análise das massas, por espectrometria de massas, dessa forma, foram registrados 7 picos, com massas nos valores variando de 254,87; 280,87; 298,95; 299,00; 299,01; 300,96 e 361,10, comparando os principais picos de fragmentação, conforme o primeiro gráfico da figura 9, a massa de 300,96 g/Mol pode representar o composto artepelin C, mas para confirmar um resultado factível, mais análises devem ser realizadas, mais purificações, separações de compostos, e análises por ressonância magnética nuclear (RMN).

Uma questão que deve ser levada em consideração, é o fato de outros estudos que utilizaram a biblioteca NIST 14, terem detectado o artepelin C, nesse sentido, o composto está contemplado no sistema desta biblioteca (BANKOVA, *et al.*, 2016; MOSKWA, *et al.*, 2020; MOSKWA, *et al.*, 2022), portanto, podemos concluir que a amostra referente à análise deste estudo não contém o artepelin C.

O quimioterápico dacarbazina foi selecionado neste estudo por ser o tratamento de referência em terapias contra o melanoma, atuando na alquilação do DNA por meio da conversão em formas, que subsequente mente metilam bases de DNA, assim, impedindo, a multiplicação de células tumorais de crescimento rápido. Esse processo de conversão da dacarbazina envolve a transformação por meio de  $\alpha$ -hidroxilação produzindo resíduos de N-metil, quimicamente instáveis, não sendo recomendável o tratamento com esse medicamento em pacientes com tumores que possuem mutações nos genes *Mgmt* e *Mlh1*, correndo o risco do surgimento de outras neoplasias após o tratamento (SANADA, *et al.*, 2004).

O paclitaxel foi utilizado nos experimentos deste estudo por ser um quimioterápico de ampla gama no tratamento de tumores, porém, por não ser o foco principal a comparação entre os quimioterápicos, foram executados alguns ensaios para a verificação e comparação de alguns resultados como por



exemplo, estudos do efeito sinérgico entre os compostos. O paclitaxel por sua vez, tem como base o taxano extraído de um vegetal conforme descrito na introdução no item 2.6, e possui como mecanismo de ação a despolimerização dos microtúbulos, interferindo no avanço da mitose, aumentando o acúmulo de células paradas em G2 e M (YARDLEY, 2013).

O composto monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F faz parte de um grupo de agentes antitumorais com propriedades antiproliferativas em diversas linhagens de células tumorais, tendo como via de ação, a modulação da permeabilidade por meio da interação com fosfolipídios constituintes da membrana, atuando no processo de indução de *turnover* dessas bases lipídicas, levando as células a um processo de apoptose sem ter o DNA como alvo, tendo demonstrado alta seletividade para células tumorais (Rios-Marco, *et al.*, 2011; Marco *et al.* 2014).

O extrato SC1640 ou ArC, foi amplamente discutido anteriormente na análise da cromatografia gasosa do extrato e das frações dele derivadas, por meio da análise de artigos referenciando os compostos associados aos resultados e identificação pela biblioteca NIST 14, nesse contexto, foram verificados compostos com propriedades antitumorais, propriedades inseticidas, ação simulando ferormônio, ação antioxidante portanto protetiva, em que, nesse contexto de interações sistêmica entre esses compostos, é que emerge o SC1640, dos quais, os resultados serão discutidos a seguir.

A formulação lipossomal do SC-1640 foi também avaliada neste estudo, através da utilização do carreador constituído por vesículas lipídicas sintéticas do catiônico cloreto de dioctadecildimetilamônio DODAC, da *Sigma- Aldrich*, demonstrando efetividade na incorporação do SC-1640 ao lipossoma por meio de ensaios em equipamento DLS, conforme resultados descritos no item 5.5. Esse processo de integração foi realizado em solução de diclorometano e posteriormente foi seca com auxílio de injeção de argônio, posteriormente deixado em câmara de vácuo, a fim de garantir a eliminação total do diclorometano. Após esse procedimento, foi adicionado água, com o objetivo de se obter uma solução aquosa. Os compostos em solução conjunta, foram resuspendidos à temperatura de transmissão de fase, e posterior sonicação, obtendo-se assim os lipossomas. Esta fase de sonicação, realizada por meio de uma haste de titânio, proporciona a obtenção de vesículas de pequenas dimensões e homogêneas (AKBARZADEH, *et al.*, 2013).

Como o SC-1640 possui característica apolar, e por ser uma inovação a interação com os lipossomas, não se tem até o presente momento, uma descrição da interação química desse extrato aos lipossomas catiônicos, porém, por serem os lipossomas compostos por bicamada lipídica, ou seja, um modelo de membrana celular sintética, contendo uma porção polar na superfície e outra, composta por longas cadeias alifáticas apolares, onde ocorreriam as interações hidrofóbicas ( BOZZUTO and MOLINARI, 2015).

O ensaio de para avaliar a resposta celular aos tratamentos foi o teste colorimétrico MTT, realizado nas quatro linhagens, duas de fibroblastos normais e duas de melanoma, sendo um grupo de células de origem humana e outro de origem murino, nesse sentido, no tratamento com SC1640 comparando células fibroblastos FN1 com melanoma SKmel, em tratamento de 24 horas obteve-se um valor significativo  $p < 0,001$  o mesmo valor significativo foi observado nos tratamentos de 48 e 72 horas com valor de  $p < 0,001$ , essa situação indica um efeito apoptótico maior na linhagem tumoral do que nos fibroblastos normais.

Na linhagem de células de origem murino, com o tratamento por meio de SC1640, comparando-se fibroblastos e melanoma, foi observado um valor de  $p$  significativo no período de 24 horas, por outro lado, nos ensaios de 48 e 72 horas, apresentou um resultado não significativo, podendo-se considerar a hipótese de não haver efeito seletivo nesses tempos de tratamento, no entanto, essas diferenças em linhagens celulares interespecíficas, precisam ser melhor avaliadas.

O composto monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F demonstrou efeito significativo nos tempos de 24, 48 e 72 horas de tratamento, tanto para as linhagens de fibroblastos humanos como para os de origem murino, apresentando seletividade para as linhagens de melanoma. Após 24 horas as células tumorais apresentaram núcleos com aspectos picnóticos na concentração de 62,32 mM contra 77,90 mM aplicado nos fibroblastos. Em 72 horas as células apresentaram aspectos de lise, produzindo um pouco de *debris*, demonstrando maior citotoxicidade para células tumorais, conforme já demonstrado por trabalhos desenvolvidos por pesquisadores do nosso grupo (CONCEIÇÃO, *et al.*, 2019; LAVELI da SILVA, *et al.*, 2021; CABRAL, *et al.*, 2022).

No ensaio para avaliação da integridade do potencial elétrico mitocondrial, o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F apresentou maior atividade inibitória em células de melanoma humano do que em fibroblastos, o mesmo ocorreu com o ArC, com a dacarbazina e com o paclitaxel, apresentando valores significativos, onde, somente o quimioterápico paclitaxel no tratamento em B16F10, demonstrou um valor de  $p < 0,01$ , mesmo assim, considerado significativo, através da análise do teste não paramétrico ANOVA. Esses quimioterápicos utilizados neste estudo como a dacarbazina e o paclitaxel, teoricamente não possuem atividade direta na mitocôndria, mas, por levar a célula à um processo de morte, a atividade mitocondrial tende a entrar em declínio pela desestruturação das interações entre as organelas citoplasmáticas. O entendimento dessas alterações no metabolismo energético das células tumorais, possui um importante papel para delinear futuros tratamentos (PAVLOVA & THOMPSON, 2016; ZHU, 2019).

O processo de apoptose é fundamental para a manutenção da homeostase dos seres vivos, tanto nas fases embrionárias como nos organismos adultos e pode ser ativado por uma sequência ordenada de cascata de reações enzimáticas, moldando um complexo processo entre moléculas inibitórias e promotoras, podendo ser acionado por vias intrínsecas ou extrínsecas (PAWLOWSKI, *et al.*, 2000). As mitocôndrias possuem papel importante nesse processo de morte celular mediado principalmente por proteínas apoptóticas presentes no espaço intermembrana das mitocôndrias, sendo o principal fator de morte celular o Citocromo C, promovendo ativação de caspases, por outro lado, se o processo de morte celular mediado pela mitocôndria por algum motivo for interrompido, a caspase 8 pode ativar outras caspases a jusante dando continuidade ao processo de morte celular, porém, em um formato mais lento (WESTPHAL, *et al.*, 2011).

A aplicação de ensaios por marcadores de vias apoptóticas, revela uma sistemática importante para o entendimento do mecanismo de ação dos compostos, nesse sentido, os quimioterápicos dacarbazina e paclitaxel por estarem bem descritos na literatura, não foram utilizados nesta fase dos ensaios. O 2AEH<sub>2</sub>F, já foi bem descrito através de estudos *in vitro* e *in vivo*, realizadas no nosso laboratório, demonstrando em diversas linhagens tumorais, que induz o efeito apoptótico dependente de p53, com aumento de

BAX, Bad, caspase 3, caspase 8 e liberação de citocromo C (CONCEIÇÃO, *et al.*, 2021; LAVELI, *et al.* 2021; CABRAL, *et al.* 2022).

A análise dos marcadores foi realizada em células tumorais SKmel-28 e B16F10, com o composto ArC e comparado com o grupo controle sem tratamento, já na formulação lipossomal com DODAC foi utilizado o DODAC/ArC na formulação que gerou melhor resultado, sendo o DODAC a 10 mM e ArC ou SC-1640 em 8 mM. Por ser o DODAC o carreador, as concentrações utilizadas nos ensaios, foram padronizadas em 10 mM para o DODAC e variando as concentrações dos compostos carreados. Então, os valores utilizados foram os obtidos nos ensaios de IC50%, ficando para as células de melanoma humano SKmel-28, 0,0083 mM para o DODAC vazio e 0,022 mM para o DODAC/ArC na concentração 10/8 mM. O mesmo princípio foi utilizado para as células de melanoma murino B16F10, porém nas concentrações obtidas nos ensaios de MTT para essas células, os valores de IC50% ficaram para o DODAC vazio 0,046 mM e para o DODAC/ArC, 0,013 mM, dessa forma, foi delineado o ensaio com os marcadores.

O gene Bax foi o primeiro membro pró-apoptótico identificado na família de proteínas BCL-2, induzindo alterações mitocondriais atuando na permeabilidade de membrana e interage com diversas atividades celulares e é codificado pelo gene BAX. A expressão desse gene é regulada pelo fator de transcrição p53, também conhecida como supressor tumoral, estando relacionada à apoptose mediada por p53. BAX quando ligado a BCL-2 forma um heterodímero, esse por sua vez, interage com o canal iônico mitocondrial dependente de voltagem, abrindo, por meio de perda de potencial de membrana, e assim, permite a liberação do citocromo, iniciando o processo de apoptose, por meio de uma cascata de caspases (BRADYA and GIL-GÔMEZ, 1998).

As células de melanoma humano SKmel-28 e as células de melanoma murino B16F10, na avaliação da expressão de BAX, tratadas com o extrato ArC, produziram um aumento significativo da expressão dessa proteína pró-apoptótica, em comparação com o grupo controle sem tratamento, sugerindo assim, um processo apoptótico mediado por cascata de caspases.

Outro membro pró-apoptótico da família BCL-2, o BAD, promove a morte

celular ao deslocar Bax da ligação a Bcl-2 e Bcl-xL (YANG, *et al.*, 1995). Fatores de sobrevivência, como IL-3, inibem a atividade apoptótica de Bad ativando vias de sinalização intracelular, que resultam na fosforilação de Bad (DATTA, *et al.*, 1997). A fosforilação nesses locais promove a ligação de Bad às proteínas específicas para evitar uma associação entre Bad com Bcl-2 e Bcl-xL (DATTA, *et al.*, 1997). AKt que é uma proteína cinase que atua na via de sinalização intracelular PI 3-cinase/Akt envolvida especialmente na sinalização de células para crescimento e sobrevivência fosforila Bad em Ser136, para promover esse mecanismo de sobrevivência celular, a Akt ativada se dissocia da membrana plasmática e fosforila outras proteínas alvo, entre as quais BAD (ZHA, *et al.*, 1996). No estado fosforilado, Bad libera as proteínas inibidoras que bloqueiam a apoptose promovendo a sobrevivência celular (SCHÜRMAN, *et al.*, 2000).

Neste contexto, foi avaliada a expressão de BAD não fosforilada e o efeito do flavonoide ArC produziu um aumento da expressão em células de melanoma humano SKmel-28, bem como frente ao tratamento com a formulação lipossomal. As células de melanoma murino B16F10, tratadas com ArC, em comparação com o grupo controle, produziram um aumento significativo na expressão de BAD, por outro lado, na aplicação da formulação lipossomal, houve um aumento, porém, não significativo.

Marcadores para uPA (*uroquinase-type Plasminogen Activator*), que é uma serina protease presente na membrana celular, envolvida na remodelação tecidual, fixação celular a determinados sítios, e migração celular em células estromais incluindo os macrófagos. O uPA ligado ao receptor possui papel importante no processo de metástase de algumas células tumorais, e a expressão de receptores de uPA, ou uPAR, são observados em vários tipos de células neoplásicas, bem como em células estromais associadas ao tumor (JAISWAL, *et al.*, 2018).

Nas células de melanoma humano SKmel-28, houve uma diminuição da expressão de uPA em decorrência do tratamento com SC-1640, porém não significativa. Com a aplicação da formulação lipossomal, houve um aumento na expressão de uPA. Com a B16F10, houve uma diminuição significativa, com um valor de  $p < 0,01$ , e no tratamento lipossomal, houve um aumento porém não significativo.

O BCL-2 por sua vez, é um regulador negativo da apoptose conferindo uma ação anti-apoptótica regulando a sobrevivência celular tanto em situações homeostáticas como em situações patológicas. BCL-2 captura BAX ativado por um canal de BCL-2 impedindo a formação de poros mitocondrial por inibição de BAX ( CZABOTAR, *et al.* , 2014; DUDKO, *et al.*, 2020). Nas células SKmel-28 tratadas com o extrato SC-1640, houve um aumento na expressão de BCL-2, porém não significativo, o inverso ocorreu diante da formulação lipossomal do SC-1640, produzindo uma diminuição com valor de  $p < 0,01$ . Nas células B16F10, a expressão de BCL-2 aumentou diante do tratamento com o SC-1640 com  $p < 0,01$ , e com a formulação lipossomal diminuiu com  $p < 0,05$ .

As caspases são uma classe de proteases, desempenhando muitas funções celulares como, diferenciação, remodelação e morte (SNIGDHA, *et al.*, 2012). A apoptose se inicia por um ativador de caspases ou pró-caspase que permite ligar-se a proteínas adaptadoras, isso ocorre quando as células recebem um sinal para iniciar a apoptose. Quando essas proteínas ativadoras se incorporam, é suficiente para umas clivarem as outras, iniciando um processo de cascata de caspases irreversível (BEROSKE, *et al.*, 2021). O gene correspondente codifica uma proteína que é membro da família das proteases de cisteína-aspartato (ASADI, *et al.*, 2021). A ativação sequencial das caspases desempenha um papel central na fase de execução da apoptose celular. As caspases são classificadas de acordo com sua função, caspases iniciadoras: 2, 8, 9 e 10 e as caspases efetoras: caspases: 3, 6 e 7.

A expressão de Caspase 3, proporcionou um aumento não significativo em células de melanoma humano SKmel-28 tratadas com ArC e na formulação lipossomal, houve um aumento significativo de Caspase 3 com valor de  $p < 0,001$ , já nas células de melanoma murino B16F10, houve um aumento significativo com o tratamento ArC, com  $p < 0,01$  e na formulação lipossomal, houve um aumento não significativo.

PCNA, (*Proliferating cell nuclear antigen*), pode ser detectado utilizando-se antígeno nuclear de célula em proliferação, revelando a presença do PCNA, que desempenha, um papel essencial no metabolismo do ácido nucleico como um componente da maquinaria de replicação e reparação (ZVI, 1997).

A utilização da técnica de Imuno-histoquímica para o antígeno

nuclear da célula em proliferação, relacionada à fase S revela a presença de PCNA. Em resumo, no colorretal humano, a taxa e o local da proliferação celular determinados pela imunomarcagem para PCNA, refletem a atividade proliferativa determinada pela marcação com o precursor de DNA BrdU. Os marcadores de PCNA, atualmente são muito utilizados para identificação e detecção da atividade de proliferação de células tumorais, (PAN, *et al.*, 2021).

Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um acessório proteico da DNA polimerase  $\delta$ , com um anel estrutural único. Está presente nas células eucarióticas em proliferação e desempenha funções de coordenação na replicação do desoxirribonucleotídeos (ESSERS, *et al.*, 2005).

Os resultados das análises com o PCNA, revelaram uma diminuição significativa nas células de melanoma humano SKmel-28 tratadas com SC-1640, com valor de  $p < 0,05$  e no tratamento lipossomal, houve uma diminuição não significativa. Na linhagem B16F10, a diminuição da expressão de PCNA foi significativa frente ao tratamento com o SC-1640, produzindo um valor de  $p < 0,001$ , por outro lado, a diminuição de PCNA com o tratamento lipossomal, não foi significativa.

O ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) é um potencial agente anticancerígeno que induz seletivamente a apoptose em uma variedade de células cancerígenas, interagindo com os receptores de morte DR4 e DR5 (TUR, *et al.*, 2008). Um membro do Fator de Necrose Tumoral (TNF), o Apo2L1 ou TRAIL, induz a apoptose em vários tipos de células tumorais, poupando células normais, Apo2L/TRAIL desencadeia a apoptose através da ligação por receptores DR4 e/ou DR5, até a morte celular, esses receptores, contêm um domínio de morte citoplasmática que recruta moléculas adaptadoras, envolvidas na ativação de caspases (KELLEY, *et al.*, 2005).

No ensaio para avaliar a expressão de TNF-DR4, no grupo de células SKmel-28, tratadas com SC-1640, houve um aumento da expressão significativa comparada com o grupo controle e no tratamento lipossomal comparando-se, o grupo controle tratado somente com DODAC e o grupo tratado com DODAC/ArC, houve um aumento significativo na expressão de TNF-DR4 com valor de  $p < 0,001$ .

O Citocromo é uma molécula proteica que contém um grupo heme

participando do processo de respiração celular, através do transporte de elétrons mitocondrial, porém, sua liberação do espaço intermembranas da mitocôndria, para o citosol, promove a apoptose por meio da ativação de cascata de caspases. O Citocromo C está numa posição de equilíbrio entre a vida celular e apoptose, participa também na produção e eliminação de ROS (KALPAGE, *et al.*, 2019), portanto, o Citocromo C possui um papel importante na regulação do fluxo geral da cadeia de elétrons mitocondriais, regulando o  $\Delta\Psi_m$ , a produção de ATP e produção de ROS (KALPAGE, *et al.*, 2020).

Na avaliação de expressão do Citocromo C, foi observado um aumento expressivo em células SKmel-28 tratadas com SC-1640, produzindo um valor de  $p < 0,001$ , e na formulação lipossomal, gerou também um aumento significativo  $p < 0,001$ . Nas células B16F10, o tratamento com SC-1640 gerou um aumento na expressão, porém a diferença estatística não foi significativa, ocorrendo o inverso com a formulação lipossomal, demonstrou um valor de  $p < 0,001$ .

Outro marcador pesquisado no presente estudo foi mTOR, TOR (*target of rapamycin*), “m” referente à *mammalian*, faz parte de dois complexos proteicos distintos, sendo um sensível à droga rapamicina e estimula o crescimento celular, enquanto o outro atua na ativação da proteína-quinase AKt (WANG and PROUD, 2006). O complexo mTOR possivelmente regula o crescimento celular e sua inibição, causa diminuição no tamanho das células, atuando portanto, no estímulo transcricional de mRNA, biogênese de ribossomos, metabolismo de nutrientes e autofagia (SARBASSOV, *et al.*, 2005).

A expressão de mTOR em células de melanoma humano SKmel-28, frente ao tratamento com flavonoide ArC, diminuiu significativamente, produzindo um valor de  $p < 0,001$  por outro lado, no tratamento com a formulação lipossomal, a expressão de mTOR teve um aumento significativo, com valor de  $p < 0,01$ . Em células de melanoma murino B16F10, o tratamento com SC-1640, produziu uma diminuição na expressão de mTOR com valor de  $p < 0,001$  e com a aplicação da formulação lipossomal, teve um aumento, porém não significativo.

A aplicação do ensaio para expressão de p53, teve a finalidade de avaliar uma importante via apoptótica celular, através da proteína de regulação



gênica p53, que é ativada em situações de danos no DNA, promovendo o bloqueio no ciclo celular, impedindo que a célula mutada evolua, porém, mutações no próprio gene TP53, que codifica esta proteína, gera uma p53 mutada perdendo sua função reguladora, tornando-se um oncogene. Essa mutação na p53 está presente em aproximadamente, metade dos cânceres humanos (DONEHOWER, 1996; HU, *et al.*, 2021).

Nas células de melanoma humano SKmel-28, com o tratamento por meio d ArC produziram uma aumento significativo de p53, ( $p < 0,01$ ), e com a formulação lipossomal, o aumento não foi significativo, por outro lado, nas células B16F10, o aumento foi significativo com o tratamento por meio do SC-1640, produzindo um valor de  $p < 0,001$ , e na formulação lipossomal, o aumento na expressão de p53, produziu um valor de  $p < 0,01$ . Essa característica do aumento de p53, não reflete diretamente em uma via apoptótica a ser considerada, pelo fato da linhagem SKmel-28 produzir p53 mutada (GIRNITA, *et al.*, 2000; DAVERI, *et al.*, 2015).

Como o flavonóide ArC possui uma gama de compostos, que podem agir sistemicamente entre si, no sentido se produzir efeitos biológicos específicos, modulados neste trabalho, com o intuito de mitigar o crescimento de células de melanoma, observamos que, entre esses compostos detectados nas análises acima discutidas, entre efeitos protetores e citotóxicos, temos o SC-1640. Alguns dos compostos, como por exemplo, o encontrado na fração 1, o *disloxane*, que promove permeabilidade da membrana celular, tende a facilitar a passagem passiva, de alguns fármacos ou interagir com a membrana externa mitocondrial (ALMENNINGEN, *et al.*, 1963).

O processo apoptótico via mitocondrial é uma possibilidade a ser considerada, com base em alguns resultados, como por exemplo, aumento de BAX nas células tratadas, que atua na permeabilidade da membrana externa mitocondrial. Apesar desse aumento não ter significância em células de melanoma humano SKmel-28, de certa forma foi maior que o grupo controle, além disso, também foi verificado aumento na expressão de caspase 3 em ambas as linhagens murino e humana, aliado ao aumento de Citocromo C.

Nesse contexto, as análises morfológicas apesar de não serem conclusivas, podem contribuir com os resultados obtidos nos demais ensaios

realizados, revelando as estruturas celulares por meio da microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, nesse sentido, foi observado alterações nas membranas citoplasmáticas, conforme será discutido a seguir em imagens de MET e MEV. Em microscopia de luz, por meio da coloração Papanicolaou revelou certas alterações citoplasmáticas. Essa técnica Papanicolaou é amplamente utilizada em laboratórios de citopatologia para diagnósticos e identificação de malignidade em células do colo uterino e mucosas em geral, consistindo em uma metodologia de três corantes, sendo um para o núcleo, a hematoxilina, e dois corantes citoplasmáticos, o Orange G e o AE-36, obtendo-se um resultado policromático (ARAUJO JUNIOR, *et al.*, 2016).

Para as técnicas de morfologia por meio de microscopia de transmissão e coloração de Papanicolaou, foram utilizadas células de melanoma humano SKmel 28, como modelo celular para a verificação dos resultados inferidos pelos tratamentos, visto que, característica com certa similaridade poderiam ser obtidas nas outras linhagens celulares, portanto, como estas técnicas não são quantitativas, efeitos semelhantes poderiam ser esperados, por outro lado, em uma análise mais profunda, essas técnicas podem ser utilizadas nas outras linhagens, com a finalidade de verificar possíveis alterações específicas inerentes a cada um dos tipos celulares aqui estudados.

Na coloração de Papanicolaou em células de melanoma humano SKmel-28, no grupo controle, revelou figuras de divisão celular em diferentes fases mitóticas, também revelou na figura “F” do grupo controle, afinidade do corante hematoxilina por estruturas ácidas, como por exemplo ácidos nucleicos como DNA no núcleo (cromatina e heterocromatina) e RNA no citoplasma, onde, nessa figura, evidenciado por uma chave, observa-se uma coloração mais escura em relação ao restante do citoplasma, sugerindo, possível atividade do retículo endoplasmático rugoso, podendo ser observado também nessa imagem, na porção mais apical da membrana plasmática, uma certa fragmentação do contorno celular, podendo estar associada à essa suposta atividade de síntese dessa região, essa questão será discutida nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

As células de melanoma humano SKmel-28 tratadas com o extrato ArC na concentração de 1,2 mM por um período de 24 horas, valor esse, obtido nos

ensaios para avaliar citotoxicidade, conforme tabela 8, apresentaram alterações morfológicas inerentes a danos celulares, sugerindo processos de morte celular, algumas estruturas ácidas com afinidade à hematoxilina foram evidenciadas na figura 139 “B”, sugerindo núcleo multilobulado. Aparentemente, diante das imagens de MET e pela coloração Papanicolaou, no tratamento com SC-1640, houve alteração da membrana plasmática, tanto na microscopia de varredura como na de transmissão, o mesmo não foi observado com o tratamento com a dacarbazina.

Nas imagens obtidas pela técnica de microscopia confocal a laser, com marcador MitoRed, foi observado alterações na dispersão das mitocôndrias frente ao tratamento com SC-1640 ou ArC como descrito na prancha, com aparente perda de resolução, demonstrando um delineamento difuso, características semelhantes foram observadas em melanoma murino B16F10 e no tratamento com a dacarbazina, as alterações morfológicas nucleares foram mais evidentes, tanto em melanoma humano SKmel-28, como em melanoma murino B16F10. Os tratamentos com as formulações lipossomais de DODAC, apresentaram alterações morfológicas no contorno citoplasmático, aparentemente, efetuado pelo rompimento da membrana tanto em B16F10, como em células de melanoma humano SKmel-28.

Nas análises por microscopia de varredura em células tratadas com a formulação lipossomal do CS-1640, em melanoma murino B16F10, observa-se estruturas aderidas à superfície celular, com grandes possibilidades de serem os lipossomas, visto que o grupo controle não apresenta tais estruturas, onde, observa-se células em apoptose e alterações citoplasmáticas. Já nas células de melanoma humano SKmel-28, foi observado no grupo controle, a característica dessas células em produzir uma quantidade elevada de microvesículas, provavelmente, vesículas de exocitose, como também verificado nas imagens de microscopia de transmissão, dificultando a distinção entre vesículas de exocitose e lipossomas, porém, em imagens de maiores aumentos, observa-se uma diferença dimensional entre essas estruturas. Um fato a ser comentado, é que o revestimento celular ficou comprometido, expondo estruturas internas, semelhantes ao exoesqueleto. Para confirmação da natureza dessas estruturas vesiculares, sugere-se a aplicação de outras técnicas como marcadores específicos.

No ensaio de migração celular, observou-se que o tratamento com o SC-1640, promoveu um crescimento de fibroblatos de origem humana FN1 como nos de origem murino L929, por outro lado, em células tumorais murino B16F10 e de origem humana SKmel-28, houve uma diminuição no volume celular, observado nas células que migraram para a área da ferida, e quantificadas pelo programa *Image J*. Já no tratamento com a dacarbazina, as células não migraram para a área da ferida, mas também não se destacaram do fundo da placa, o mesmo ocorreu com o quimioterápico paclitaxel, característica semelhante para os fibroblastos e para as células de melanoma. Pelo motivo dos tratamentos com dacarbazina e com paclitaxel, não terem promovido a migração celular, as células ficaram como se estivessem estáticas, não foi possível quantificar as células no *Image J*.

Nos tratamentos lipossomais utilizados, com DODAC/ArC em três concentrações diferentes do extrato, e com o DODAC vazio, foi observado que as células não migraram para a área da ferida, além dessa característica, as células se destacaram do fundo da placa, após 24 horas de tratamento, perdendo assim, o delineamento da ferida no momento da obtenção da imagem em 48 horas de exposição, provavelmente pela perda das estruturas de ancoragem, demonstradas nas imagens de microscopia eletrônica de varredura figuras 142 e 144. Essa característica observada nos tratamentos lipossomais, foi um motivo pelo qual, dificultou a obtenção de imagem no campo da ferida, por conter células soltas.

O estudo da combinação entre os fármacos e os compostos utilizados no presente trabalho foi feito através do programa *Synergy Finder 2.0*, pelo método estatístico *Bliss*, que é um modelo independente de análise estatística da combinação entre drogas. Dependendo das doses, as combinações podem produzir atividade sinérgica, ou independente ou antagônica. O objetivo dessa análise, é verificar possíveis associações entre drogas, possibilitando a diminuição de doses de certos fármacos, atenuando efeitos de intolerância nos pacientes (IANEVSKI, *et al.*, 2020).

Foi observado nesse ensaio, que houve efeito sinérgico forte entre as a combinação do quimioterápico dacarbazina com o monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F, nos fibroblasto de origem humana FN1, e o mesmo ocorreu na associação entre dacarbazina e ArC, por outro lado, na linhagem de melanoma humano

SKmel-28, o quimioterápico dacarbazina associado ao monofosfoéster 2AEH<sub>2</sub>F, produziu um efeito aditivo, o que significa que essa associação atua com um sinergismo maior nos fibroblastos do que nas células de melanoma de origem humana.

Na linhagem murino a mesma associação, entre dacarbazina e 2AEH<sub>2</sub>F, produziu um efeito sinérgico moderado nos fibroblastos FN1 e um efeito antagônico na linhagem de melanoma B16F10, a mesma situação foi verificada na associação do quimioterápico dacarbazina com o flavonóide ArC, que produziu um efeito sinérgico moderado nos fibroblastos L929 e um efeito antagônico nas células de melanoma B16F10.

O ensaio de peroxidação lipídica aplicado na avaliação do efeito sinérgico entre os compostos revela o nível de espécies oxidantes produzidas frente aos tratamentos, podendo ser uma via de desencadeamento de apoptose, pela oxidação excessiva de lipídeos alterando as propriedades físicas das membranas celulares, o metabolismo das células frente aos tratamentos, tende a gerar um estresse oxidativo (GASCHLER and STOCKWELL, 2017).

A complexidade da avaliação da interação medicamentosa para tratamento de doenças complexas, como o câncer, precisa ser discutida com uma visão multidisciplinar, para avaliar as vantagens e desvantagens da utilização de modelos de análise desses efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos (ROELL, *et al.*, 2017), essas análises geram uma expectativa teórica, porém, existe uma diferença entre um efeito sinérgico e a real eficácia. Sinergia é uma métrica do grau de interação medicamentosa, e a eficácia é a resposta do organismo à essa combinação (TANG, *et al.*, 2015). Outro fato a ser considerado, é que na bula do quimioterápico dacarbazina, comercializado como Fauldacar<sup>®</sup>, descreve que por meio de efeito sinérgico, a dacarbazina aumenta o risco de depressão da medula óssea, quando administrada concomitantemente com o quimioterápico paclitaxel, nesse sentido, para uma confirmação real das interações medicamentosas, outras avaliações devem ser exploradas.

## 7. CONCLUSÕES

-Extratos vegetais revelam uma extensa gama de compostos bioativos inferindo um cabedal de possibilidades na pesquisa por novos compostos na farmacologia e cosmetologia.

-O extrato de *Baccharis dracunculifolia* possui grupos de compostos com efeitos citotóxicos e citoprotetivos conferindo seletividade para as células tumorais com diferenciação favorável aos fibroblatos.

-O estudo das frações revelou que o extrato completo, possui compostos citoprotetivos e citotóxicos, e o resultado dessa complexa interação bioquímica, gerou maior citotoxicidade do que as frações isoladas, a não ser a fração 8, pela qual obteve-se valores de citotoxicidade semelhantes ao extrato completo.

-A fração 3 contempla o ácido fenilpropanóico e o esqualeno, conferindo efeito citotóxico mais significativo em relação à fração 4 que contém somente o esqualeno.

-As células de melanoma humano produzem uma infinidade de vesículas de exocitose, mesmo sob efeito dos tratamentos, propiciando possibilidades de exploração científica no aprimoramento de marcadores para diagnóstico de melanomas e entendimento dos processos de metástase e invasão tecidual.

-A formulação lipossomal na concentração de 10mM para o DODAC e 8 mM para o extrato ArC, foi a formulação ideal na preservação dos fibroblastos e diminuição da atividade em ambas linhagens tumorais estudadas.

-A formulação lipossomal na concentração de 10 mM para o DODAC e 2 mM para o extrato ArC foi a que mais preservou os fibroblastos e afetou as células de melanoma, porém, somente nas linhagens de origem humana.

-Foi observada uma diferença significativa na relação entre DODAC vazio e as às formulações lipossomais, nos resultados dos ensaios de citotoxicidade, demonstrando a efetividade da incorporação dos compostos.

-A avaliação das fases do ciclo celular revelou que o composto 2AEH<sub>2</sub>F acumula células nas fases G<sub>2</sub>/M, por outro lado, o SC1640 acumulou células em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

-Os resultados das imagens obtidas por microscopia eletrônica, revelaram que as formulações lipossomais alteram as estruturas das membranas e a morfologia celular.

-O ensaio de migração celular demonstrou citotoxicidade e perda de aderência diante dos tratamentos lipossomais.

-As imagens de microscopia confocal demonstraram alterações mitocondriais, corroborando com os resultados obtidos nos ensaios para avaliação do potencial elétrico mitocondrial, demonstrando diminuição da atividade nas células de melanoma tratadas com o extrato ArC e nas formulações lipossomais.

-Os ensaios para avaliar as expressões dos marcadores de morte celular, revelaram nas células de melanoma de origem humana e de origem murino, um aumento na expressão de Citocromo C diante do tratamento com o extrato SC1640, bem como aumento de Caspase 3, sugerindo modulação da via intrínseca de apoptose.

-A formulação lipossomal de ArC, diminuiu significativamente a expressão de Bcl-2 e aumentou caspase 3, citocromo C e fator de necrose tumoral TNF com o receptor de morte celular DR<sub>4</sub>, sugerindo ativação de duas vias de morte celular, intrínseca e extrínseca.

## 8. REFERÊNCIAS

ABUTAHA, N. Apoptotic Potential and Chemical Composition of Jordanian Propolis Extract against Different Cancer Cell Lines. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 30, n. 6, p. 893-902, 2020.

ADAM, A. Z. et al. Phytochemical composition of *Agathis borneensis* (araucariaceae) and their biological activities. *The Malaysian Forester*, v. 80, n. 2, p. 169-177, 2017.

AGA, H. et al. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.

AHN, M.-R. et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artemillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Letters*, v. 252, p. 235-243, 2007.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Research Letters*, v. 8, p. 102, 2013.

ALMENNINGEN, A. et al. The Molecular Structure of Disiloxane,  $(\text{SiH}_3)_2\text{O}$ . Acta Chem.Scand., v. 17, n. 9, 1963.

AL-SHAWI, A. A. A. et al. Investigations of Phytoconstituents, Antioxidant and Anti-Liver Cancer Activities of *Saueda monoica* Forssk Extracted by Microwave-Assisted Extraction. Asian Pac J Cancer Prev, v. 21, n. 8, p. 2349-2355, 2020.

AL-YOUSSEF, H. M.; HASSAN, W. H. B. Antimicrobial and antioxidant activities of *Parkinsonia aculeata* and chemical composition of their essential oils. Merit Res. J. Med. Med. Sci., v. 3, n. 4, p. 147-157, April, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Key Statistics for Melanoma Skin Cancer. Atlanta: American Cancer Society, 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2019. Atlanta: American Cancer Society, 2019.

AMPARO, T. R. et al. Brazilian essential oils as source for the discovery of new anti-COVID-19 drug: a review guided by in silico study. Phytochem. Ver., v. 20, p. 1013-1032, 2021.

ARAUJO JUNIOR, M. L. C. et al. Monitoramento da qualidade da coloração de Papanicolaou no Instituto Nacional de Câncer. Revista RBAC, 2016.

ASADI, M. et al. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. Biotechnol Appl Biochem., v. 69, p. 1633-1645, 2022.

BANKOVA, V. et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. International Bee Research Association, 2016.

BATISTA, C. M. et al. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. Braz. J. Pharm. Sci., v. 43, n. 2, 2007.

BATTIST, R. et al. Avaliação do perfil epidemiológico e da mortalidade dos pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo primário no município de Florianópolis - SC, Brasil. An. Bras. Dermatol., v. 84, n. 4, p. 335-342, 2009.

BEROVKE, L. et al. Molecular Imaging of Apoptosis: The Case of Caspase-3 Radiotracers. Mol. Sci., v. 22, p. 3948, 2021.

BHARATH, B.; PERINBAM, K.; DEVANESAN, S.; ALSALHI, M. S.; SARAVANAN, M. Evaluation of the anticancer potential of Hexadecanoic acid from brown algae *Turbinaria ornata* on HT-29 colon cancer cells. J. Mol. Struct., 1235, 130229, 2021.

BHARDWAJ, M.; SALI, V. K.; MANI, S.; VASANTHI, H. R. Neophytadiene from *Turbinaria ornata* Suppresses LPS-Induced Inflammatory Response in RAW 264.7 Macrophages and Sprague Dawley Rats. Inflammation, v. 43, p. 871-883, jun.2020.

BIRNER, P.; PRAGER, G.; STREUBEL, B. Molecular pathology of cancer: how to communicate with disease. ESMO Open, v. 1, p. e000085, 2016.



BITOUNIS, D.; FANCIULLINO, R.; ILIADIS, A.; CICCOLINI, J. Optimizing druggability through liposomal formulations: New approaches to an old concept. *IRSN Pharm.*, v.738432, 2012.

BONHOURE, A.; HENRY, L.; MORILLE, M.; AISSAOUI, N.; BELLOT, G.; STOEBNER, P.-E.; VIDAL, M. Melanotransferrin is efficiently sorted on the surface of exosomes secreted by melanoma cells. *Melanoma Res.*, v. 31, n. 4, 2021.

BOUCHEREAU, SARAH; Chaplain, Louise; Fort, Magali; Beauchet, Alain; Sidibé, Thomas; Chaplain, Marie; Gonzalez-Lara, Leire; Longvert, Christine; Blom, Astrid; Saiag, Philippe; and Funck-Brentano, Elisa. Impact of prior treatment with immune checkpoint inhibitors on dacarbazine efficacy in metastatic melanoma. *British Journal of Cancer* (2021) 125:948 – 954. 2021.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 975-999, 2015.

BRACCI, L.; SCHIAVONI, G.; SISTIGU, A.; BELARDELLI, F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death and Differentiation*, v.21, p. 15-25, 2014.

BRADYA, H. J. M.; GIL-GÓMEZ, G. Bax: The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 30, p. 647-650, 1998.

BRYAN, JEFREY C. 2,4-Bis( $\alpha,\alpha$ -dimethylbenzyl)phenol. *Organic Compounds*. v. 56, part 8, p. 1046-1047, 2000.

BUDDHANA, S.; SIVAKUMAR, R.; DHANDAPANI, N.; GANESAN, B.; ANANDAN, R. Protective effect of dietary squalene supplementation on mitochondrial function in the liver of aged rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 76, p. 349-355, 2007.

BUDEL, J. M.; RAMAN, V.; MONTEIRO, L. M.; ALMEIDA, V. P.; BOBEK, V. B.; HEIDEN, G.; TAKEDA, I. J. M.; KHAN, I. A. Foliar anatomy and microscopy of six Brazilian species of *Baccharis* (Asteraceae). *Microsc Res Tech*, v. 81, p. 832-842, 2018.

BULLON, P.; MORILLO, J. M.; RAMIREZ TORTOSA, M. C.; QUILES, J. L.; NEWMAN, H. N.; BATTINO, M. Metabolic Syndrome and Periodontitis: Is Oxidative Stress a Common Link? *J Dent Res*, v. 88, n. 6, p. 503-518, 2009.

CABRAL, L. G. S.; HESSE, H.; FREIRE, K. A.; OLIVEIRA, C. S.; PEDRON, C. N.; ALVES, M. G.; CARLSTRON, J. P.; POYET, J.-L.; OLIVEIRA JR., V. X.; MARIA, D. A. The BR2 peptide associated with 2-aminoethyl dihydrogen phosphate is a formulation with antiproliferative potential for a triple-negative breast cancer model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 153, p. 113398, 2022.

CARAVANTES-VILLATORO, L. A.; CRUZ-ESTEBAN, S.; ROJAS, J. C. Cuticular hydrocarbons of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) as influenced by

extraction method, natal host, and age. *Florida Entomologist*, v. 104, n. 4, p. 475-483, 2021.

CHAMMAS, SERGIO M.; SANTOS, JULIANA F. SANTOS; ALVES, R.C.; GIOVANINI, LUCAS A.; MARIA, DURVANEI AUGUSTO. Bioactive compounds of rosemary from the field: a review of the biological effects. *BOOK COLLECTION OF INTERNATIONAL TOPICS IN HEALTH SCIENCE- V1-2023*.

CHAN, P.; TOMLINSON, B.; LEE, C.-B.; LEE, Y.-S. Effectiveness and Safety of Low-Dose Pravastatin and Squalene, Alone and in Combination, in Elderly Patients with Hypercholesterolemia. *J Clin Pharmacol*, v. 36, n. 5, p. 422-427, 1996.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of the sesquiterpene fraction from *Annona reticulata* L. bark. *Natural Product Research*, v. 26, n. 16, p. 1515-1518, 2012.

CHEN, D.; CHEN, W.; LIU, D.; van OFWEGEN, L.; PROKSCH, P.; LIN, W. Asteriscane-Type Sesquiterpenoids from the Soft Coral *Sinularia capillosa*. *J Nat Prod*, v. 76, p. 1753-1763, 2013.

CHURRUCA, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; PORTILLO, M. P. Conjugated Linoleic Acid Isomers: Differences in Metabolism and Biological Effects. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*, v. 35, n. 1, p. 105-111, 2009.

CONCEIÇÃO, T. O.; LAVELI-SILVA, M. G.; MARIA, D. A. Phosphomonoester Phosphoethanolamine Induces Apoptosis in Human Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 7, p. 434-450, 2019.

CONCEIÇÃO, T. O.; CABRAL, L. G. S.; LAVELI-SILVA, M. G.; et al. New potential antiproliferative monophosphoester 2-aminoethyl dihydrogen phosphate in K-562 and K-562 MDR+ leukemia cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 142, p. 112054, 2021.

CZABOTAR, P. E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J. M. Control of apoptosis by the BCL2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews |Molecular Cell Biology*, v. 15, p. 49-63, 2014.

DATTA, S. R.; DUDEK, H.; TAO, X.; MASTERS, S.; FU, H.; GOTOH, Y.; GREENBERG, M. E. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*, v. 91, p. 231-241, 1997.

DAVERI, E.; VALACCHI, G.; ROMAGNOLI, R.; MAELLARO, E.; MAIOLI, E. Antiproliferative Effect of Rottlerin on Sk-Mel-28 Melanoma Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 545838, 2015.

DECATRIS M.P.; SUNDAR, S.; O'BYRNE, K.J. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *CANCER TREATMENT REVIEWS (2004)* 4, 53-81. 2004.

DEVEQUI-NUNES, D.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. A.; SILVA, J. R.; SILVA, D. F.; ROCHA, J. L. C.; BRANDÃO, H. N.; BORGES, V. M.; UMSZA-GUEZ, M. A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLOS ONE*, v. 13, n. 12, p., 2018.

DEZMIREAN, D. S.; PAȘCA, C.; MOISE, A. R.; BOBIȘ, O. Plant Sources Responsible for the Chemical Composition and Main Bioactive Properties of Poplar-Type Propolis. *Plants*, v. 10, n. 1, p. 22, 2021.

DING, J.; MATSUMIYA, T.; HAYAKARI, R.; SHIBA, Y.; KAWAGUCHI, S.; SEYA, K.; UENO, K.; IMAIZUMI, T. Daily Brazilian green propolis intake elevates blood artemisinin levels in humans. *J Sci Food Agric*, v. 102, n. 2, p. 714-719, 2021.

DU, Y.-H.; LI, J.-L.; JIA, R.-Y.; YIN, Z.-Q.; LI, X.-T.; LV, C.; YE, G.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.-Q. Acaricidal activity of four fractions and octadecanoic acid-tetrahydrofuran-3,4-diyl ester isolated from chloroform extracts of neem (*Azadirachta indica*) oil against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* larvae in vitro. *Veterinary Parasitology*, v. 163, p. 175-178, 2009.

DUDKO, H. V.; URBAN, V. A.; DAVIDOVSKII, A. I.; VERESOV, V. G. Structure-based modeling of turnover of Bcl-2 family proteins bound to voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2): Implications for the mechanisms of proapoptotic activation of Bak and Bax in vivo. *Computational Biology and Chemistry*, v. 85, p. 107203, 2020.

EROL, E.; ORHAN, M. D.; AVSAR, T.; AKDEMIR, A.; OKUDAN, E. S.; TORAMAN, G. O. A.; TOPCU, G. Anti-SARS-CoV-2 and cytotoxic activity of two marine alkaloids from green alga *Caulerpa cylindracea* Sonder in the Dardanelles. *RSC Adv.*, v. 12, p. 29983-29990, 2022.

ESSERS, J.; THEIL, A. F.; BALDEYRON, C.; et al. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Molecular and Cellular Biology*, v. 25, n. 21, p. 9350-9359, 2005.

FLAHERTY, K. T.; PUZANOV, I.; KIM, K. B.; RIBAS, A.; McARTHUR, G. A.; SOSMAN, J. A.; O'DWYER, P. J.; LEE, R. J.; GRIPPO, J. F.; NOLOP, K.; CHAPMAN, P. B. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, v. 363, n. 9, p. 809-819, 2010.

GARCIA-BERMUDEZ, J.; BAUDRIER, L.; BAYRAKTAR, E. C.; SHEN, Y.; LA, K.; GUARECUCO, R.; YUCEL, B.; FIORE, D.; TAVORA, B.; FREINKMAN, E.; CHAN, S.H.; LEWIS, C.; MIN, W.; INGHIRAMI, G.; SABATINI, D. M.; BIRSOY, K. Squalene accumulation in cholesterol auxotrophic lymphomas prevents oxidative cell death. *Nature*, v. 567, n. 7746, p. 118-122, 2019.

GASCHER, MICHAEL M.; STOCKELL, BRENT R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 482, p. 419-425, 2017.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GRÄNISHER, FRANÇOIS, CHRISTEN, PHILIPPE and KAPETANIDIS, ILIAS.

Essential oils from normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var. *Sanbucifolia*. *Phytochemistry*, v. 40, n. 5, p. 1421 – 1424, 1995.

GOLDSTEIN, A. M.; CHAN, M.; HARLAND, M.; GILLANDERS, E. M.; HAYWARD, N. K.; AVRIL, M.-F.; AZIZI, E.; BIANCHI-SCARRA, G.; BISHOP, D. T.; BRESSAC-DE PAILLERETS, B.; BRUNO, W.; CALISTA, D.; CANNON ALBRIGHT, L. A.; DEMENAIS, F.; ELDER, D. E.; GHIORZO, P.; GRUIS, N. A.; HANSSON, J.; HOGG, D.; HOLLAND, E. A.; KANETSKY, P. A.; KEFFORD, R. F.; LANDI, M. T.; LANG, J.; LEACHMAN, S. A.; MACKIE, R. M.; MAGNUSSON, V.; MANN, G.; NIENDORF, K.; NEWTON BISHOP, J.; PALMER, J. M.; PUIG, S.; PUIG-BUTILLE, J. A.; SNOO, F. A. DE; STARK, M.; TSAO, H.; TUCKER, M. A.; WHITAKER, L.; YAKOBSON, E.; The Lund Melanoma Study Group; Melanoma Genetics Consortium. *Cancer Res*, v. 66, n. 20, p., 2006.

GUMGUMJEE, NEHAD M.; HAJAR, ABDULRAHAMAN S. Antibacterial Activities And GC- MS Analysis of Phytocomponents of *Ehretia abyssinica* R.BR. Ex Fresen. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, v. 6, n. 2, p. 236-241, 2015.

HANAHAN, DOUGLAS; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, p. 646-674, 2011.

HAVEI, RICHARD A.; FERRIER, DENISE R. *Bioquímica Ilustrada*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HEIDEN, GUSTAVO; BAUMGRATZ, JOSÉ FERNANDO ANDRADE; ESTEVES, ROBERTO LOURENÇO. *Baccharis* subgen. *Molina* (Asteraceae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Baccharis* subgen. *Molina* (Asteraceae) in Rio de Janeiro state, Southeast Brazil. *Rodriguésia*, v. 63, n. 3, p. 649-687, 2012.

HU, JIAHAO *et al.* Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *J Hematol Oncol*, v. 14, p. 157, 2021.

HUANG, Y. *et al.* Multifunctional Liposome Nanocarriers Combining Upconverting Nanoparticles and Anticancer Drugs. *J Phys Chem B*, v. 120, n. 22, p. 4992-5001, 2016.

HUANG, KUAN-WEI *et al.* Highly efficient and tumor-selective nanoparticles for dual-targeted immunogene therapy against cancer. *Sci. Adv.*, v. 6, p. Eaax 5032, 2020.

IANEVSKI, ALAEKSANDER; GIRL, ANIL K.; AITOKALLIO, TERO. Synergy Finder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. *Nucleic Acids Research*, v. 48, 2020.

IBRAHIM, NURUL 'IZZAH; MOHAMED, ISA NAINA. Interdependence of Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Squalene—Implication for Cardiovascular Health. *Life*, v. 11, p. 103, 2021.

IGWE, Okenwa U.; ABII, T. Characterization of Bioactive Sesquiterpenes, Organic Acids and Their Derivatives from the Leaves of *Psidium guajava* Linn. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry*, v. 4, n. 4, p. 456-467, 2014.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. [homepage] Câncer de pele melanoma. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: data de acesso.

ISHIBASHI, OSAMU *et al.* Semipinacol rearrangement of a bicyclo[7.2.0] undecane framework into a bicyclo[6.3.0]undecane skeleton: a model study on the biosynthesis of seiridiasteriscane A. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 85, n. 7, p. 1621- 1627, 2021.

JAISWAL, RISHI KUMAR *et al.* Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 98, p. 886-898, 2018.

JENKINS, B.; WEST, J. A.; KOULMAN, A. A Review of Odd-Chain Fatty Acid Metabolism and the Role of Pentadecanoic Acid (C15:0) and Heptadecanoic Acid (C17:0) in Health and Disease. *Molecules*, v. 20, p. 2425-2444, 2015.

JOHNSON, T. O.; ADEGBOYEGA, A. E.; JOHNSON, G. I.; UMEDUM, N. L.; BAMIDELE, O. D.; ELEKAN, A. O.; TARKAA, C. T.; MAHE, A.; ABDULRAHMAN, A.; ADEYEMI, O. E.; OKAFOR, D.; YUSUF, A. J.; ATEWOLARA-ODULE, O. C.; OGUNMOYE, A. O.; ISHAYA, T. Uncovering the inhibitory potentials of *Phyllanthus nivosus* leaf and its bioactive compounds against Plasmodium lactate dehydrogenase for malaria therapy. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 04, 2022.

JUDZENTIENE, A.; BUDIENE, J.; SVEDIENE, J.; GARJONYTE, R. Toxic, Radical Scavenging, and Antifungal Activity of *Rhododendron tomentosum* H. Essential Oils. *Molecules*, v. 25, p. 1676, 2020.

KALPAGE, H. A.; BAZYLIANSKA, V.; RECANATI, M. A.; FITE, A.; LIU, J.; WAN, J.; MANTENA, N.; MALEK, M. H.; PODGORSKI, I.; HEATH, E. I.; VAISHNAV, A.; EDWARDS, B. F.; GROSSMAN, L. I.; SANDERSON, T. H.; LEE, I.; HÜTTEMANN, M. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. *FASEB Journal*, v. 33, February 2019.

KALPAGE, H. A.; WAN, J.; MORSEA, P. T.; ZUREK, M. P.; TURNER, A. A.; KHOBEIR, A.; YAZDIA, N.; HAKIM, L.; LIU, J.; VAISHNAV, A.; SANDERSON, T. H.; RECANATI, M. A.; GROSSMAN, L. I.; LEE, I.; EDWARDS, B. F. P.; HÜTTEMANN, M. Cytochrome c phosphorylation: Control of mitochondrial electron transport chain flux and apoptosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 121, 105704, 2020.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 27, p. 137-138, 1965.

KELLEY, R. F.; TOTPAL, K.; LINDSTROM, S. H.; MATHIEU, M.; BILLECI, K.; DEFORGE, L.; PAI, R.; HYMOWITZ, S. G.; ASHKENAZI, A. Receptor-selective Mutants of Apoptosis-inducing Ligand 2/Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Reveal a Greater Contribution of Death Receptor (DR) 5 than DR4 to

Apoptosis Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 3, p. 2205–2212, 2005.

KHAW, K. Y.; PARAT, M.-O.; SHAW, P. N. I. D.; FALCONER, J. R. Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review. *Molecules*, v. 22, p. 1186, 2017.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M.; AGA, M.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.; KURIMOTO, M.; MITO, K. Apoptosis and Suppression of Tumor Growth by Artepillin C Extracted from Brazilian Propolis. *Cancer Detection & Prevention*, v. 22, no. 6, p. 506-515, 1998.

KO, G.-A.; KANG, H. R.; MOON, J. Y.; EDIRIWEERA, M. K.; EUM, S.; BACH, T. T.; CHO, S. K. *Annona squamosa* L. leaves inhibit alpha-melanocystimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) stimulated melanogenesis via p38 signaling pathway in B16F10 melanoma cells. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 00, p. 1–8, 2019.

KORPINEN, R. I.; VÄLIMAA, A.-L.; LIIMATAINEN, J.; KUNNAS, S. Essential Oils and Supercritical CO<sub>2</sub> Extracts of Arctic Angelica (*Angelica archangelica* L.), Marsh Labrador Tea (*Rhododendron tomentosum*), and Common Tansy (*Tanacetum vulgare*)—Chemical Compositions and Antimicrobial Activities. *Molecules*, v. 26, p. 7121, 2021.

KOWAL, J.; ARRAS, G.; COLOMBO, M.; JOUVE, M.; MORATH, J. P.; PRIMDAL-BENGTSON, B.; DINGLI, F.; LOEW, D.; TKACH, M.; THÉRY, C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *PNAS*, published online February 8, 2016.

KUROPATNICKI, A. K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 964149, 11 pages, 2013.

LAVELI DA SILVA, Manuela Garcia et al. 2-aminoethyl Dihydrogen Phosphate as a Modulator of Proliferative and Apoptotic Effects in Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 9, p. 83-97, 2021.

LEE, Ying-Nong et al. Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extractions. *Separation and Purification Technology*, v. 54, p. 130-138, 2007.

LI, Feng et al. Cytotoxicity of constituents from mexican propolis against a panel of six different cancer cell lines. *Natural Product Communications*, vol. 5, no. 10, 2010.  
LI, Xiaomao et al. The Aerial Parts of *Bupleurum Chinense* DC. Aromatic Oil Attenuate Kainic Acid-Induced Epilepsy-Like Behavior and Its Potential Mechanisms. *BioMed Research International*, vol. 2022, Article ID 1234612, 2022.

LIU, G.; HOU, S.; TONG, P.; LI, J. Liposomes: Preparation, Characteristics, and Application Strategies in Analytical Chemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, Taylor & Francis Group, 2020.

LORENZI, Harri. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. 4<sup>a</sup> ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LOZANO-GRANDE, M. Azalia et al. Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene. *International Journal of Agronomy*, vol. 2018, Article ID 1829160, 2018.

LUNA, Arthur Cássio de Lima et al. Potential antitumor activity of novel DODAC/PHO-Sliposomes. *International Journal of Nanomedicine*, vol. 11, p. 1-15, 2016.

MA, C.; ARMSTRONG, A. W. Severe adverse events from the treatment of advanced melanoma: a systematic review of severe side effects associated with ipilimumab, vemurafenib, interferon alfa-2b, dacarbazine, and interleukin-2. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 25, n. 5, p. 401-408, 2014.

MACHADO, Bruna Aparecida Souza et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS ONE*, vol. 11, no. 1, e0145954, 2016.

MANJIMA, Ragesh Babu et al. Spathulenol attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene Reports*, vol. 25, 101396, 2021.

MAO, Jun J. et al. Integrative oncology: Addressing the global challenges of cancer prevention and treatment. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 72, p. 144-164, 2022.

MARCUCCI, Maria Cristina et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, p. 105-112, 2001.

MARTYASARI, N. W. R. et al. The effect of extraction solvent polarity on cytotoxic properties of *Sargassum crassifolium* against B16-F10 melanoma cancer cell model. *Earth and Environmental Science*, vol. 913, 012105, 2021.

MATSUDA, Adriana Hitomi; ALMEIDA-MURADIAN, Ligia Bicudo de. Validated Method for the Quantification of Artepillin-C in Brazilian Propolis. *Phytochem. Anal.*, v. 19, p. 179-183, 2008.

MATTHEOLABAKIS, G.; RIGAS, B.; CONSTANTINIDES, PP. Nanodelivery strategies in cancer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives. *Nanomedicine*, v. 7, n. 10, p. 15-77, 2012.

MENDONÇA, Izabel Cristina Gomes de et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 15, p. 357, 2015.

MKHIZE, Senzosenkosi Surprise et al. Bioprospecting the Biological Effects of Cultivating *Pleurotus ostreatus* Mushrooms from Selected Agro-Wastes and Maize Flour Supplements. *Journal of Food Biochemistry*, v. 2023, Article ID 2762972, 16 pages, 2023.

- MORAIS, Samara de Macêdo et al. Identification of Chemical Markers of Commercial Tropical Red Wine Candidates for the São Francisco Valley Geographical Indication. *Food Analytical Methods*, v. 15, p. 1237–1255, 2022.
- MORRIS, Bruce D.; FOSTER, Stephen P.; HARRIS, Marion O. Identification of 1-Octacosanal and 6-Methoxy-2-Benzoxazolinone From Wheat as Ovipositional Stimulants for Hessian Fly, *Mayetiola destructor*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, n.4, 2000.
- MOSKWA, Justyna et al. Propolis from Poland versus propolis from New Zealand - chemical composition and antiproliferative properties on glioblastoma cell lines. *Research Square*, 2020.
- MOSKWA, Justyna et al. Polish and New Zealand Propolis as Sources of Antioxidant Compounds Inhibit Glioblastoma (T98G, LN-18) Cell Lines and Astrocytoma Cells Derived from Patient. *Antioxidants*, v. 11, p. 1305, 2022.
- MÜNSTEDT, K.; KALDER, M. Contact allergy to propolis in beekeepers. *Allergol Immunopathol(Madr)*, v. 37, n. 6, p. 298–301, 2009.
- NAQUVI, Kamran Javed et al. Volatile oil composition of *Rosa damascena* Mill. (Rosaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 2, n. 5, p. 177-181, 2014.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer types. Skin cancer (including melanoma) - patient version. Bethesda: NCI, [20--]. Available at: <https://www.cancer.gov/types/skin>. Access in: 9 Sep. 2019.
- OLIVEIRA, VIRGINIA DEI CARMEN; BASTOS, ESTHER MARGARIDA. Aspectos morfo- anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* dc. (asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis. *Acta bol. bras.*, v. 12, n. 3, p. 431-439, 1998.
- ÖZDEMİR, MERYEM DAMLA *et al.* The concurrent effect of acyclovir and rosemary on glioblastoma cell culture. *Cell Mol Biol (Noisy le Grand)*, v. 65, n. 3, 2019.
- PAILINO, Nivaldo *et al.* Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian própolis. *European Journal of Pharmacology*, v. 587, p. 296–301, 2008.
- PAN, Jing; ZHANG, Jianwei. Research Progress of PCNA in Reproductive System Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2021, ArticleID 2391917, 8 pages, 2021.
- PAULA, Julia T. *et al.* Scale-up study of supercritical fluid extraction process for *Baccharis dracunculifolia*. *J. of Supercritical Fluids*, v. 107, p. 219–225, 2016.
- PAULINO, Nivaldo *et al.* Interaction of Artepillin C with model membranes. *Eur Biophys J*, v. 46, p. 383–393, 2017.



- PAZIN, Wallance Moreira *et al.* Interaction of Artepillin C with model membranes: Effects of pH and ionic strength. *BBA - Biomembranes*, v. 1861, p. 410–417, 2019.
- PAZIN, Wallance Moreira *et al.* Identification of 1-Octacosanal and 6-Methoxy-2-Benzoxazolinone From Wheat as Ovipositional Stimulants for Hessian Fly, *Mayetiola destructor*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, n. 4, 2000.
- PAVLOVA, NN; THOMPSON, CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.*, v. 23, n. 1, p. 27-47, 2016.
- PAWLOWSKI, John; KRAFT, Andrew S. Bax-induced apoptotic cell death. *PNAS*, v. 97, n. 2, p. 529–531, 2000.
- PAWLICELLI, Rosa Chiara; WIDMANN, Christian. Squalene: friend or foe for cancers. *Wolters Kluwer Health, Inc.*, v. 30, n. 4, p. 1-8, 2019.
- PAVLOVA, NN; THOMPSON CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *CellMetab.*, v. 23, n. 1, p. 27-47, 2016. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006.
- PAWLINSKI, John; KRAFT, Andrew S. Bax-induced apoptotic cell death. *PNAS*, vol. 97, no. 2, p. 529–531, Jan. 18, 2000.
- PAZIN, Wallance Moreira *et al.* Interaction of Artepillin C with model membranes. *Eur Biophys J*, v. 46, p. 383–393, 2017.
- PAZIN, Wallance Moreira *et al.* Interaction of Artepillin C with model membranes: Effects of pH and ionic strength. *BBA - Biomembranes*, v. 1861, p. 410–417, 2019.
- PEIXOTO, Juliana Figueiredo *et al.* Epoxy-a-lapachone (2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-spiro[2H-naphtho[2,3-b]pyran-10,20-oxirane]-5(10H)-one): a promising molecule to control infections caused by protozoan parasites. *Braz J Infect Dis*, v. 27, n. 2, p. 102743, 2023.
- PIANTINO, Carla R. *et al.* Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. *J. of Supercritical Fluids*, v. 47, p. 209–214, 2008.
- QUINTANS, Jullyana de S. S. *et al.* Chemical Constituents and Anticancer Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopia laevigata*. *Planta Med*, v. 79, p. 123–130, 2013.
- RAAL, Ain; ORAV, Anne; GRETCHUSHNIKOVA, Tatjana. Composition of the essential oil of the *Rhododendron tomentosum* Harmaja from Estonia. *Natural Product Research*, 2014.
- RATHEESH, M. *et al.* Anti-inflammatory and anti-COVID19 effect of a novel polyherbal formulation (Imusil) via modulating oxidative stress, inflammatory mediators and cytokine storm. *Inflammopharmacology*, v. 30, p. 173–184, 2022.
- RAVI, Lokesh; KRISHNAN, Kannabiran. Cytotoxic Potential of N-hexadecanoic Acid Extracted from *Kigelia pinnata* Leaves. *Asian Journal of Cell Biology*, v. 12, n. 1, p. 20-27, 2017.
- REISIGE, Katrin *et al.* The C28 aldehyde octacosanal is a morphogenetically active

component involved in host plant recognition and infection structure differentiation in the wheat stem rust fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 68, p. 33-40, 2006.

REYES-BECERRIL, Martha et al. Green synthesis of gold nanoparticles using *Turneradifusa Willd* enhanced antimicrobial properties and immune response in Longfin yellowtail leukocytes. *Aquaculture Research*, v. 52, p. 3391-3402, 2021.

RHETSO, Thejanuo et al. Chemical constituents, antioxidant, and antimicrobial activity of *Allium chinense* G. Don. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 6, n. 102, 2020.

RÍOS-MARCO, Pablo et al. Antitumoral Alkylphospholipids Induce Cholesterol Efflux from the Plasma Membrane in HepG2 Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 123, n. 4, p. 567-574, 2022.

RIVERO-CRUZ, Fausto et al. Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis. *Antioxidants*, v. 9, n. 70, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox9010070>. Acesso em: 4 jul. 2023.

ROBERT, Caroline et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, v. 364, n. 26, 2011.

ROELL, KYLE R.; REIF, DAVID M.; MOTSINGER-REIF, ALISON A. Na introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Frontiers in Pharmacology*, v.8, 2017.

SALATINO, Antonio et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *eCAM*, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANADA, Masayuki et al. Killing and mutagenic actions of dacarbazine, a chemotherapeutic alkylating agent, on human and mouse cells: effects of Mgmt and Mlh1 mutations. *DNA Repair*, v. 3, p. 413-420, 2004.

SÁNCHEZ-CAMARGO, Andrea del Pilar et al. Chapter - Supercritical Fluid Extraction. In: ELSEVIER. 2014. Disponível em: <doi: 10.1016>. Acesso em: 30 jun. 2014.

SANGPAIROJ, Kant et al. Hexadecanoic acid-enriched extract of *Halymenia durvillei* induces apoptotic and autophagic death of human triple-negative breast cancer cells by upregulating ER stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 12, n. 3, p. 132-140, 2022.

SARBASSOV, Dos D.; ALI, Siraj M.; SABATINI, David M. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 17, p. 596-603, 2005.

SARITAS, YÜCEL; NILS BÜLOW; CHRISTIANE FRICKE; WILFRIED A. KÖNIG and HERMAN MUHLE. Sesquiterpene hydrocarbons in the liverwort *Dumortiera hirsuta*. *Phytochemistry*, V. 37\ n. 5 p 1019 – 1023, 1998.

SCHENELL, Danny J.; HEBERT, Daniel N. Protein Translocons: multifunctional Review Mediators of Protein Translocation across Membranes. *Cell*, v. 112, p. 491-505, 21 fev. 2003.

SCHÜRMAN, A. *et al.* p21-Activated Kinase 1 Phosphorylates the Death Agonist Bad and Protects Cells from Apoptosis. *Molecular And Cellular Biology*, v. 20, n. 10, p. 453-461, 10 jan. 2000.

SEENIVASAGAN, T. *et al.* Electroantennogram, flight orientation, and oviposition responses of *Aedes aegypti* to the oviposition pheromone n-heneicosane. *Parasitology Research*, v. 104, p. 827-833, 2009.

SFORCIN, José Maurício *et al.* *Baccharis dracunculifolia* Uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. 1. ed. São Paulo: Fundação Editora da UNESP (FEU), 2012.

SHAHINOZZAMAN, Md; BASAK, Bristy; EMRAN, Rashiduzzaman; ROZARIO, Patricia; OBANDA, Diana N. Artepillin C: A comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. *Fitoterapia*, v. 147, p. 104775, 2020.

SHEN, Zhiwen; LI, Shichao; WU, Jinhong; WANG, Faxiang; LI, Xianghong; YU, Jian; LIU, Yongle; MA, Xiayin. Effect of different oil incorporation on gelling properties, flavor and advanced glycation end-products of silver carp surimi sausages. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 16, p. 5007-5022, 2022.

SHIBULA, K.; VELAVAN, S. Determination of Phytocomponents in Methanolic Extract of *Annona muricata* Leaf Using GC-MS Technique. *IJPPR*, v. 7, n. 6, December, 2015.

SILVA-BARBOSA, Deyzi Caroline da; HOLANDA, Vanderlan Nogueira; GHOSH, Arabinda; MAIA, Rafael Trindade; SILVA, Welson Vicente da; LIMA, Vera Lucia de Menezes; SILVA, Marcia Vanusa da; CORREIA, Maria Tereza dos Santos; FIGUEIREDO, Regina Celia Bressan Queiroz de. Leishmanicidal and cytotoxic activity of essential oil from the fruit peel of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg: Molecular docking and molecular dynamics simulations of its major constituent onto *Leishmania* enzyme targets. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 40, n.23, p. 13001-13016, 2022.

SILVA, Manuela Garcia Laveli da; KNOP, Luciana Bastianelli; MARIA, Durvanei Augusto. Meclizine Chloridrate and Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin Associated with Monophosphoester Synthetic Phosphoethanolamine Modulating Proliferative Potential in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 7, p. 408-420, 2019.

SILVA, Rui P.F.F da; ROCHA-SANTOS, Teresa A.P.; DUARTE, Armando C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, v.76, p. 40-51, 2016.

SLINGERLAND, M.; GUCHELAAR, H.J.; GELDERBLUM, H. Liposomal drug

formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today*, v. 17, n. 3-4, p. 160-166, 2012.

SMITH, Theresa. Squalene: Potential chemopreventive agent. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, v. 9, n. 8, p. 1841-1848, 2000.

SNIGDHA, Shikha; SMITH, Erica D.; PRIETO, G Aleph; COTMAN, Carl W. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci Bull*, v. 28, n. 1, p. 14-24, 2012.

SONG, Chung Kil; JUNG, Suk Hyun; KIM, Dae-Duk; JEONG, Kyu-Sung; SHIN, Byung Cheol; SEONG, Hasoo. Disaccharide-modified liposomes and their in vitro intracellular uptake. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 380, p. 161-169, 2009.

SONG, Qishi; YANG, Darong; ZHANG, Guangming; YANG, Chongren. Volatiles From *Ficus hispida* and their Attractiveness To Fig Wasps. *Journal of Chemical Ecology*, v. 27, n. 10, p. 2021, 2001.

SOSMAN, Jeffrey A.; MARGOLIN, Kim A. Inside Life of Melanoma Cell Signaling, Molecular Insights, and Therapeutic Targets. *Current Oncology Reports*, v. 11, p. 405-411, 2009.

SOUZA, Raquel P.; BONFIM-MENDONÇA, Patrícia; DAMKE, Gabrielle M.Z.F.; CARVALHO, Analine R.B. de Assis; RATTI, Bianca A.; DEMBOGURSKI, Djaceli S.O.; DA-SILVA, Vânia R.S.; SILVA, Sueli O.; DA-SILVA, Denise B.; BRUSCHI, Marcos L.; MARIA-ENGLER, Silvy S.; CONSOLARO, Marcia E.L. Artepillin C induces selective oxidative stress and inhibits migration and invasion in a comprehensive panel of human cervical cancer cell lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 1750- 1760, 2018.

SWANTARA, Made Dira; RITA, Wiwik Susanah; SUARTHA, Nyoman; AGUSTINA, Kadek Karang. Anticancer activities of toxic isolate of *Xestospongia testudinaria* sponge. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916, 2019.

TAO, Yang; WANG, Deqing; HU, Yuanliang; HUANG, Yee; YU, Yun; WANG, Deyun. The Immunological Enhancement Activity of Propolis Flavonoids Liposome In Vitro and In Vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, Article ID 483513, 8 pages, 2014.

TEIXEIRA, Cristiane Cardoso Correia; CABRAL, Tatiana Pereira de Freitas; TACON, Luciana Alves; VILLARDI, Isabel Lemos; LANCHOTE, Aurea Donizete; FREITAS, Luis Alexandre Pedro de. Solid state stability of polyphenols from a plant extract after fluid bed atmospheric spray-freeze-drying. *Powder Technology*, v. 319, p. 494-504, 2017.

TEIXEIRA, Érica Weinstein et al. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *eCAM*; 2(1), p. 85–92, 2005.

TIAN, Hao; *et al.* Platinum and Taxane Based Adjuvant and Neoadjuvant Chemotherapy

in Early Triple-Negative Breast Cancer: A Narrative Review. *Frontiers in Pharmacology*. December 2021 | Volume 12 | Article 770663. 2021.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *NatureRev. Drug Disc.*, London, v. 4, p. 145-160, 2005.

TUR, Vicente et al. DR4-selective Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Variants Obtained by Structure-based Design. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 283, NO. 29, pp. 20560 –20568, July 18, 2008.

VALENCIA, Dora, *et al.* Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran própolis. *Food Chemistry* 131, p. 645–651, 2012.

VALENTE, Maria J. et al. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 49, p. 86–92, 2011.

VANITHA, V. et al. Heneicosane—A novel microbicidal bioactive alkane identified from *Plumbago zeylanica* L. *Industrial Crops & Products*, v. 154, p. 112748, 2020.

VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green própolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, v. 122, p. 911-920, 2017.

VENN-WATSON, Stephanie; LUMPKIN, Richard; DENNIS, Edward A. Efficacy of dietary odd-chain saturated fatty acid pentadecanoic acid parallels broad associated health benefits in humans: could it be essential? *Scientific Reports*, v. 10, p. 8161, 2020.

VEERASWAMY, Sharmila Devi; RAJU, Ilavarasan; MOHAN, Sumithra. Phytochemical Evaluation and Antioxidant Potential of Polyherbal Extract Mixture—an In Vitro and In Silico Study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 195, p. 672-692, 2023.

WANG, Xuemin; PROUD, Christopher G. The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis. *Union Physiol. Sci./Am. Physiol. Soc.*, v. 1548-9213, p. 8.00, 2006.

WESOŁOWSKA, Olga et al. Organosilicon Compounds, SILA-409 and SILA-421, as Doxorubicin Resistance-Reversing Agents in Human Colon Cancer Cells. *Molecules*, v.25, p. 1654, 2020.]

WESTPHAL, Dana et al. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1813, p. 521-531, 2011.

WU, Xiao-He et al. Characterization of Chinese Liquor Starter, “Daqu”, by Flavor Typewith <sup>1</sup>H NMR-Based Nontargeted Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, p. 11354- 11359, 2009.

YANG, Elizabeth et al. Bad, a Heterodimeric Partner for Bcl-x L and Bcl02, Displaces Bax and Promotes Cell Death. *Cell*, vol. 80, p. 285-291, Jan 27, 1995.

YARDLEY, Denise A. nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *Journal of*

Controlled Release, v. 170, p. 365-372, 2013.

YIN, Meng et al. GC/MS-based dynamic analysis of *Eucalyptuscamaldulensis* extract on correlation of chromatography-activity against *Oncomelaniahupensis*. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*, v. 26, n. 2, p. 141-147, 2014.

YOO, Wonbeak et al. Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid. *PLOS ONE*, December 15, 2017.

XING, H.; HWANG, K.; LU, Y. Recent developments of liposomes as nanocarriers fortheranostic applications. *Theranostics*, v. 6, n. 9, p. 1336-1352, 2016.

YEAGLE, Philip L. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *The FASEB Journal*, vol. 3, May 1989.

ZABAIYOU, Nada et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 207, p. 214–222, 2017.

ZHA, Jiping et al. Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. *Cell*, vol. 87, p. 619–628, November 15, 1996.

ZHU, J.; THOMPSON, CB. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 20, n. 7, p. 436-450, 2019.

## APÊNDICE A

Reesultados das análises de CG/MS referntes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 12.992 e13.325.

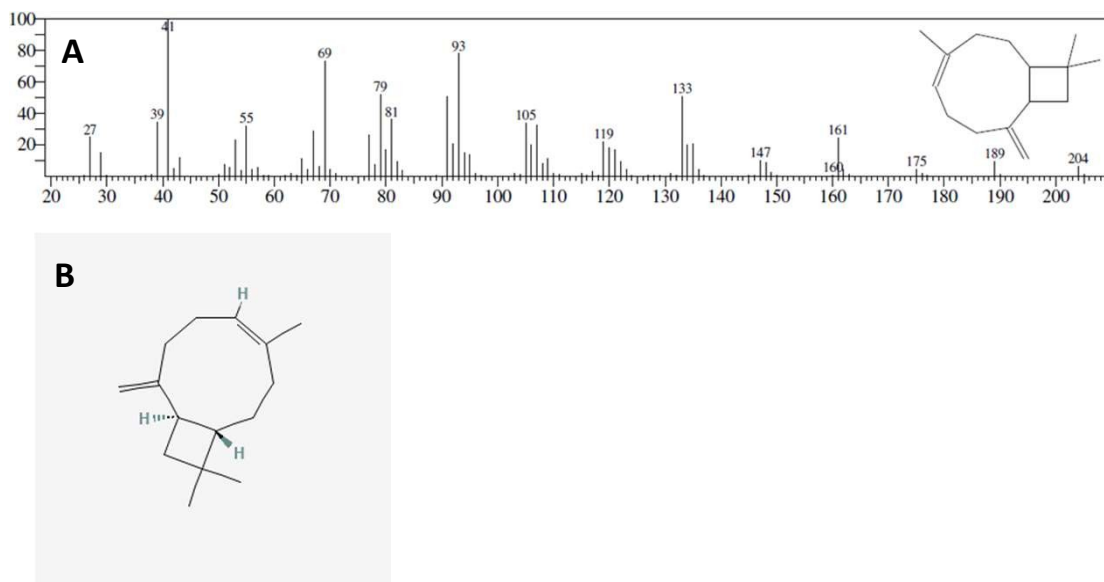


Figura 160. **A**: Tempo de retenção de 12.992-13.008; Tempo de retenção específico: 13.004; Nomenclatura: *Bicyclo[7.2.0] undec-4-ene,4,11,11-trimethyl-8-methylene*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 5452236Fórmula: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>; Peso molecular: 204; SI : 95.

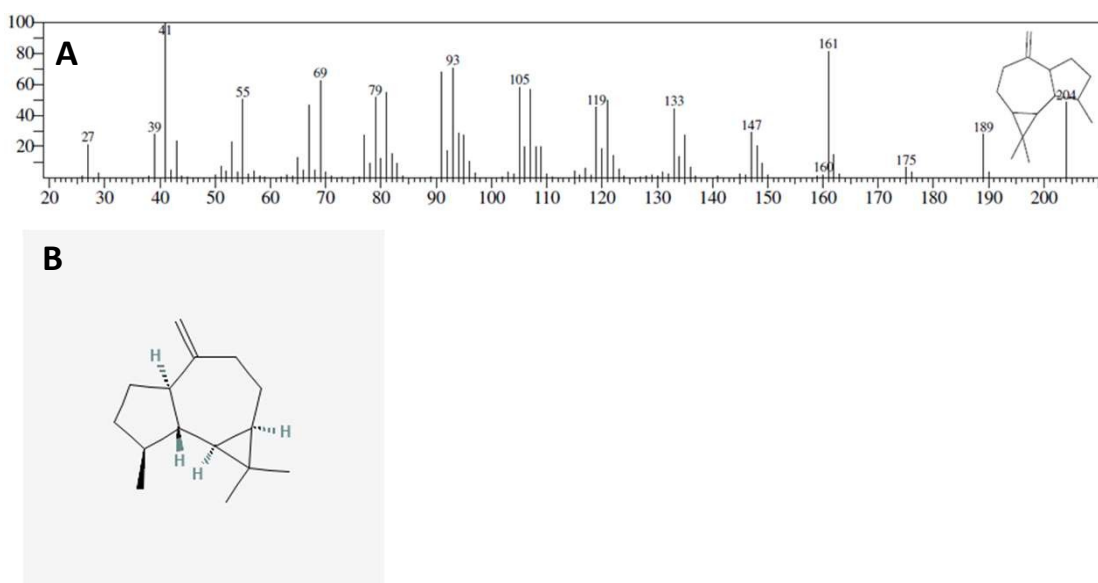


Figura 161. **A**: Tempo de retenção de 13.308-13.325; Tempo de retenção específico: 13.318;Nomenclatura: *1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 91753588; Fórmula:C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>; Peso molecular: 204; SI: 93.

Reesultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 13.858 e14.467.

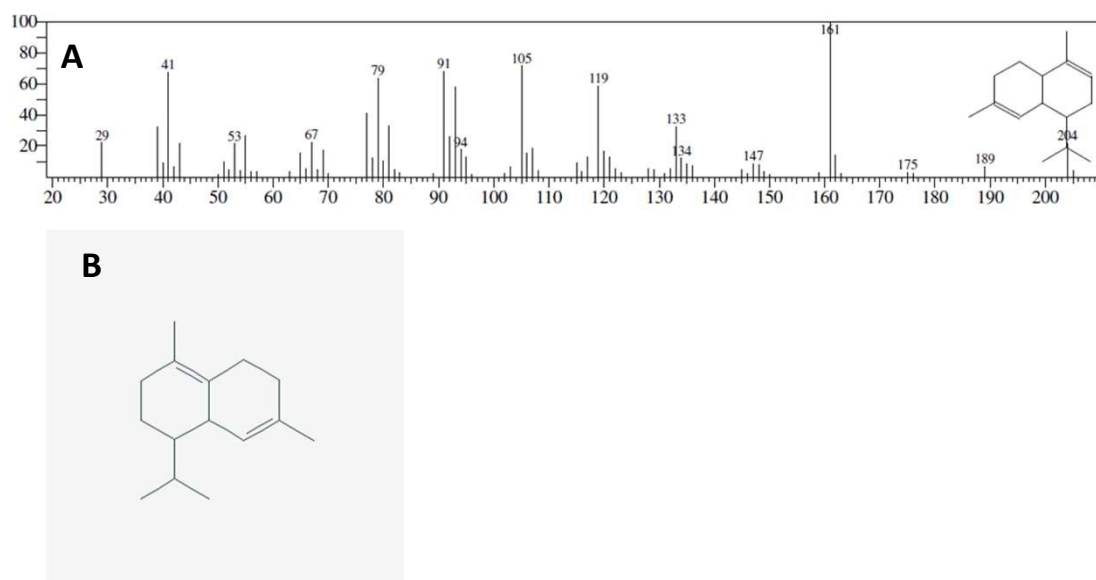


Figura 162 **A**: Tempo de retenção de 13.858-13.875; Tempo de retenção específico: 13.866; Nomenclatura: *Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-ethylethyl)* **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 101708 Fórmula: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>; Peso molecular: 204; SI: 93.

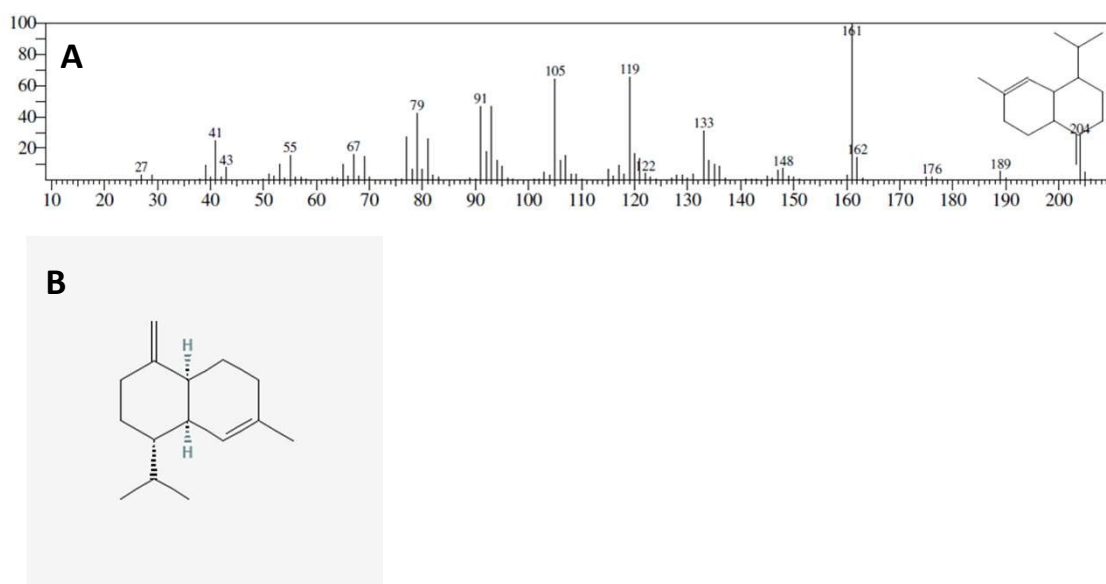


Figura 163. **A**: Tempo de retenção de 14.450-14.467; Tempo de retenção específico: 14.462; Nomenclatura: *gamma-Muurolene*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 12313020 Fórmula: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> Peso molecular: 204; SI: 94.



Reesultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 14.567 e15.142.

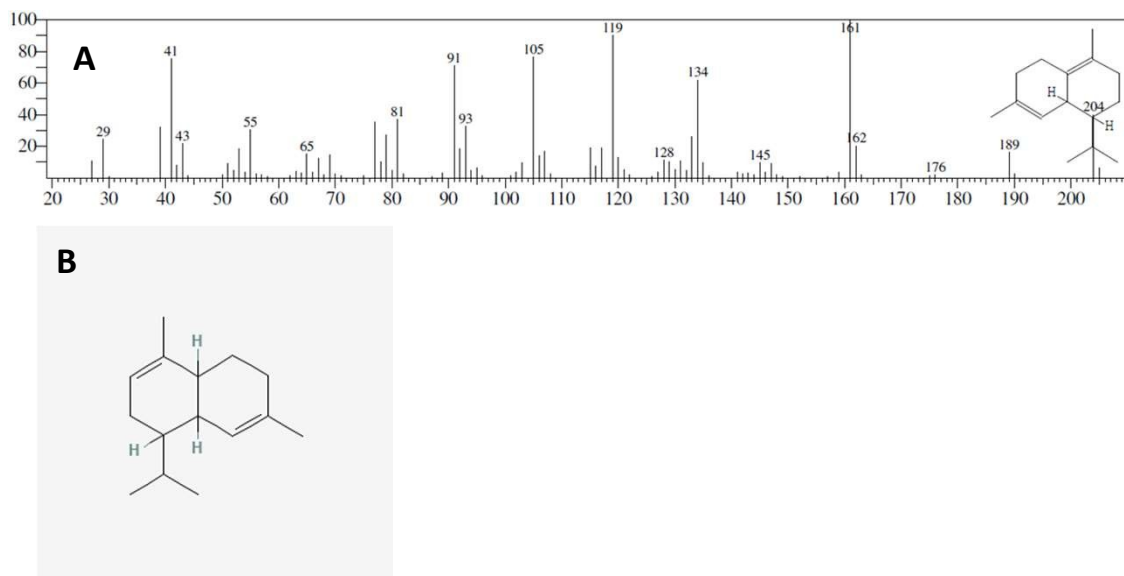


Figura 164. **A**: Tempo de retenção de 14.567-14.583; Tempo de retenção específico: 14.462; Nomenclatura: *Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)*; Tempo de retenção específico: 14.573; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 101708; Fórmula:  $C_{15}H_{24}$ ; Peso molecular: 204; SI: 90.

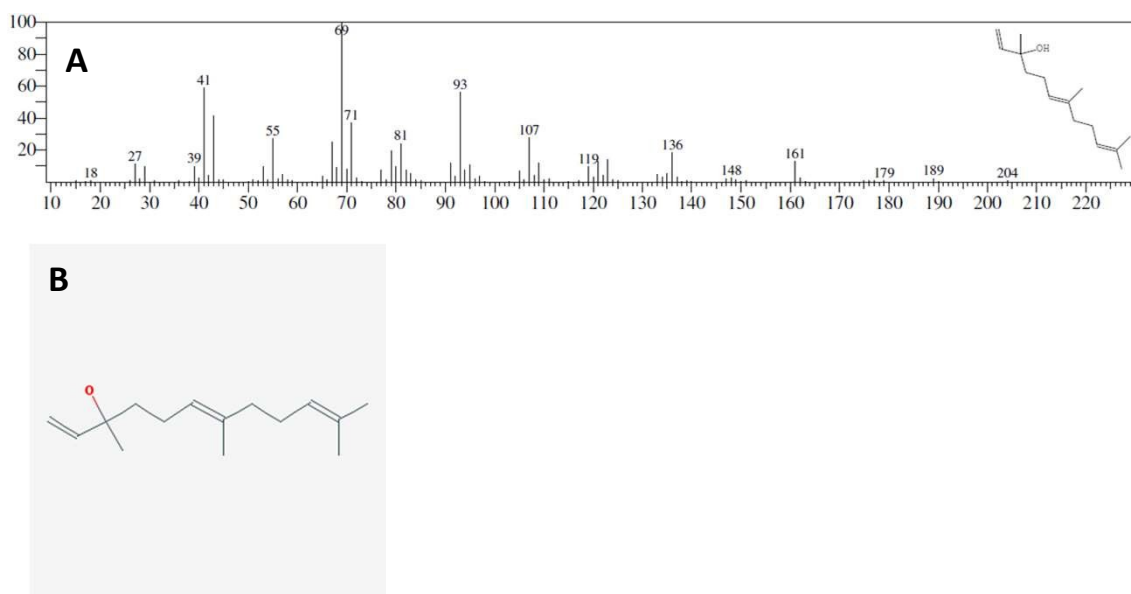


Figura. 165 **A**: Tempo de retenção de 15.125-15.142; Tempo de retenção específico: 15.132; Nomenclatura: *1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)* **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 5284507; Fórmula:  $C_{15}H_{26}O$  Peso molecular: 254; SI: 95.

Reesultados das análises de CG/MS referntes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 15.475 e15.575.

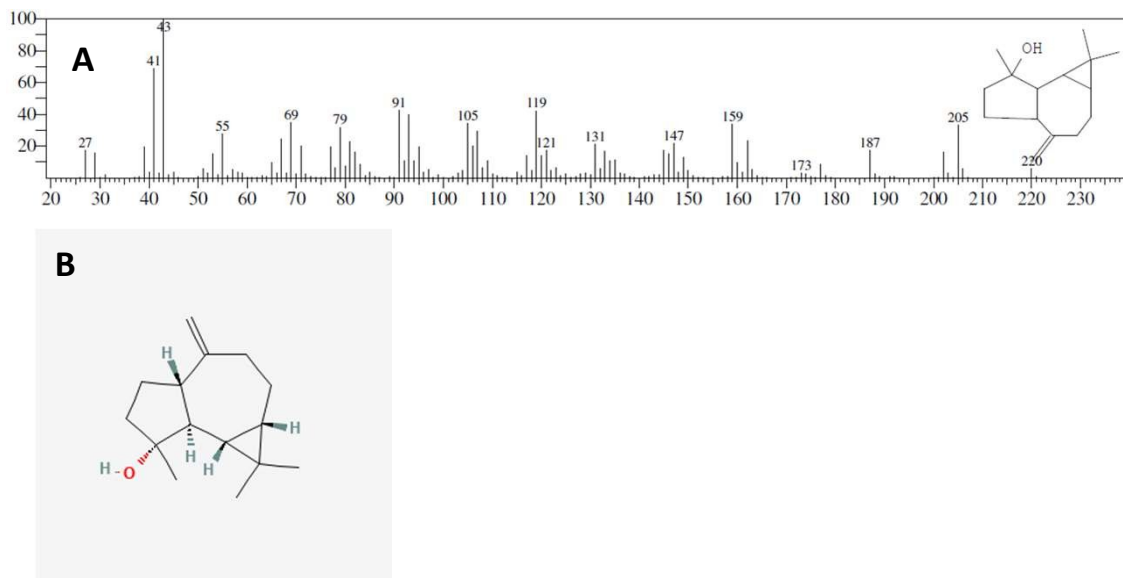


Figura 166. **A**: Tempo de retenção de 15.475-15.492; Tempo de retenção específico: 15.481; Nomenclatura: (-)-*Spathulenol*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 13854255; Fórmula: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O Peso molecular: 220; SI: 95.

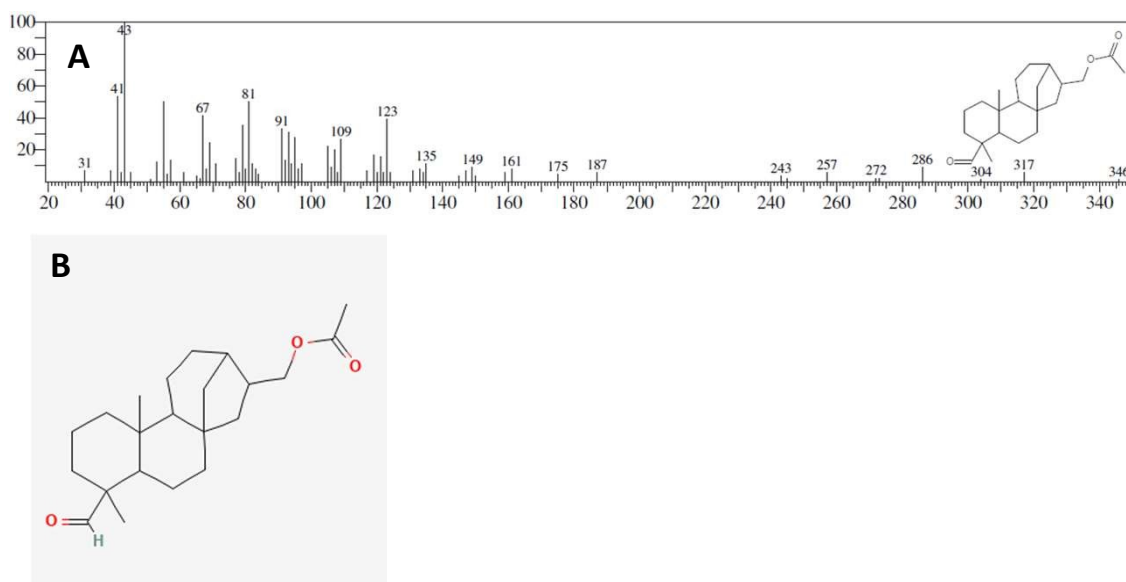


Figura 167. **A**: Tempo de retenção de 15.558-15.575; Tempo de retenção específico: 15.564; Nomenclatura: *Kauran-18-al, 17-(acetyloxy)-, (4.beta.)*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 536366; Fórmula: C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub> Peso molecular: 346; SI: 88.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 15.683 e 15.867.

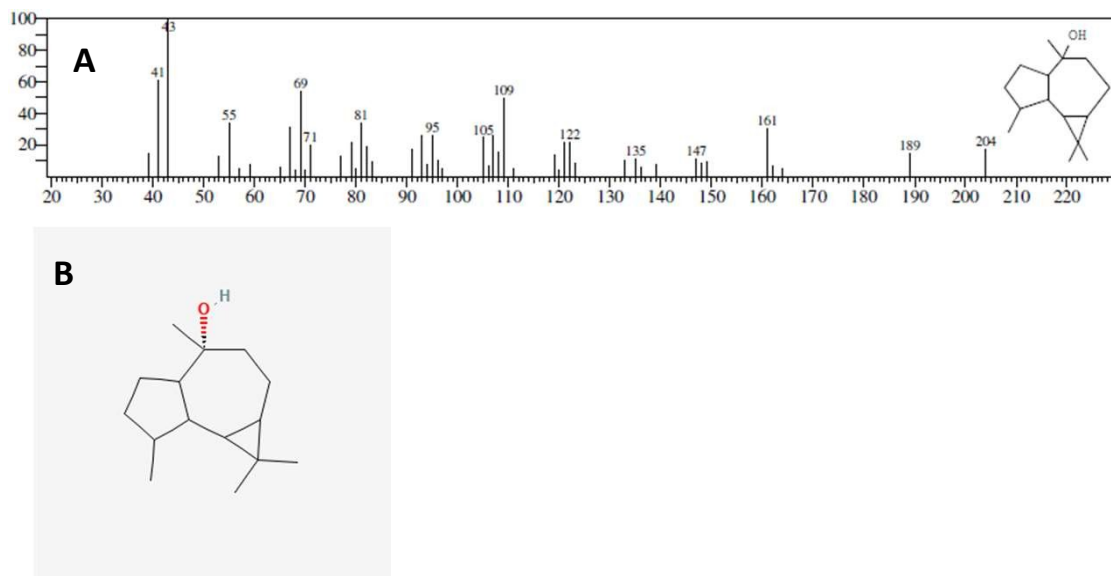


Figura 168. **A:** Tempo de retenção de 15.683-15.700; Tempo de retenção específico: 15.691; Nomenclatura: *1H-Cycloprop[e]jazulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl*; **B:** Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 6432543; Fórmula: C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O; Peso molecular: 222; SI: 95.

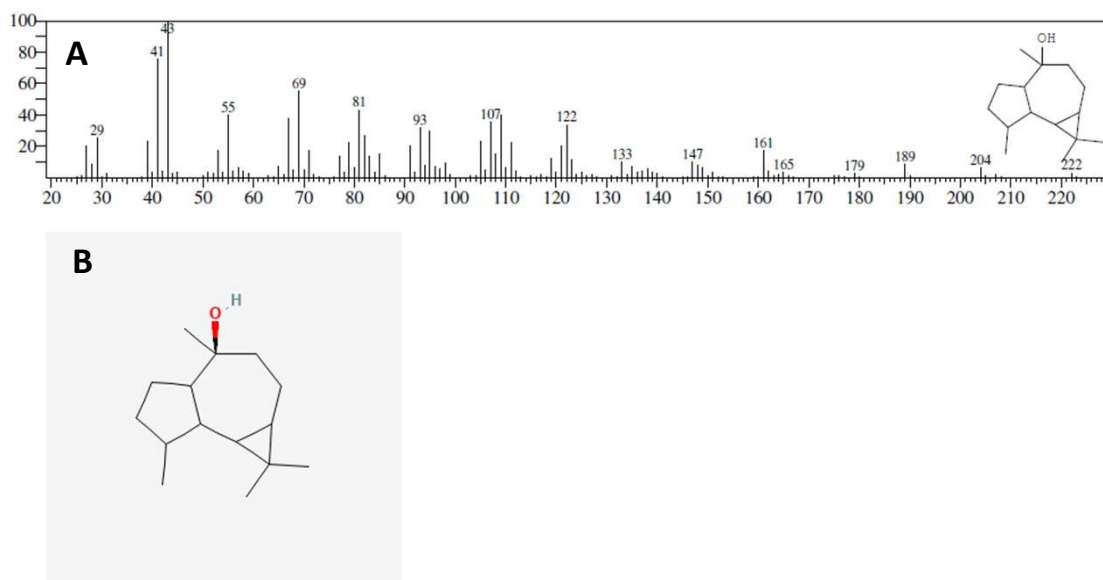


Figura 169. **A:** Tempo de retenção de 15.850-15.867; Tempo de retenção específico: 15.858; Nomenclatura: *Ledol; 1H-Cycloprop[e]jazulen-4-ol*; **B:** Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 6432561; Fórmula: C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O; Peso molecular: 222; SI: 94.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 16.475 e 16.550.

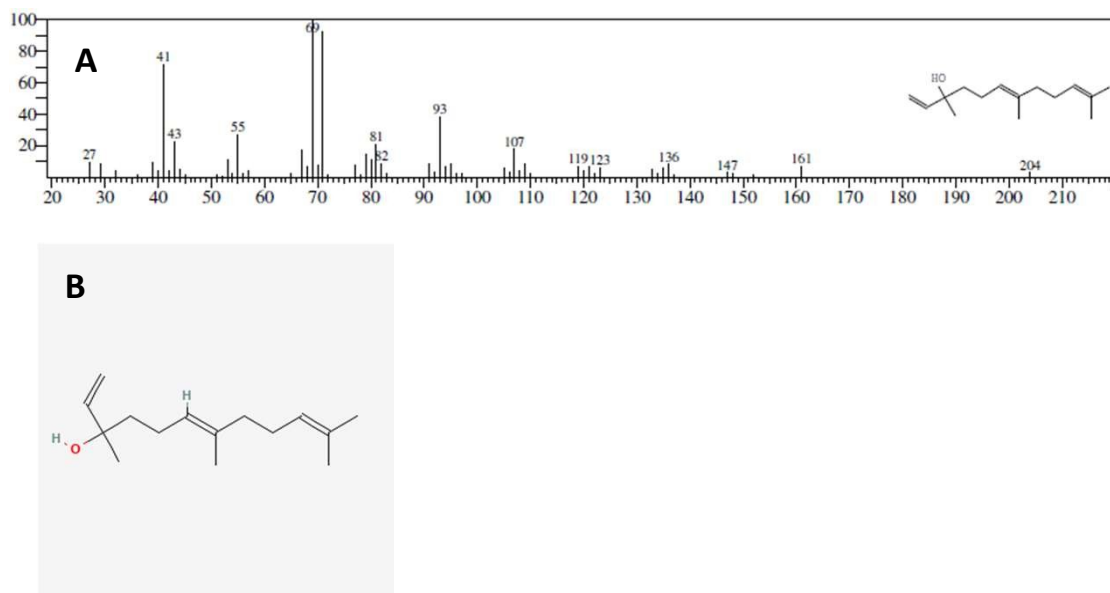


Figura 170. **A**: Tempo de retenção de 16.475-16.492; Tempo de retenção específico: 16.485; Nomenclatura: *1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-(E)*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 5284507; Fórmula:  $C_{15}H_{26}O$ ; Peso molecular: 222

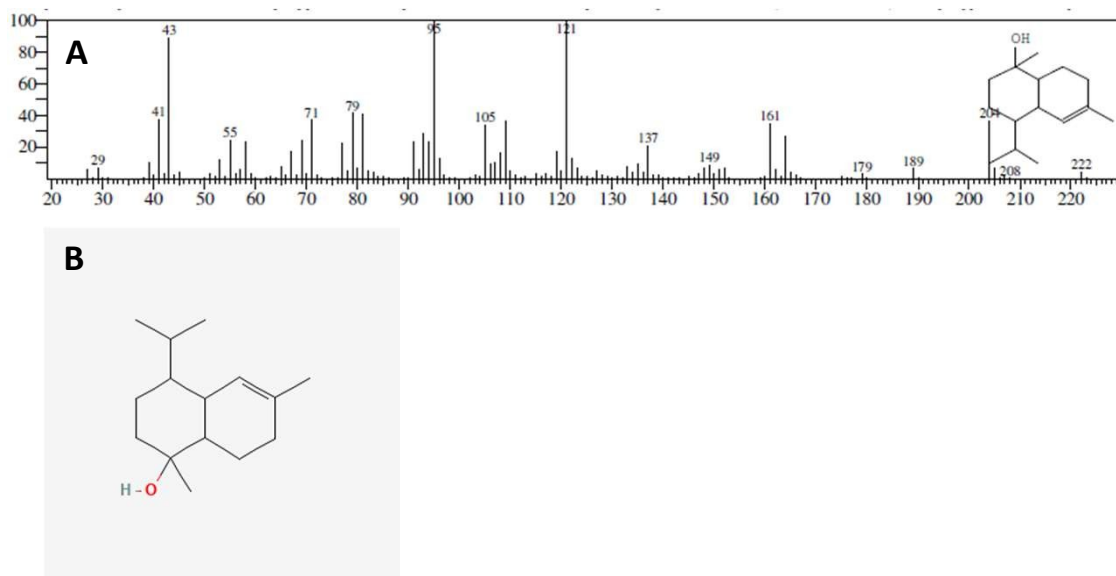


Figura 171 **A**: Tempo de retenção entre 16.533-16.550; Tempo de retenção específico: 16.544; Nomenclatura:  *$\alpha$ -Cadinol; 4-Isopropyl-1,6-dimethyl-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1-naphthalenol*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem); CID: 519662; Fórmula:  $C_{15}H_{26}O$ ; Peso molecular: 222; SI: 87.

Reesultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 16.683 e17.025.

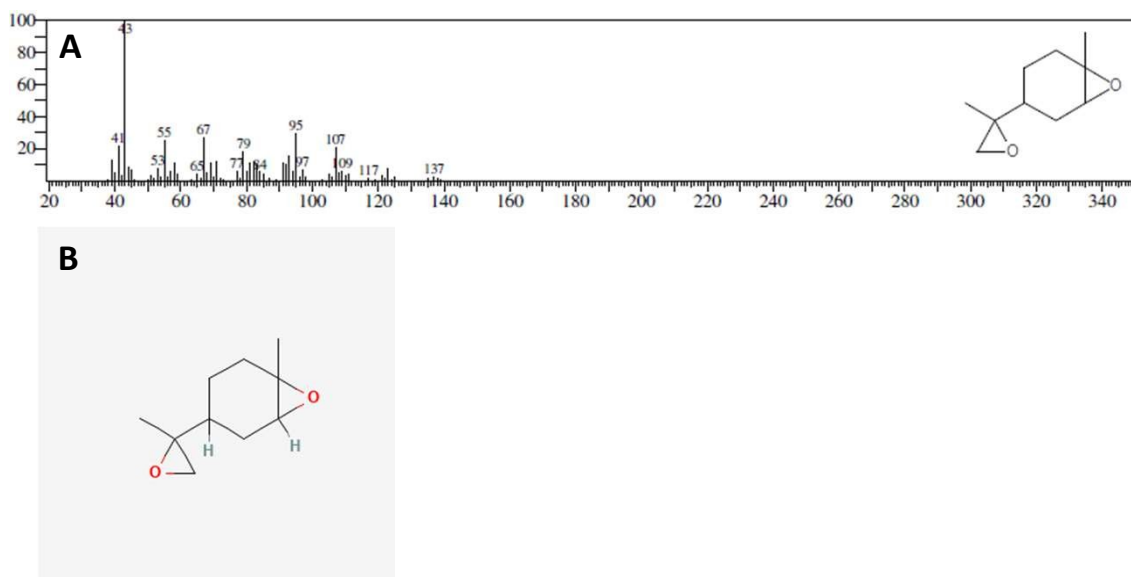


Figura 172. **A:** Tempo de retenção entre 16.683-16.700 ; Tempo de retenção específico: 16.689; Nomenclatura: *7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane, 1-methyl-4-(2-methyloxiranyl)*; **B:** Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 232703; Fórmula:  $C_{10}H_{16}O_2$ ; Peso molecular: 168; SI:83 .

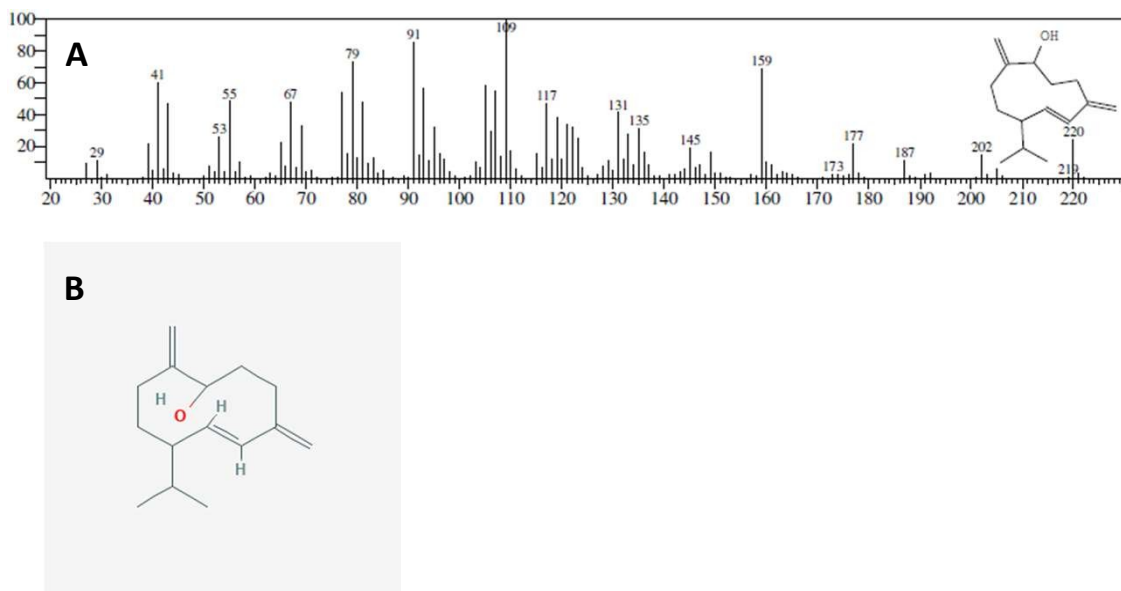


Figura 173. **A:** Tempo de retenção entre 17.008-17.025; Tempo de retenção específico: 17.013; Nomenclatura: *(1R,7S,E)-7-Isopropyl-4,10-dimethylenecyclodec-5-enol* ; **B:** Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 13304974 ; Fórmula:  $C_{15}H_{24}O$ ; Peso molecular: 220; SI: 89.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 17.358 e 17.475.

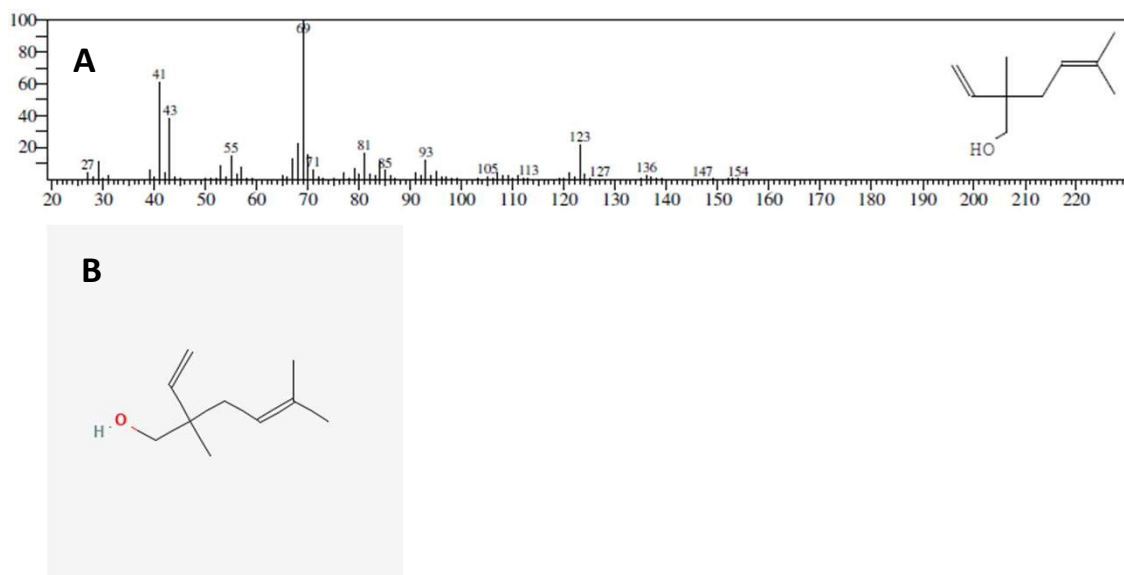


Figura 174. **A**: Tempo de retenção entre 17.358-17.375; Tempo de retenção específico: 17.366; Nomenclatura: *4-Hexen-1-ol,2-ethenyl-2,5-dimethyl*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 549543; Fórmula:  $C_{10}H_{18}O$  Peso molecular: 154; SI: 90.

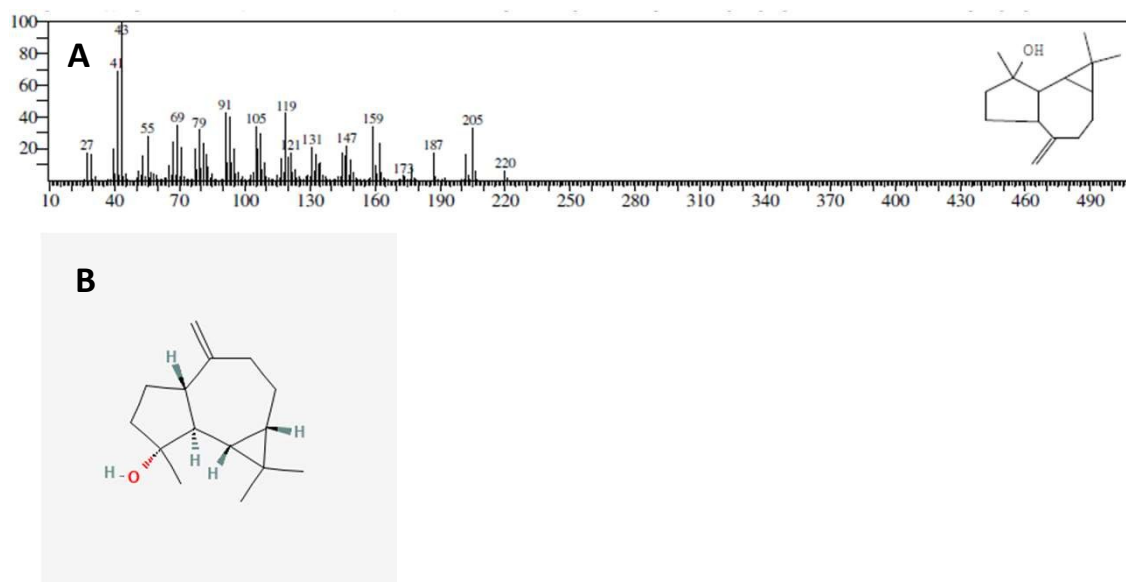


Figura 175. **A**: Tempo de retenção entre 17.458-17.475; Tempo de retenção específico: 17.467; Nomenclatura: *(-)-Spathulenol*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 13854255; Fórmula:  $C_{15}H_{24}O$ ; Peso molecular: 220; SI: 83.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 17.700 e 18.883.

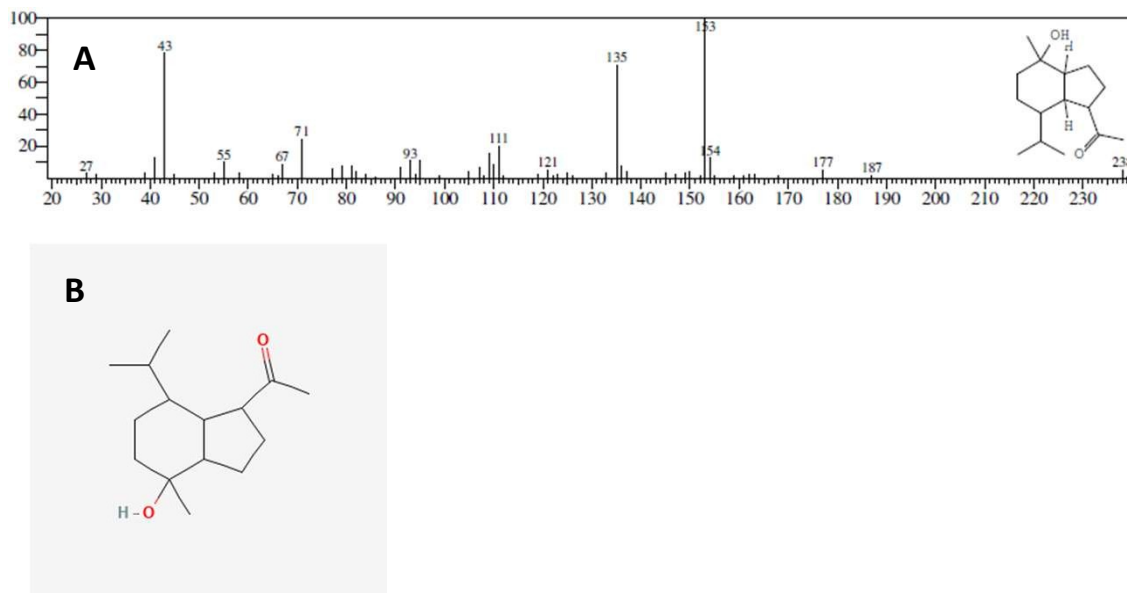


Figura 176. **A**: Tempo de retenção entre 17.700-17.717; Tempo de retenção específico: 17.710; Nomenclatura: 1-((1S, 3 a R, 4R, 7S, 7 aS)-4-Hydroxy-7-isopropyl-4-methyloctahydro; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 539857; Fórmula: C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub> Peso molecular: 238,37; SI: 83.

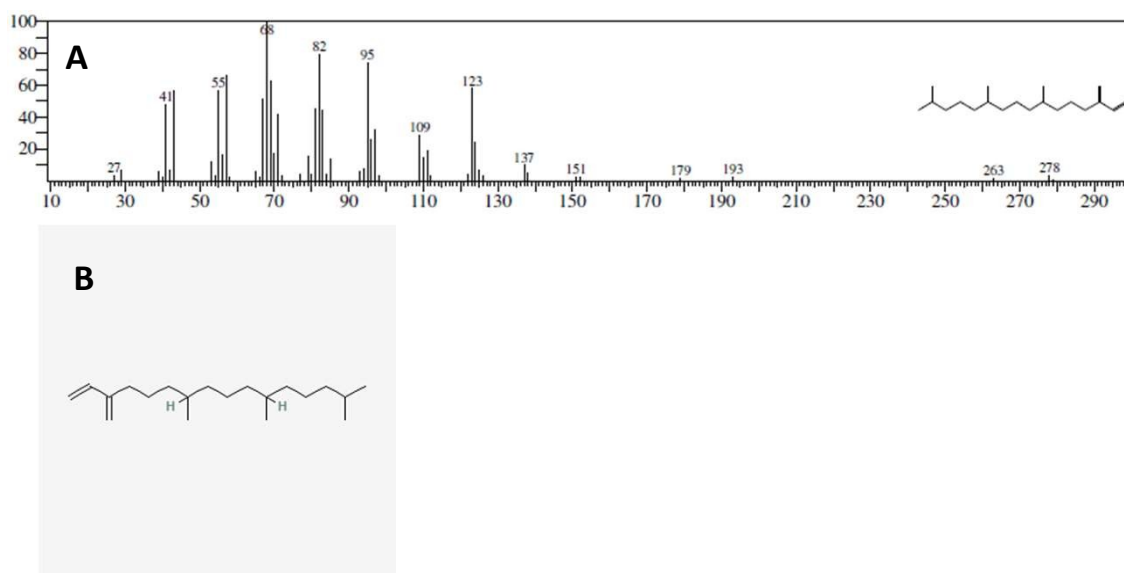


Figura 177. **A**: Tempo de retenção entre 18.867-18.883; Tempo de retenção específico: 18.875; Nomenclatura: Neophytadiene; 7,11,15-Trimethyl-3-methylenehexadec-1-ene; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 10446; Fórmula: C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>; Peso molecular: 278; SI: 92.

Reesultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 20.400 e 22.217.

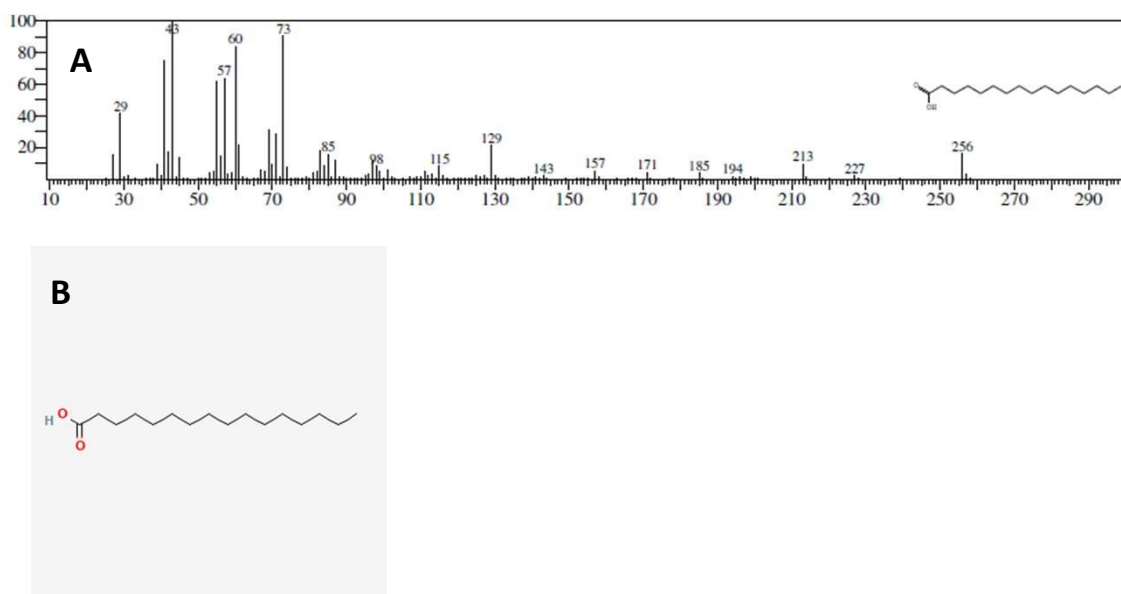


Figura 178. **A**: Tempo de retenção entre 20.400-20.417; Tempo de retenção específico: 20.412; Nomenclatura: *n*-Hexadecanoic acid; Hexadecanoic acid; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 985; Fórmula:  $C_{16}H_{32}O_2$ ; Peso molecular: 256; SI: 95.

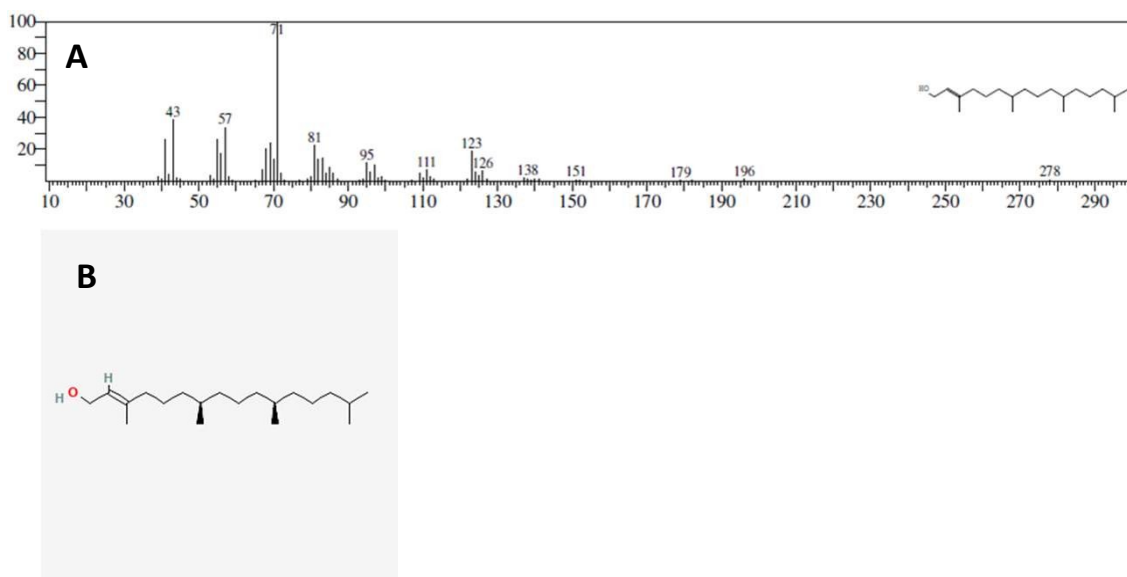


Figura 179. **A**: Tempo de retenção entre 22.200-22.217; Tempo de retenção específico: 22.207; Nomenclatura: *Phytol 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R\*,R\*-(E)]]*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 5280435 Fórmula:  $C_{20}H_{40}O$  Peso molecular: 296; SI: 97.



Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 27.142 e 28.158.

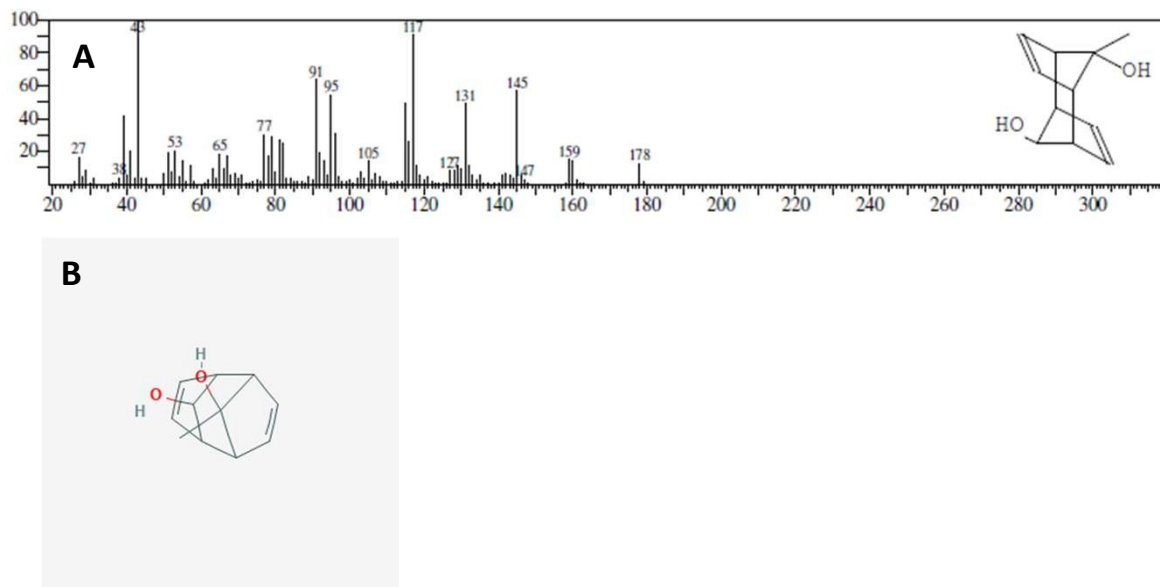


Figura 180. **A**: Tempo de retenção entre 27.142-27.158; Tempo de retenção específico: 27.148; Nomenclatura: *9-Methyltricyclo[4.2.1.1(2,5)]deca-3,7-diene-9,10-diol*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 539160; Fórmula:  $C_{11}H_{14}O_2$ ; Peso molecular: 178; SI: 74.

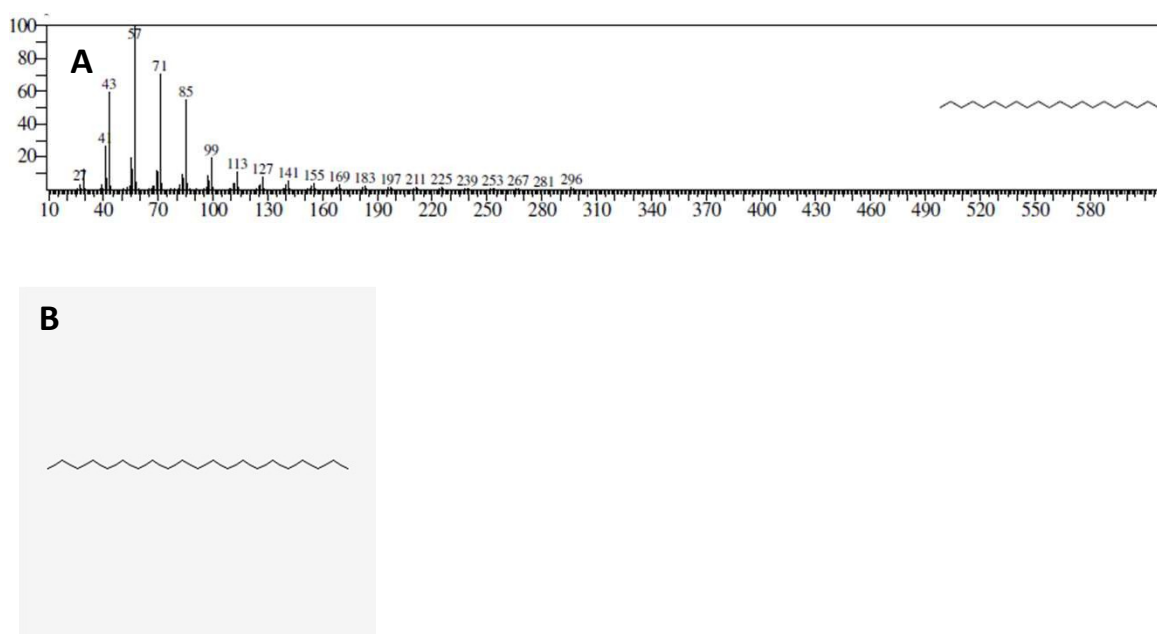


Figura 181. **A**: Tempo de retenção entre 28.142-28.158; Tempo de retenção específico: 28.151; Nomenclatura: *Heneicosane*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 12403; Fórmula:  $C_{21}H_{44}$  Peso molecular: 296; SI: 96.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 28.592 e 28.650.

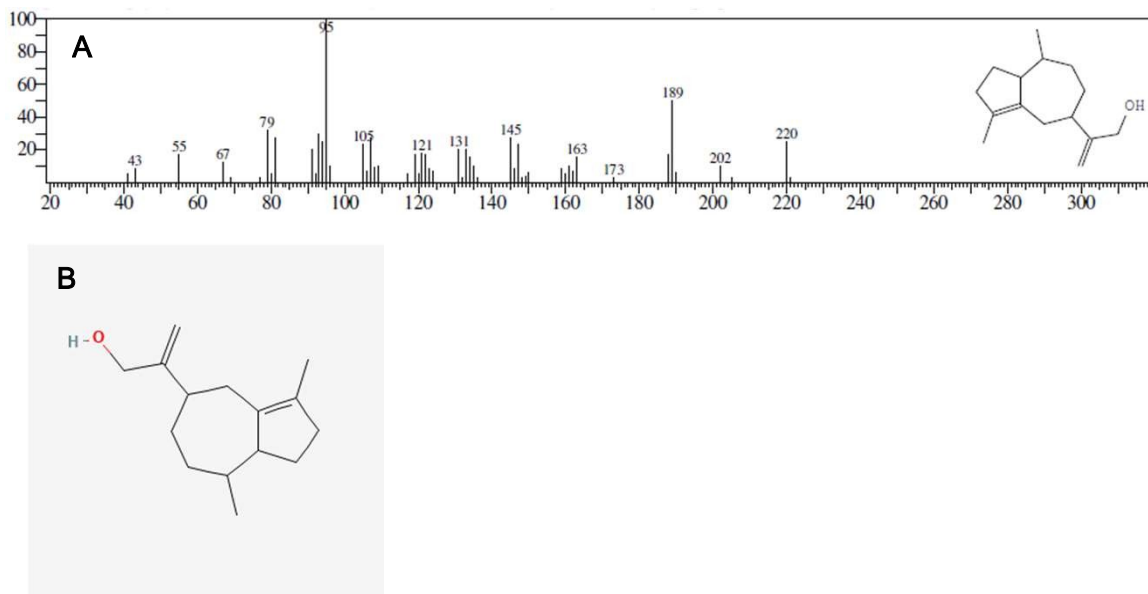


Figura 182. **A**: Tempo de retenção entre 28.592-28.608; Tempo de retenção específico: 28.600; Nomenclatura: *Aciphyllol alcohol*; 2-(3,8-Dimethyl-1,2,4,5,6,7,8,8a-octahydro-5-azulenyl)-2-propen-1-ol; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 565770; Fórmula: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O; Peso molecular: 220; SI: 74.

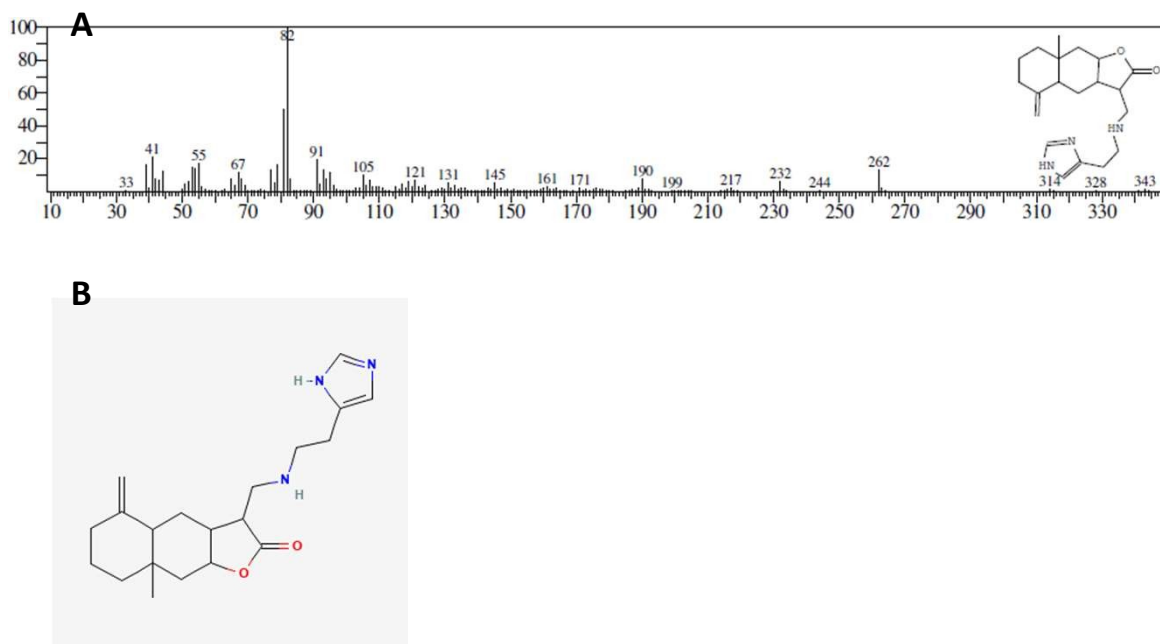


Figura 183. **A**: Tempo de retenção entre 28.633-28.650; Tempo de retenção: 28.644; Nomenclatura: *Decahydronaphtho[2,3]furan-2-one*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID:3732226; Fórmula: C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> Peso molecular: 343; SI: 71.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 28.717 e 29.003.

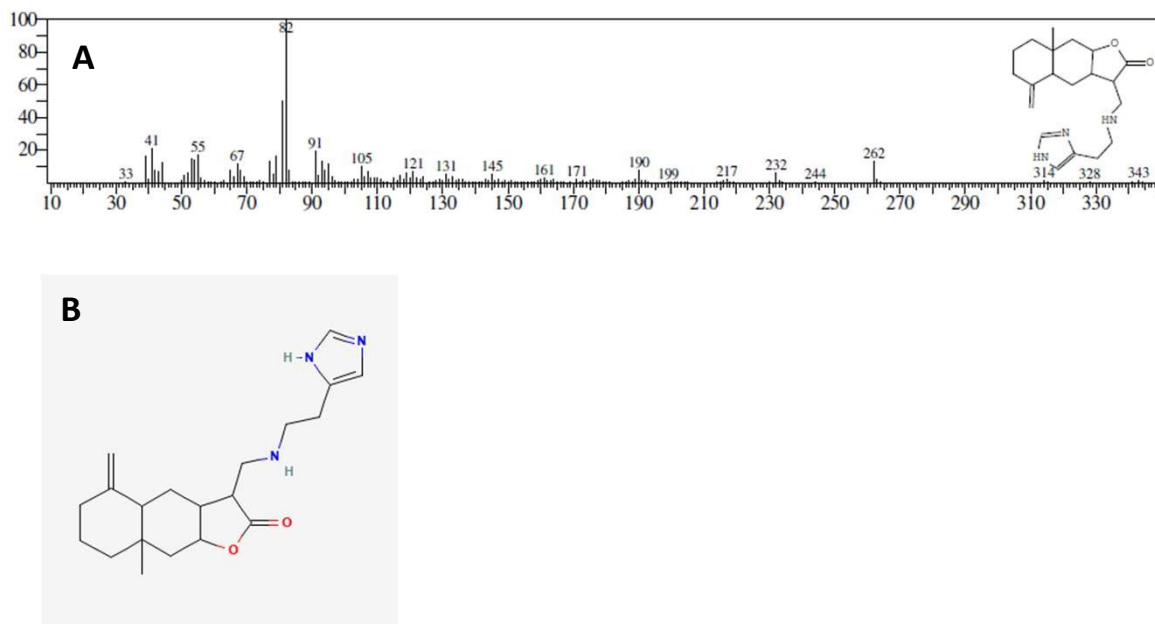


Figura 184. **A:** Tempo de retenção entre 28.717-28.733 (Idem ao item 4 anterior, porém, em RT 28.729); Tempo de retenção: 28.729; Nomenclatura: *Decahydronaphtho[2,3]furan-2-one*; **B:** Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 3732226; Fórmula:  $C_{20}H_{29}N_3O_3$ ; Peso molecular: 343; SI: 75.

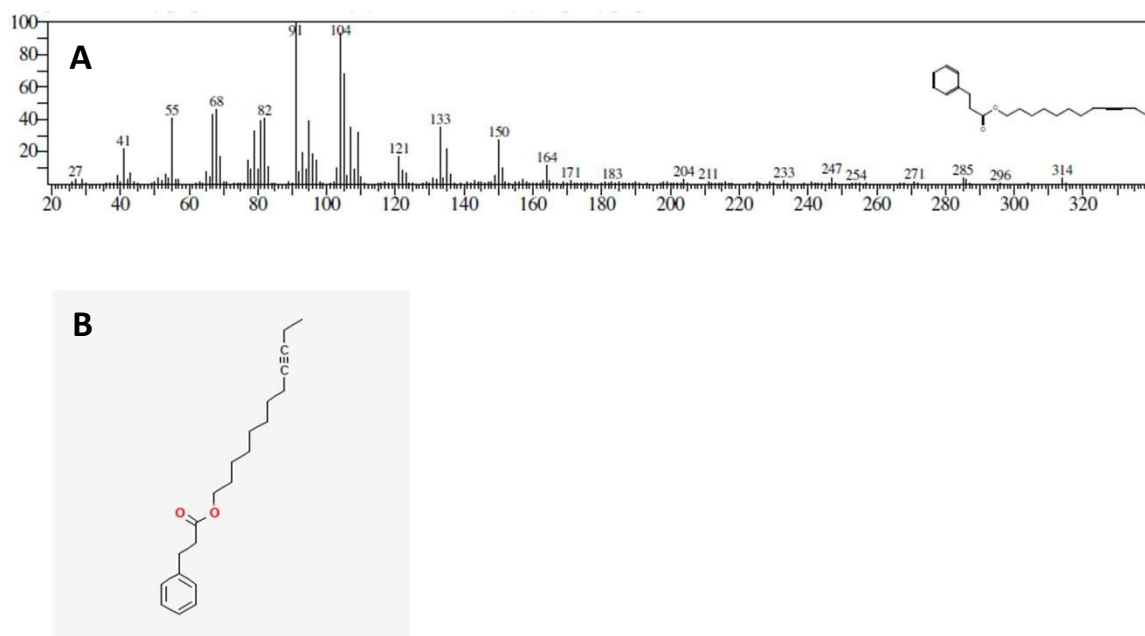


Figura 185. **A:** Tempo de retenção entre 28.983-29.0003 ; Tempo de retenção: 28.992. Nomenclatura: *Phenylpropanoic acid*; **B:** Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 561994  
Fórmula:  $C_{21}H_{30}O_2$ ; Peso molecular: 314; SI: 76.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 29.050 e 29.175.

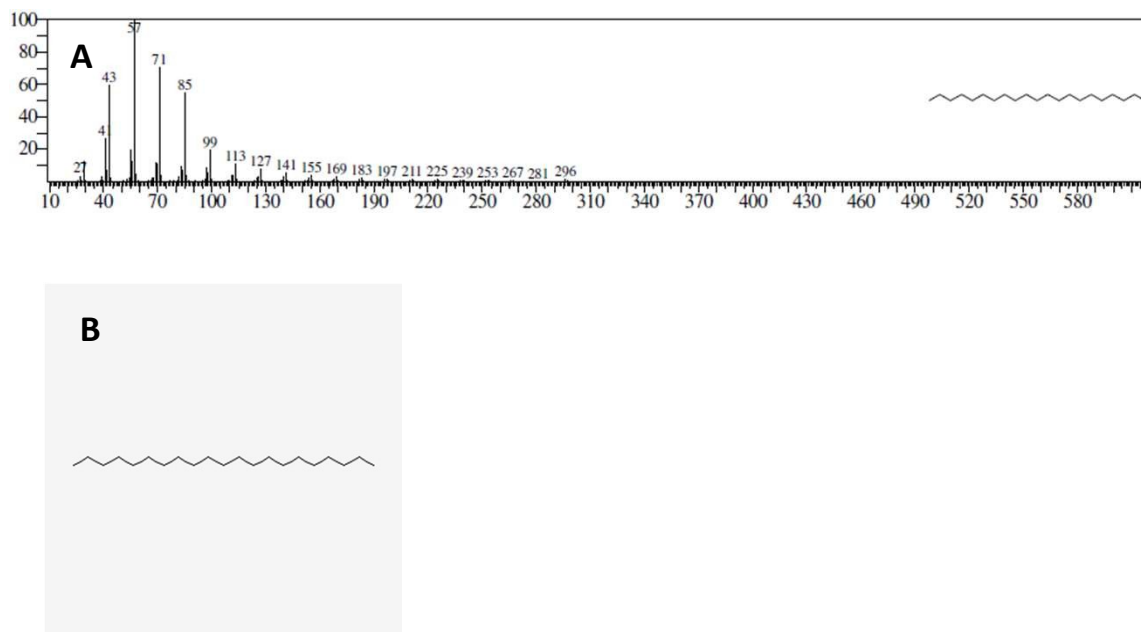


Figura 186. **A**: Tempo de retenção entre 29.050-29.067; Tempo de retenção: 29.057; Nomenclatura: *Heneicosane*; *n-Heicosane*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 12403  
Fórmula:  $C_{21}H_{44}$ ; Peso molecular: 296; SI: 97.

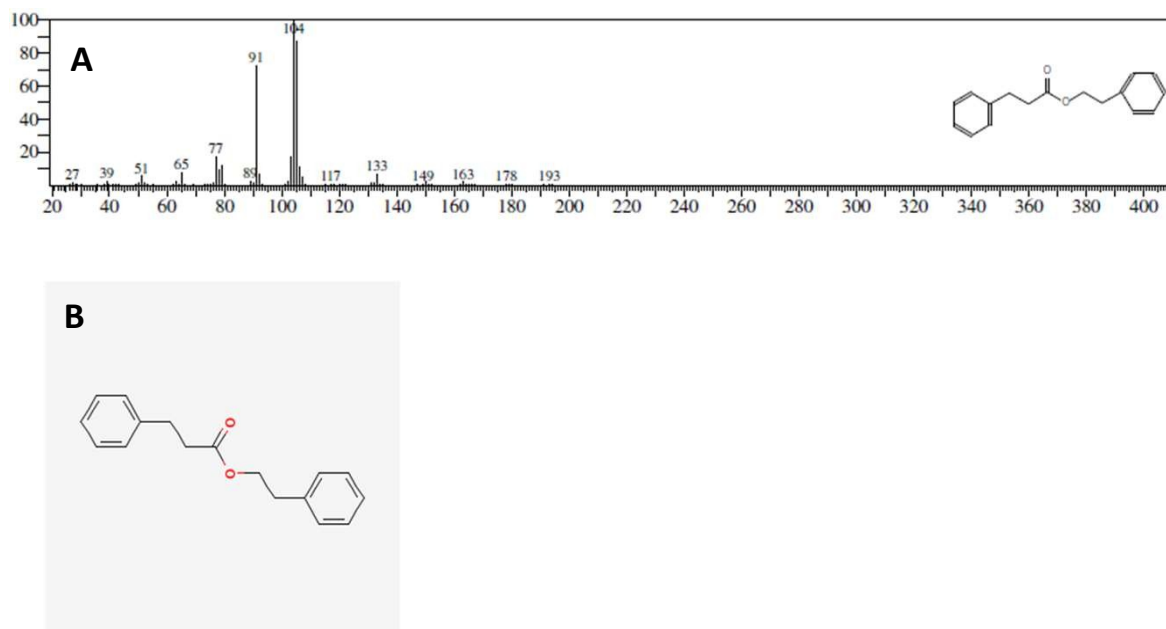


Figura 187. **A**: Tempo de retenção entre 29.158-29.175; Tempo de retenção: 29.166; Nomenclatura: *2-Phenethyl-beta-phenylpropionate*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 520360; Fórmula:  $C_{17}H_{18}O_2$ ; Peso molecular: 254; SI: 86.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 29.408 e 29.558.

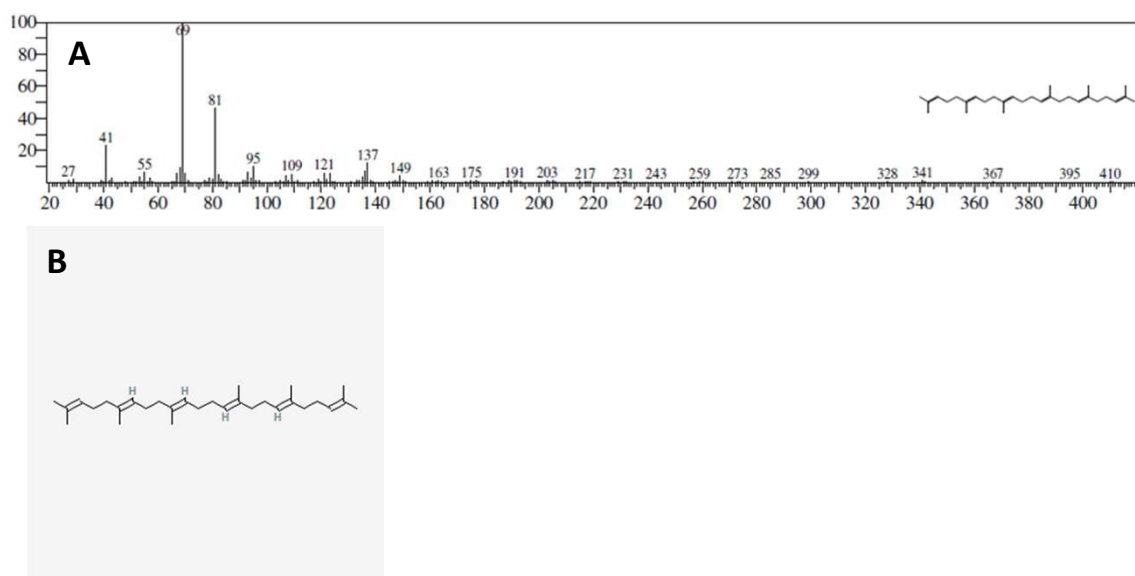


Figura 188. **A:** Tempo de retenção entre 29.408-29.425 ; Tempo de retenção: 29.414; Nomenclatura: *Supraene* ; *Spinacene* ; *Squalene*; **B:** Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 638072  
Fórmula:  $C_{30}H_{50}$  ; Peso molecular: 410; SI: 96.

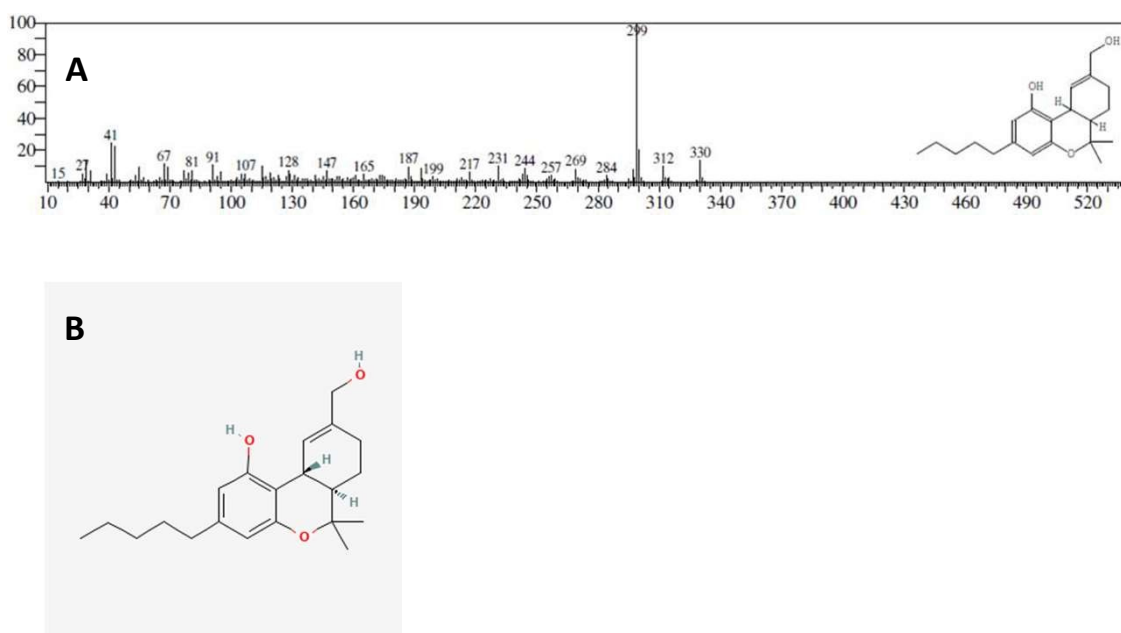


Figura 189. **A:** Tempo de retenção entre 29.542-29.558; Tempo de retenção: 29.549; Nomenclatura: *11-Hydroxy-DELTA 9-tetrahydrocannabinol*; **B:** Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 644022  
Fórmula:  $C_{21}H_{30}O_3$  ; Peso molecular: 330; SI: 66.

Reesultados das análises de CG/MS referntes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 29.692 e 30.158.

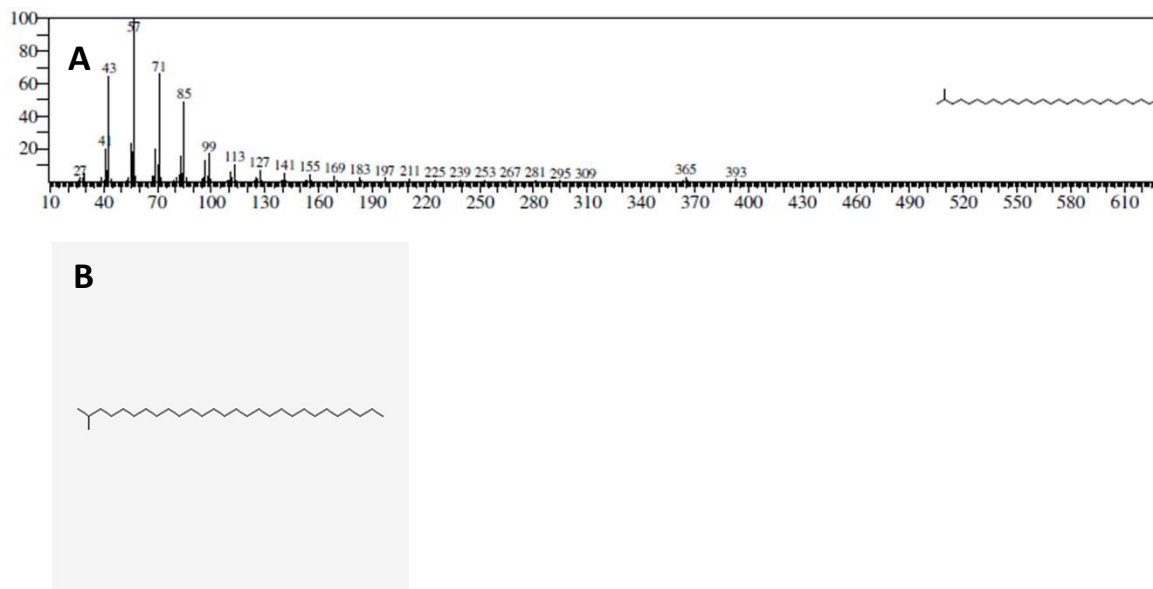


Figura 190. **A**: Tempo de retenção entre 29.692-29.7082; Tempo de retenção: 29.704; Nomenclatura: *methyloctacosane*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 519147; Fórmula:  $C_{29}H_{60}$  Peso molecular: 408; SI: 96.

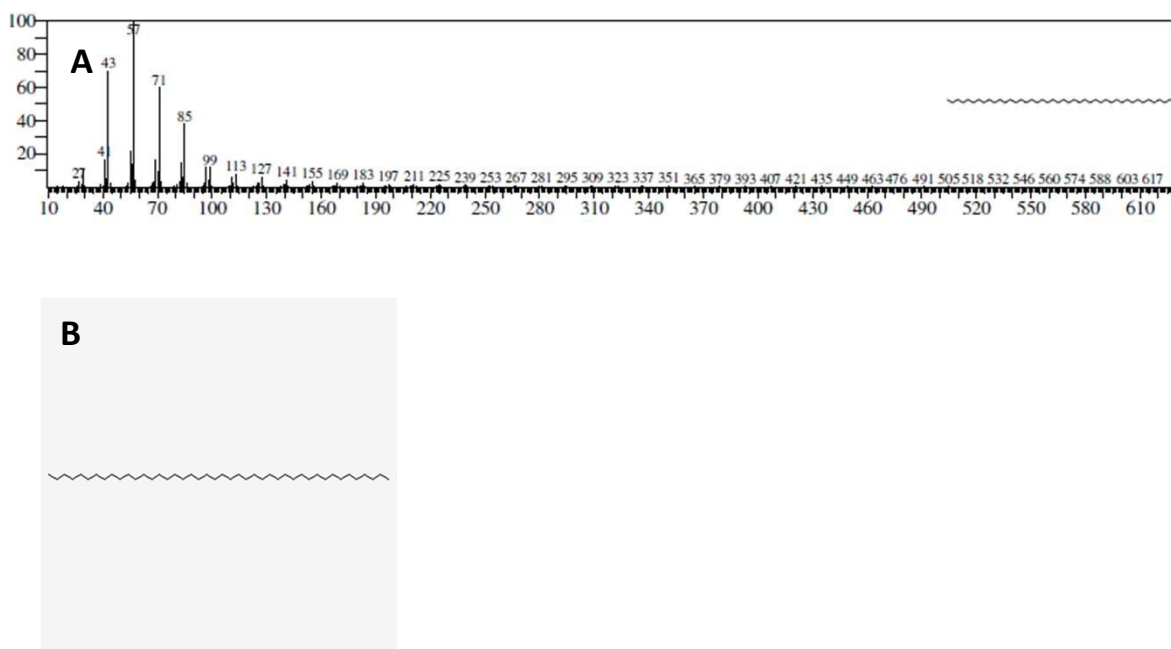


Figura 191. **A**: Tempo de retenção entre 30.142-30.158; Tempo de retenção: 30.148; Nomenclatura: *Tetratetracontane*; *n-Tetratetracontane*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 23494 Fórmula:  $C_{44}H_{90}$ ; Peso molecular: 618; SI: 96.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 30.608 e 31.383.

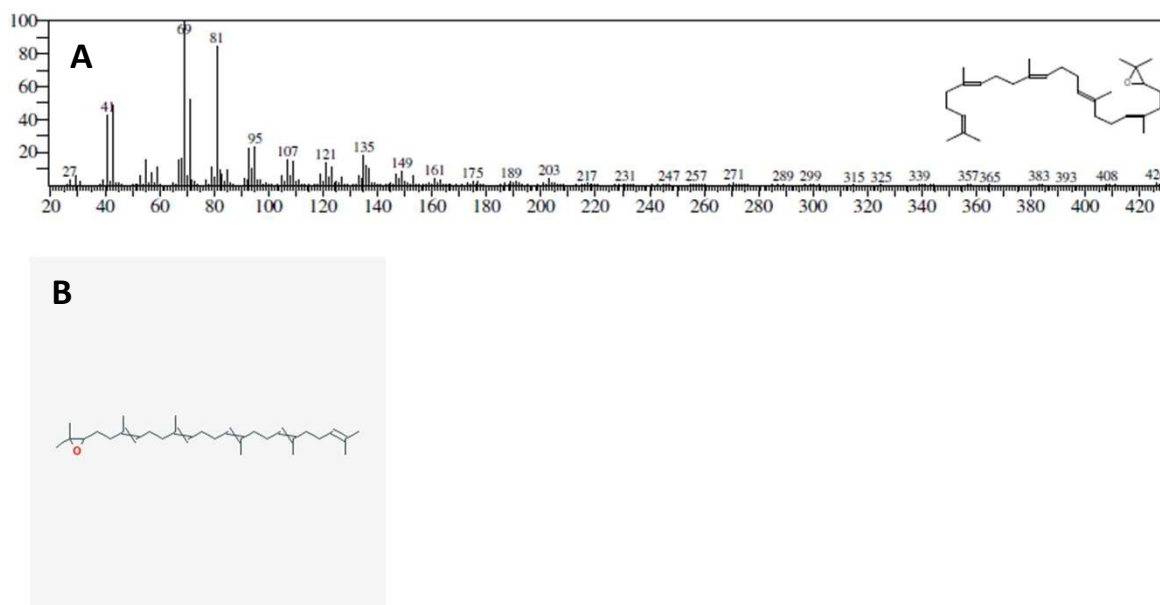


Figura 192 **A**: Tempo de retenção entre 30.608-30.625; Tempo de retenção: 30.615; Nomenclatura: *Oxirane, 2,2-dimethyl-3-(3,7,12,16,20-pentamethyl-3,7,11,15,19-heneicosapentaenyl)*; *Squalene peroxide*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 693 Fórmula:  $C_{30}H_{50}O$  Peso molecular: 426; SI: 90.

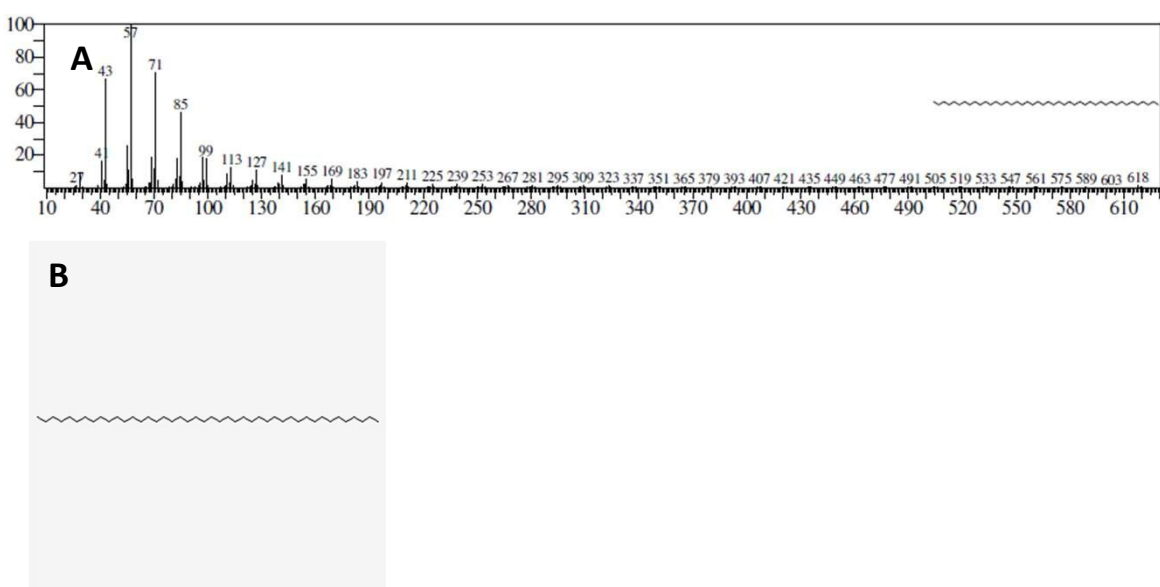


Figura 193. **A**: Tempo de retenção entre 31.367- 31.383, (Idem ao item 12, porém RT 31.374); Tempo de retenção: 31.374; Nomenclatura: *Tetratetracontane*; *n-Tetratetracontane*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 23494; Fórmula:  $C_{44}H_{90}$  Peso molecular: 618. SI: 93.

Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 31.517 e 32.000.

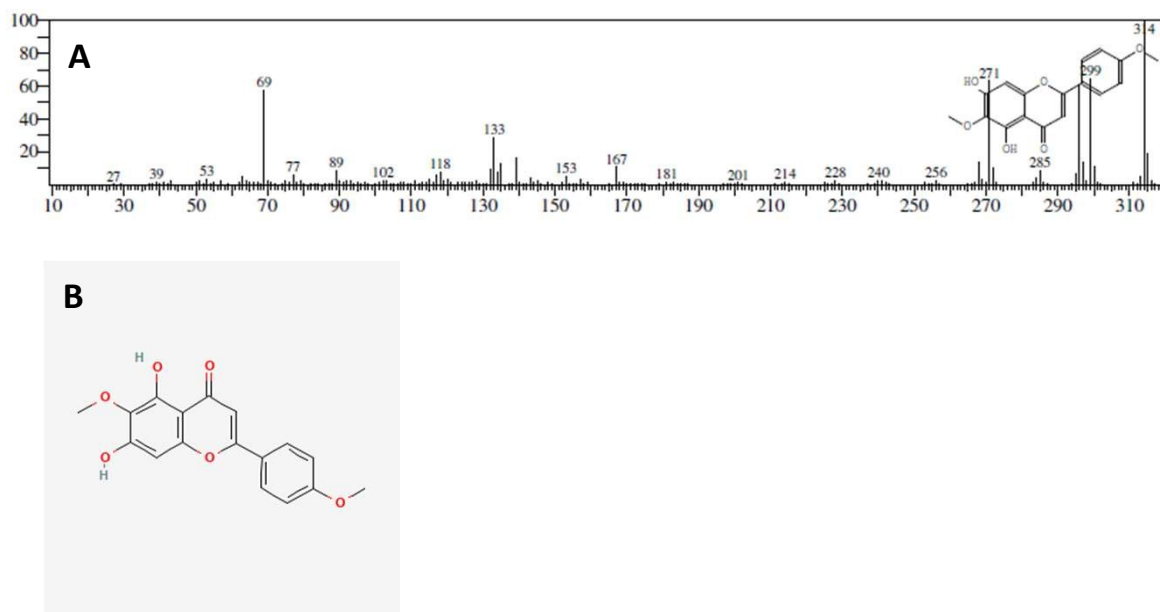


Figura 194 **A**: Tempo de retenção entre 31.517-31.533; Tempo de retenção: 31.523; Nomenclatura: *Pectolinarigenin*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 5320438  
Fórmula:  $C_{17}H_{14}O_6$  ; Peso molecular: 314; SI: 88.

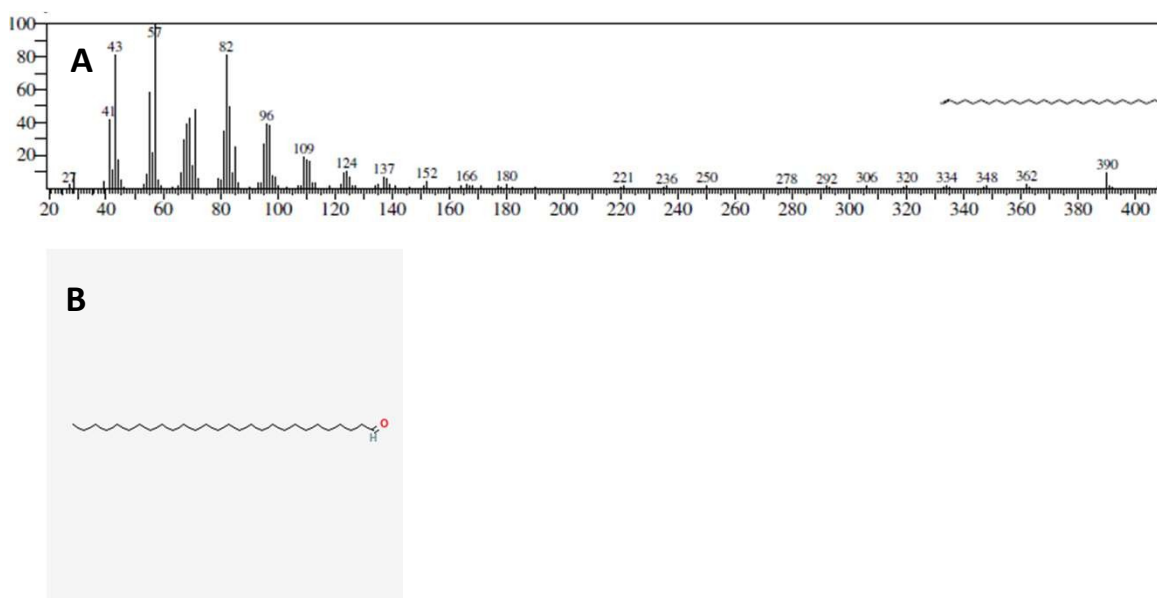


Figura 195. **A**: Tempo de retenção entre 31.983-32.000; Tempo de retenção: 31.993; Nomenclatura: *Octacosanal* ; *n-Octacosanal*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 3084376  
Fórmula:  $C_{28}H_{56}O$  ; Peso molecular: 408; SI: 95.



Resultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 32.292 e 32.915.

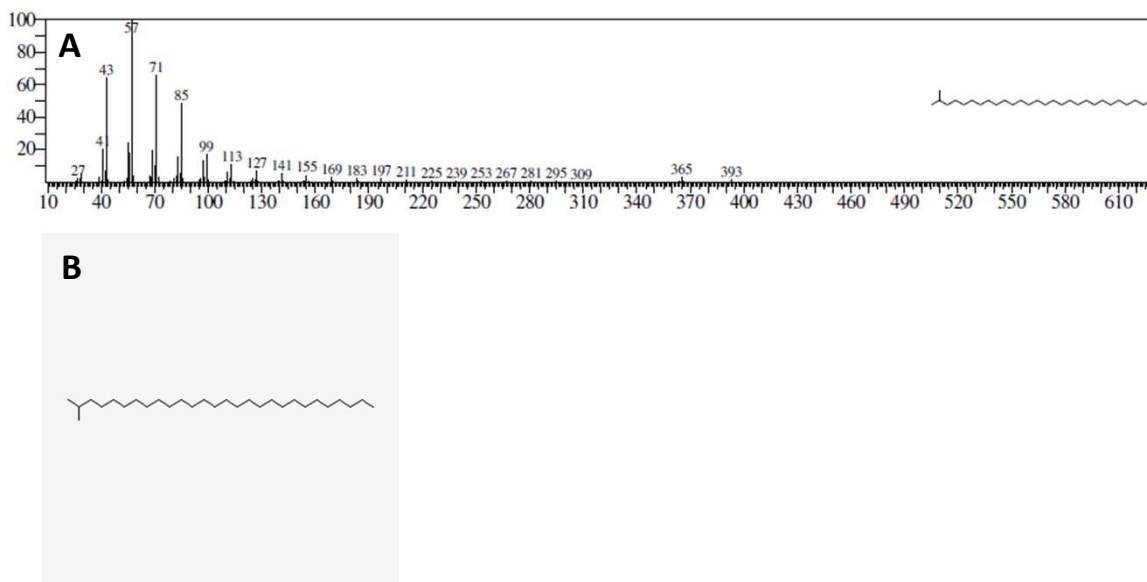


Figura 196. **A**: Tempo de retenção entre 32.292-32.308 (Idem ao item 11, porém, no RT32.298); Tempo de retenção: 32.298; Nomenclatura: *2-methyloctacosane*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 519147; Fórmula:  $C_{29}H_{60}$  Peso molecular: 408; SI: 96.

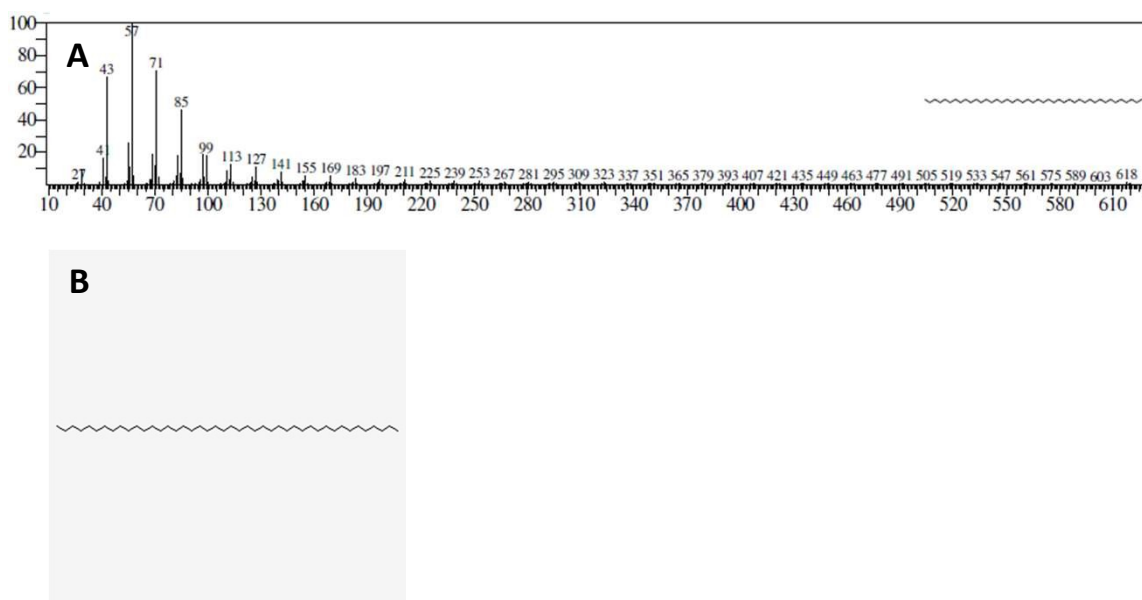


Figura 197. **A**: Tempo de retenção entre 32.898-32.915 (Idem ao item 12, porém, no RT32.913); Tempo de retenção: 32.913; Nomenclatura: *Tetratetracontane*; *n-Tetratetracontane*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 23494; Fórmula:  $C_{44}H_{90}$ ; Peso molecular: 618; SI: 96.

Reesultados das análises de CG/MS referentes aos parâmetros específicos nos tempos de retenção entre 37.592 e 39.750.

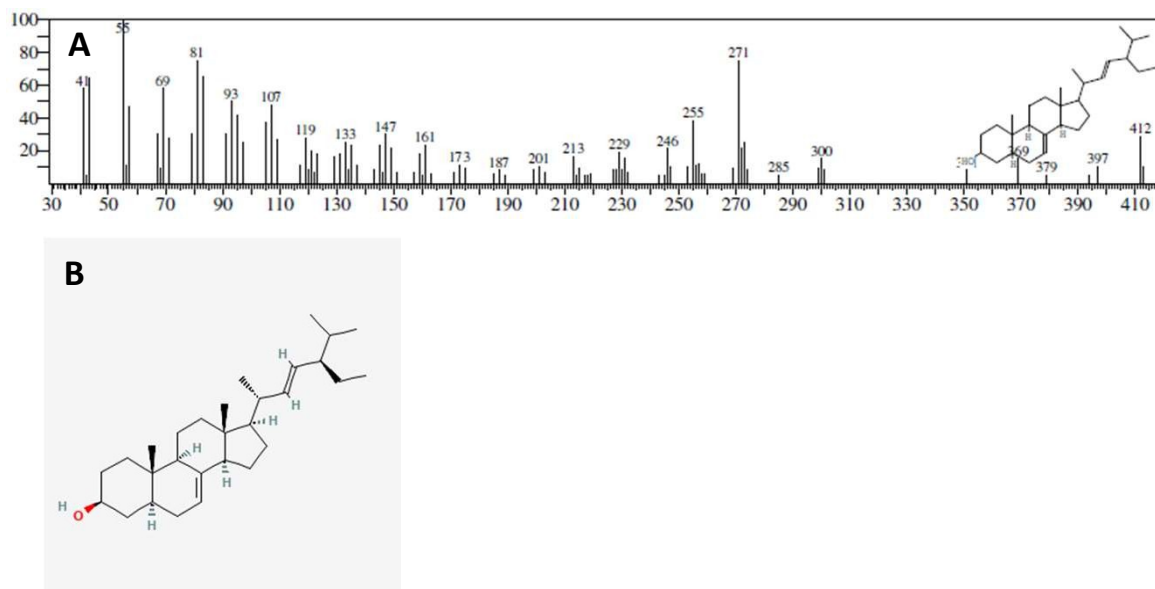


Figura 198. **A**: Tempo de retenção entre 37.592-37.608 ; Tempo de retenção: 37.597; Nomenclatura: *Chondrillasterol* ; *Stigmasta-7,22dien-3-ol, (3.beta.,5.alpha.,22E,24R)*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 5283663; Fórmula:  $C_{29}H_{48}O$ ; Peso molecular: 412; SI: 87.

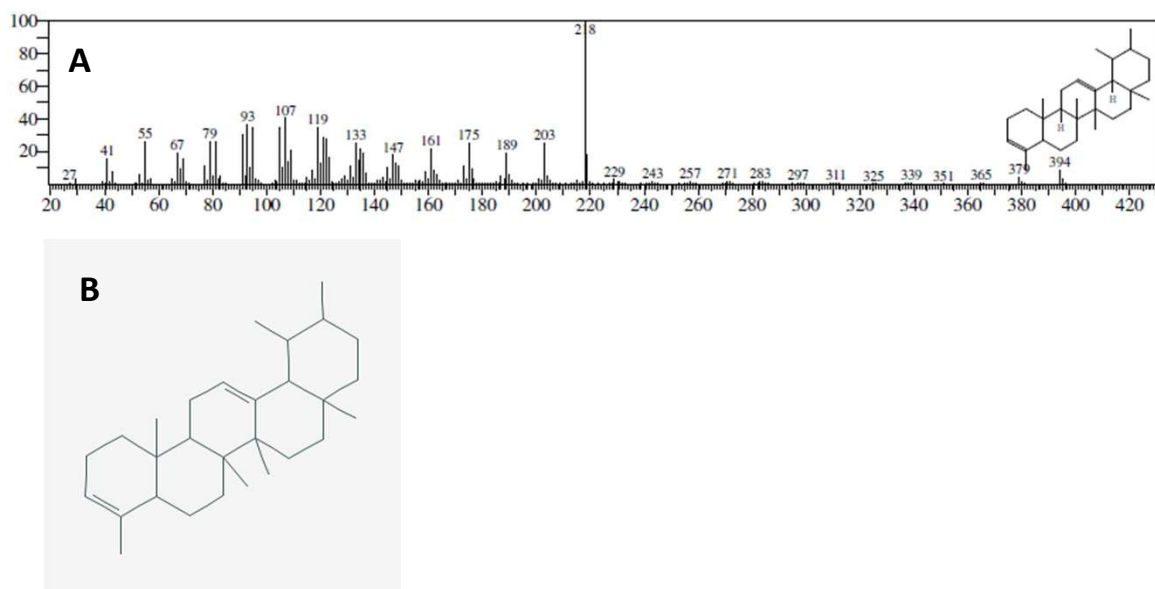


Figura 199. **A**: Tempo de retenção entre 39.733-39.750; Tempo de retenção: 39.742; Nomenclatura: *4-Norusa-3,12-diene*; **B**: Estrutura química 2D, fonte: (PubChem) CID: 91735342; Fórmula:  $C_{29}H_{46}$  Peso molecular: 394; SI : 87.

## APÊNDICE B

Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 01 (Fr 01).

Fração 01 (Fr 01)

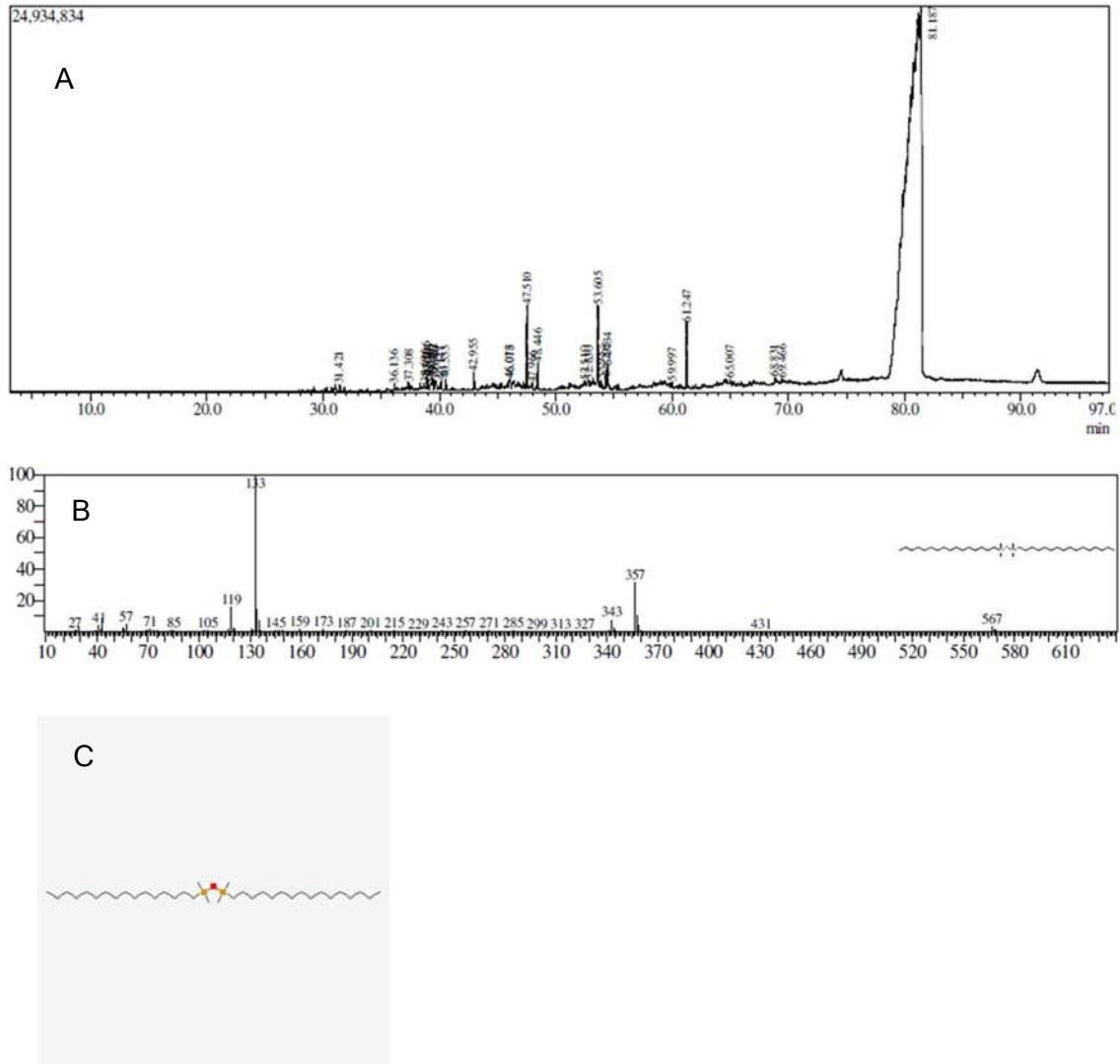


Figura 200. **A**: Cromatograma fração 1; Altura do pico: 90.65%. **B**: Tempo de retenção entre 81.180-81.190; Tempo de retenção específico: 81.187; Nomenclatura: *Disiloxane, 1,3-dihexadecyl-1,1,3,3-tetramethyl-1,3-Dihexadecyl-1,1,3,3-tetramethyldisiloxane*; **C**: Estrutura química 2D, fonte (PubChem); CID: 584030 Fórmula: C<sub>36</sub>H<sub>78</sub>OSi<sub>2</sub>; Peso molecular: 582; SI: 91.

## Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 02 (Fr 02)

## Fração 02 (Fr 02)

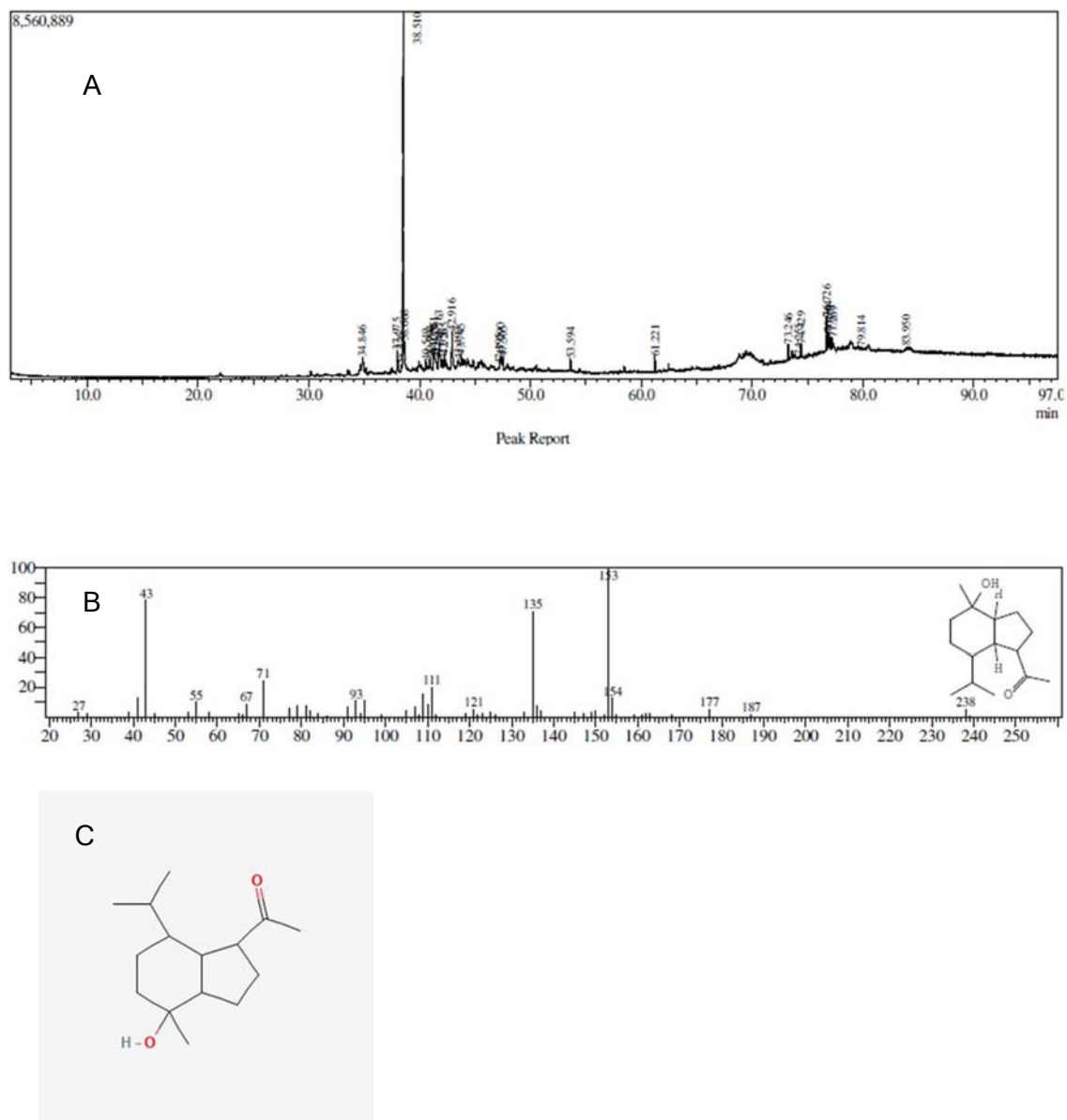


Figura 201. **A:** Cromatograma fração 2; Altura do pico: 49.87%. **B:** Tempo de retenção entre 38.505-38.515; Tempo de retenção específico: 38.510; Nomenclatura: *1-((1S,3aR,4R,7S,7aS)-4-Hydroxy-7-isopropyl-4-methyloctahydro-1H-inden-1-yl)ethanone*; *Oplopanone*; *(-)-Oplopanone*; *Oplopanon*; **C:** Estrutura química 2D, fonte (PubChem) ; CID: 539857 Fórmula:  $C_{15}H_{26}O_2$  Peso molecular: 238; SI: 85.

Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 03 (Fr 03).

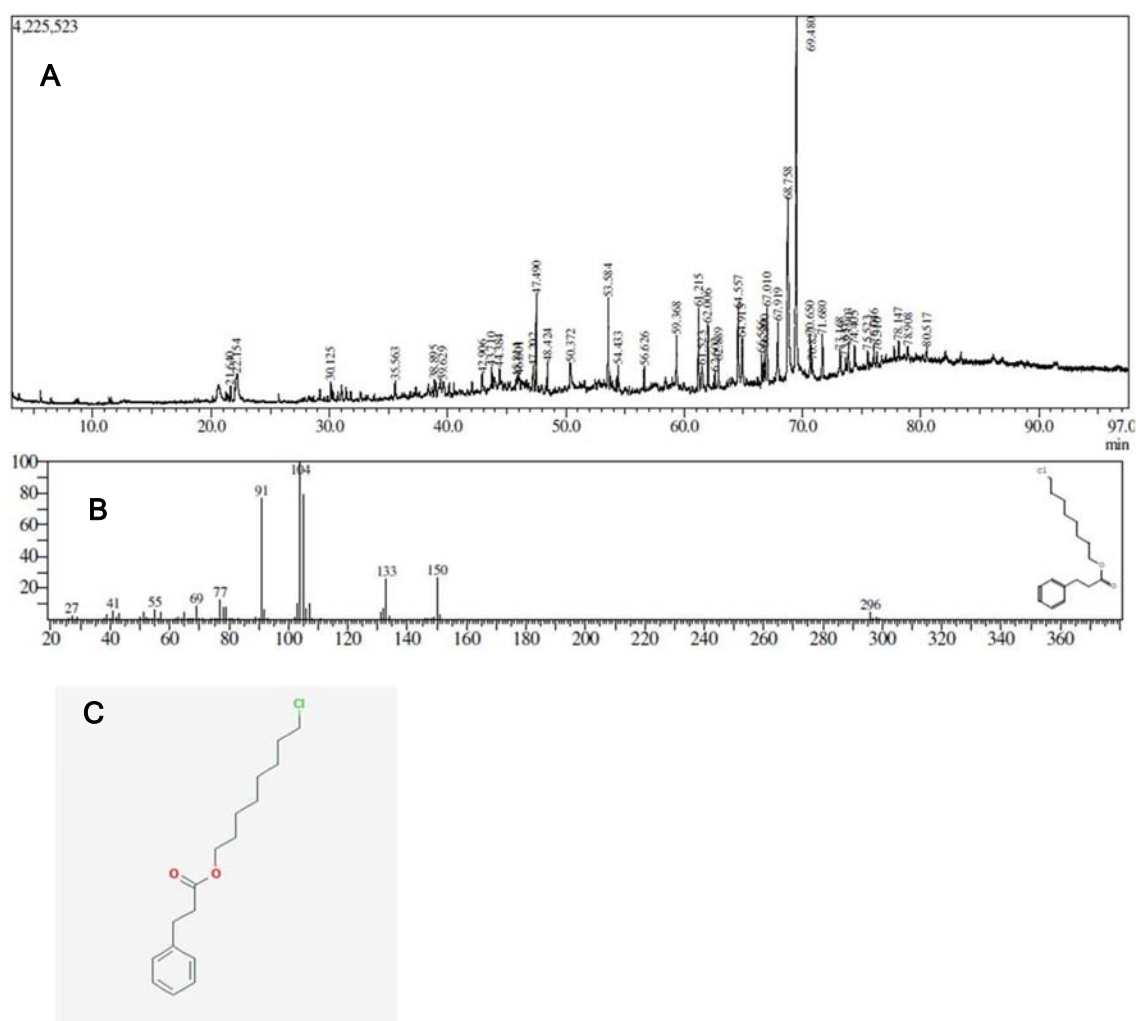


Figura 202. **A**: Cromatograma fração 3; Altura do pico 1: 9.45% ; **B**: Tempo de retenção entre 68.755-68.765; Tempo de retenção específico: 68.758; Nomenclatura: *3-Phenylpropionic acid, 8-chlorooctyl ester* ; **C**: Estrutura química 2D, fonte (PubChem); CID: 91703272; Fórmula:  $C_{17}H_{25}ClO_2$ ; Peso molecular: 296; SI: 79.

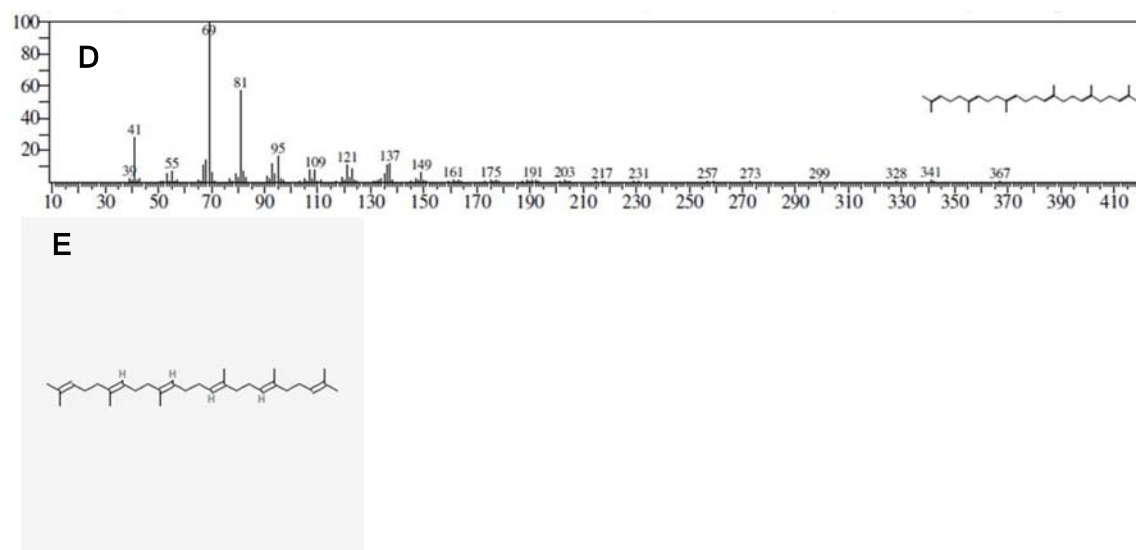


Figura 203. **A**: Cromatograma fração 3; Altura do pico 2: 18.30% ; **D**: Tempo de retenção entre 69.475-69.485; Tempo de retenção específico: 69.480; Nomenclatura: *Squalene; 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-(all-E)*; **E**: Estrutura química 2D, fonte (PubChem); CID: 638072; Fórmula:  $C_{30}H_{50}$ ; Peso molecular: 410; SI: 92.

Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 04 (Fr 04).

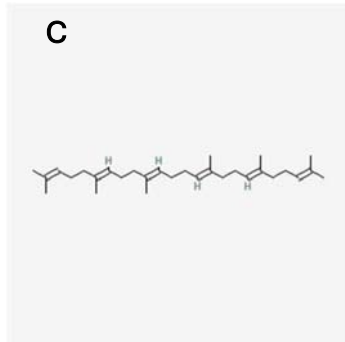
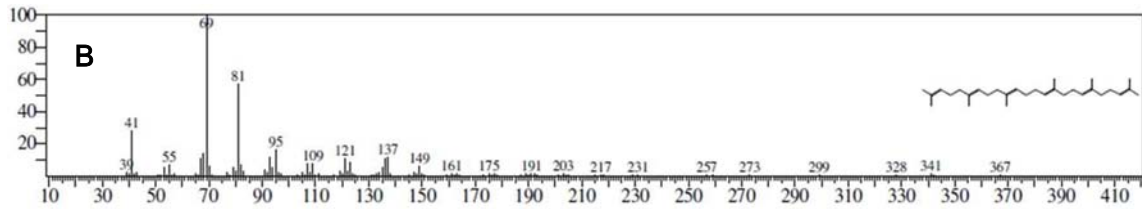
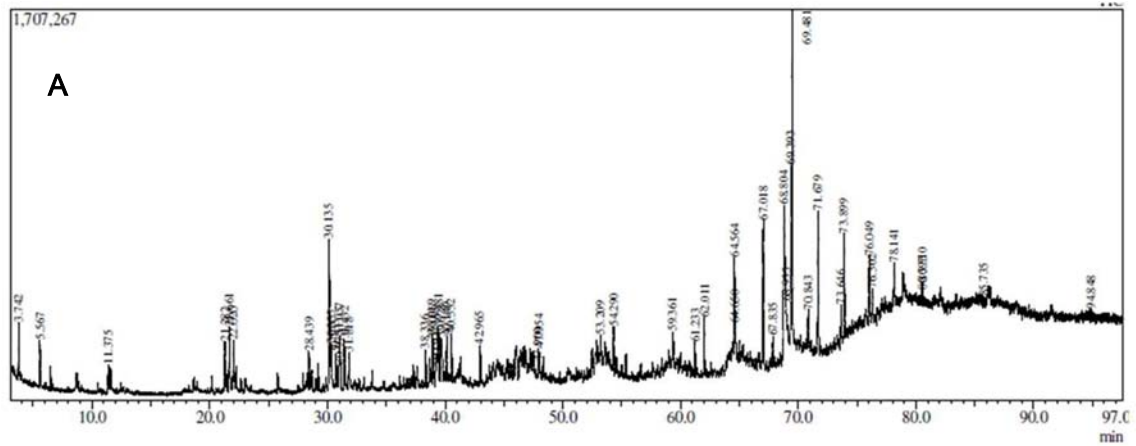


Figura 204. **A:** Cromatograma fração 4; Altura do pico: 12,41% ; **B:** Tempo de retenção entre 69.475-69.485; Tempo de retenção específico: 69.480; Nomenclatura: *Squalene*; 2,6,10,14,18,22- *Tetracosahexaene*, 2,6,10,15,19,23-*hexamethyl-(all-E)*; **C:** Estrutura química 2D, fonte (PubChem); CID: 638072; Fórmula: C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>; Peso molecular: 410; SI: 92.

Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 5 (Fr 05).

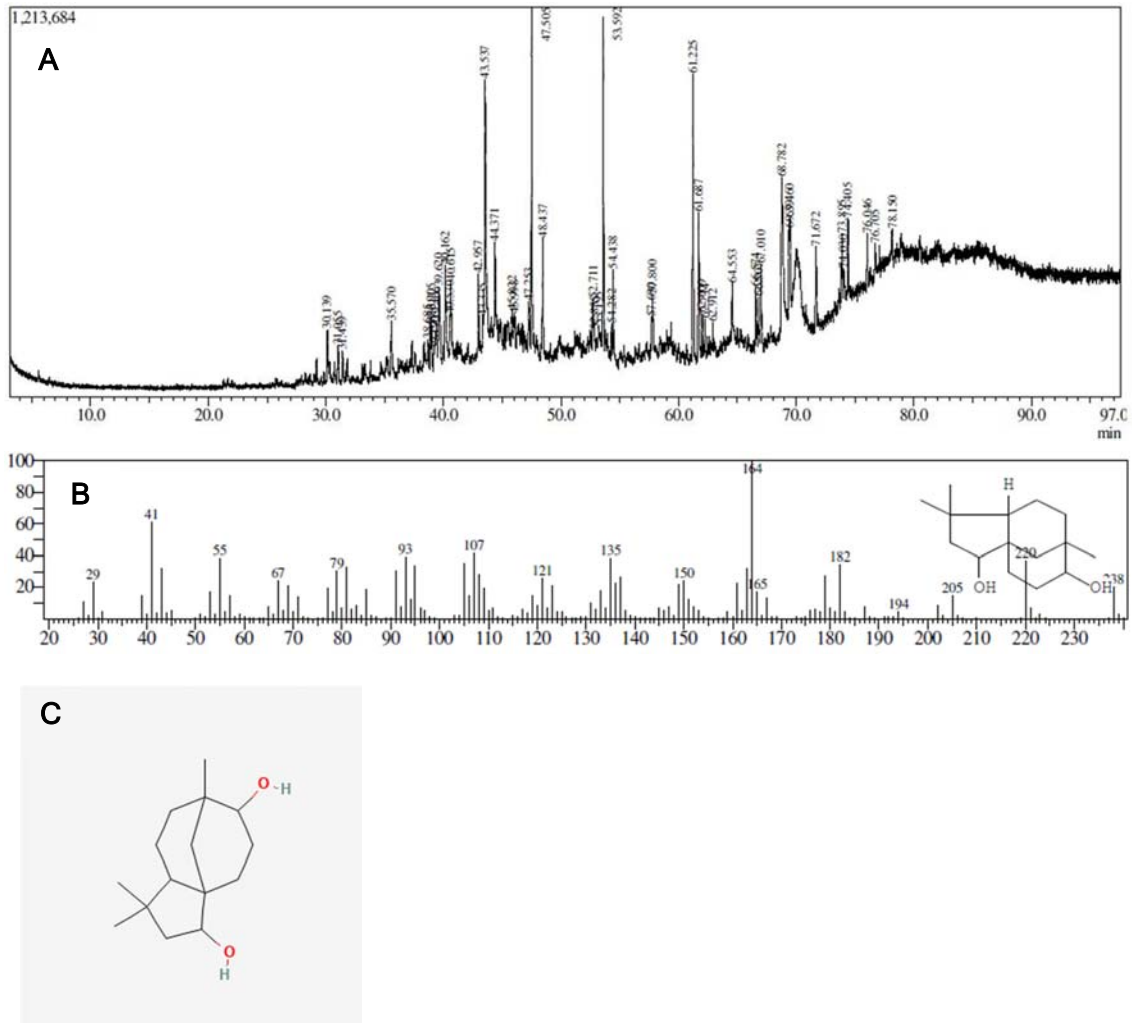


Figura 205. **A**: Cromatograma fração 5; Altura do Pico 1: 7,01%; **B**: Tempo de retenção entre 43.530-43.540; Tempo de retenção específico: 43,537; Nomenclatura: *4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)]dodecane-2,9-diol*; **C**: Estrutura química 2D, fonte (*PubChem*); CID: 596186; Fórmula:  $C_{15}H_{26}O_2$ ; Peso molecular: 238; SI: 87.

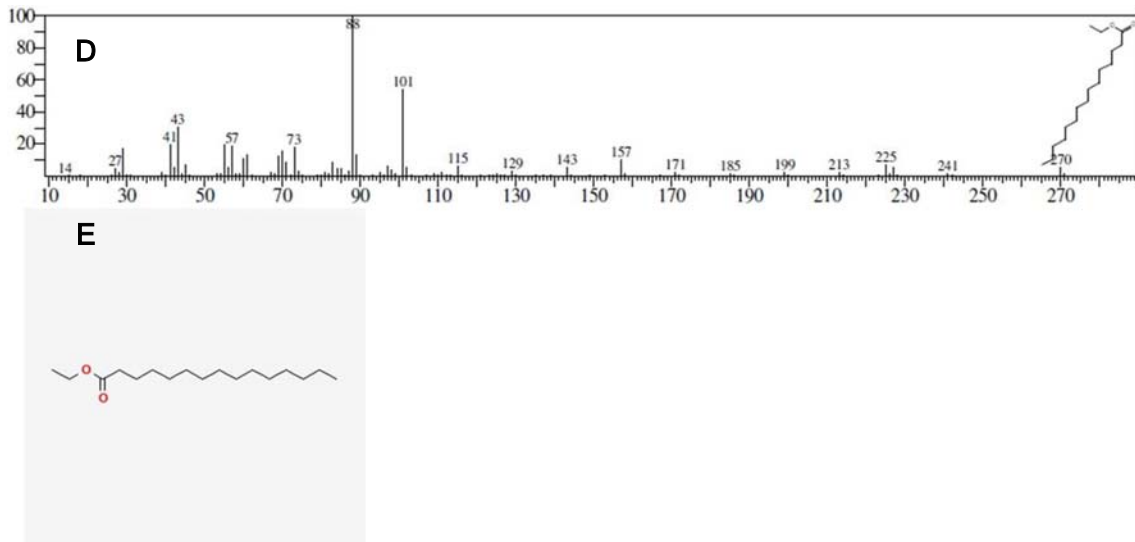


Figura 206. **A**: Cromatograma fração 5; Altura do Pico 2: 9,09%; **B**: Tempo de retenção entre 47.500-47.510; Tempo de retenção específico: 47,505; Nomenclatura: *Pentadecanoic acid, ethyl ester*; *Ethyl pentadecanoate*; *n-Pentadecanoic acid ethyl ester*; **C**: Estrutura química 2D, fonte (*PubChem*); CID: 38762; Fórmula:  $C_{17}H_{34}O_2$ ; Peso molecular: 270; SI: 89.

Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 5 (Fr 05), continuação.

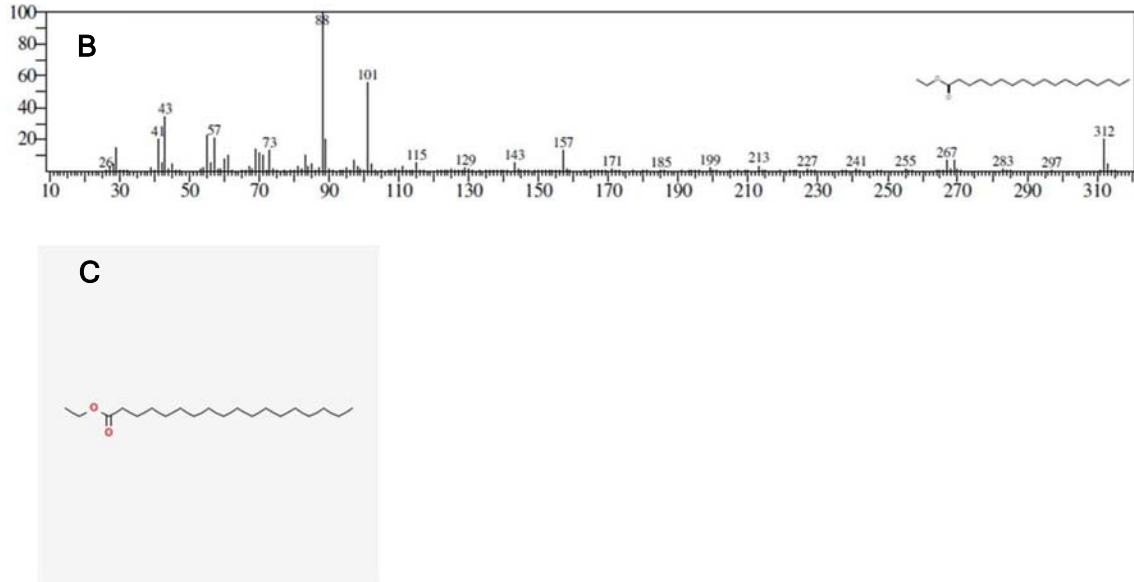


Figura 207. **A**: Cromatograma fração 5; Altura do Pico 3 (Página 268): 8,94%; **B**: Tempo de retenção entre 53.585-53.595; Tempo de retenção específico: 53.592; Nomenclatura: *Octadecanoic acid, ethyl ester*; *Stearic acid, ethyl ester*; *Ethyl n-octadecanoate*; *Ethyl octadecanoate*; *Ethyl stearate*; *Radia 7185*; **C**: Estrutura química 2D, fonte (*PubChem*); CID: 8122 Fórmula:  $C_{20}H_{40}O_2$ ; Peso molecular: 312; SI: 89.

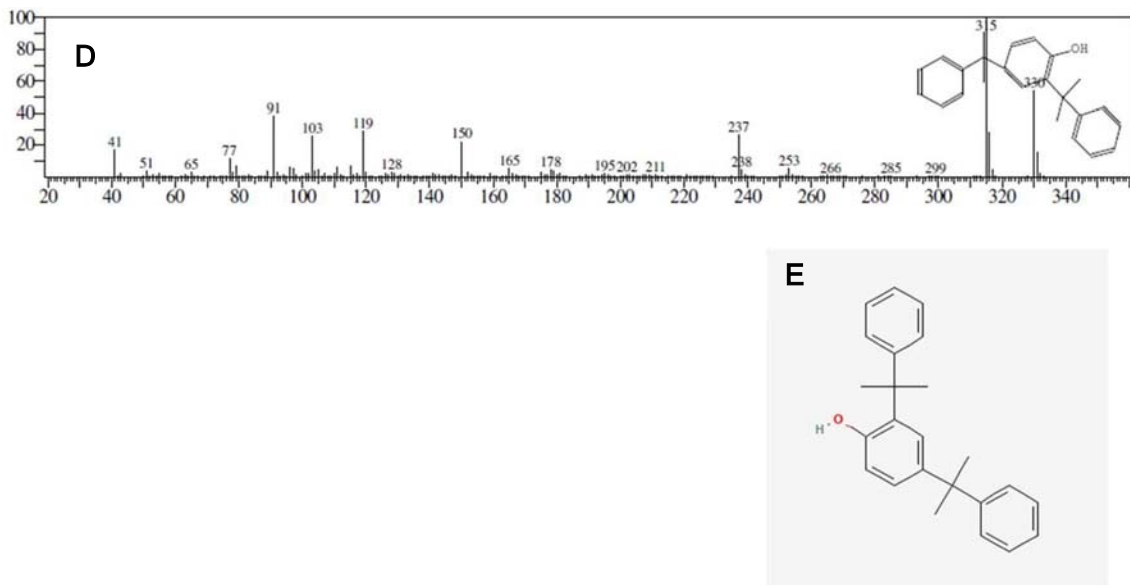


Figura 208. **A**: Cromatograma fração 5; Altura do Pico 4 (Página 268): 7,62%; Tempo de retenção entre 61.220-61.230; Tempo de retenção específico: 61.225; Nomenclatura: *Phenol, 2,4-bis(1-methyl-1-phenylethyl)*; *2,4-Bis(dimethylbenzyl)phenol*; *2,4-Bis(1-methyl-1-phenylethyl) phenol*; **E**: Estrutura química 2D, fonte (*PubChem*); CID:76013 Fórmula:  $C_{24}H_{26}O$ ; Peso molecular: 330; SI: 89.



Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 6 (Fr 06).

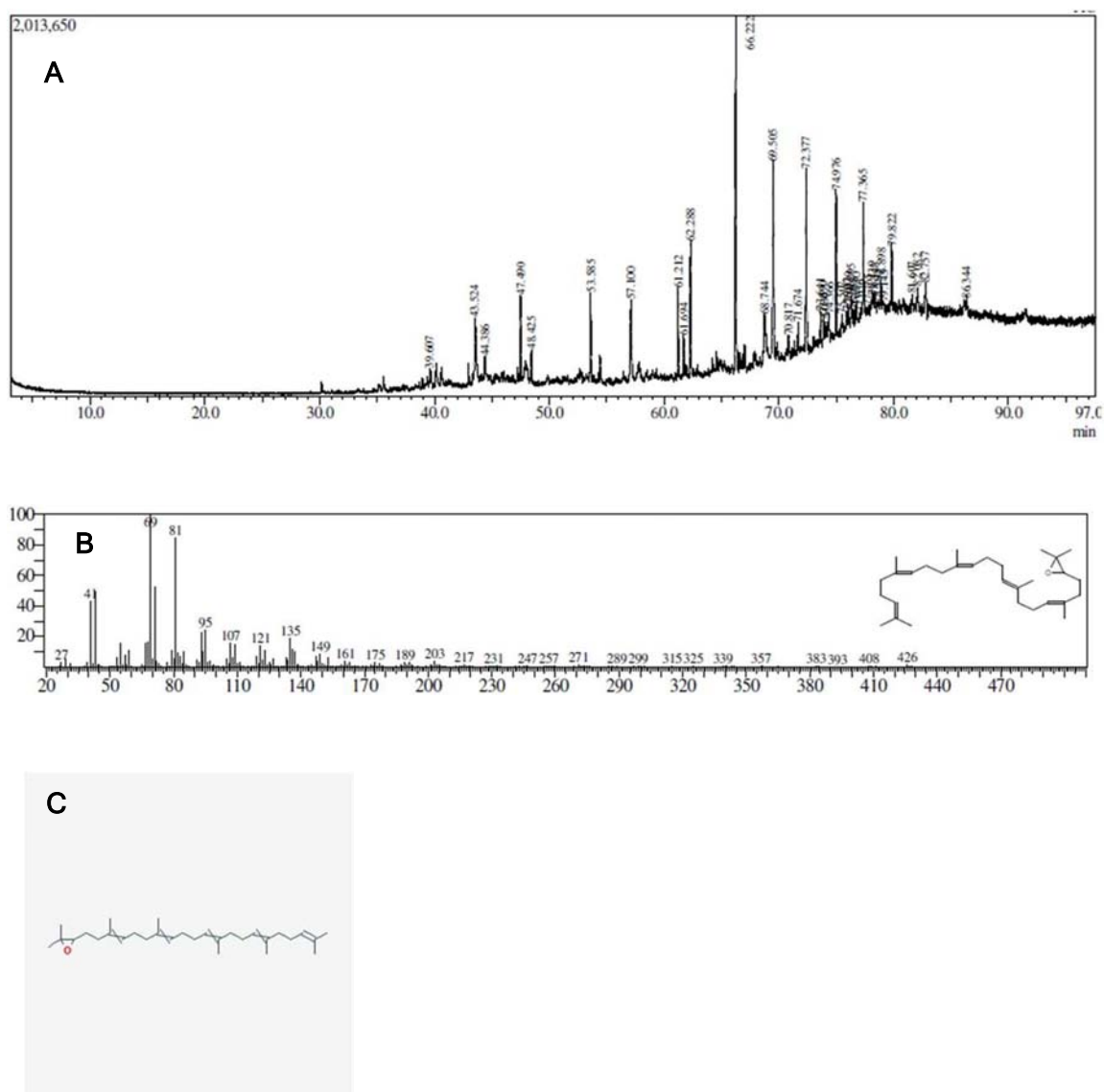


Figura 209. **A**: Cromatograma fração 6; Altura do Pico: 15,61%; **B**: Tempo de retenção entre 66.215-66.225; Tempo de retenção específico: 66.222; Nomenclatura: Oxirane, 2,2-dimethyl-3-(3,7,12,16,20-pentamethyl-3,7,11,15,19-heneicosapentaenyl)-, (all-E) ; 2,2-Dimethyl-3-[(3E,7E,11E,15E)- 3,7,12,16,20. **C**: Estrutura química 2D, fonte (PubChem); CID: 693 Fórmula: C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O; Peso molecular: 426; SI: 82.

Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 7 (Fr 07).

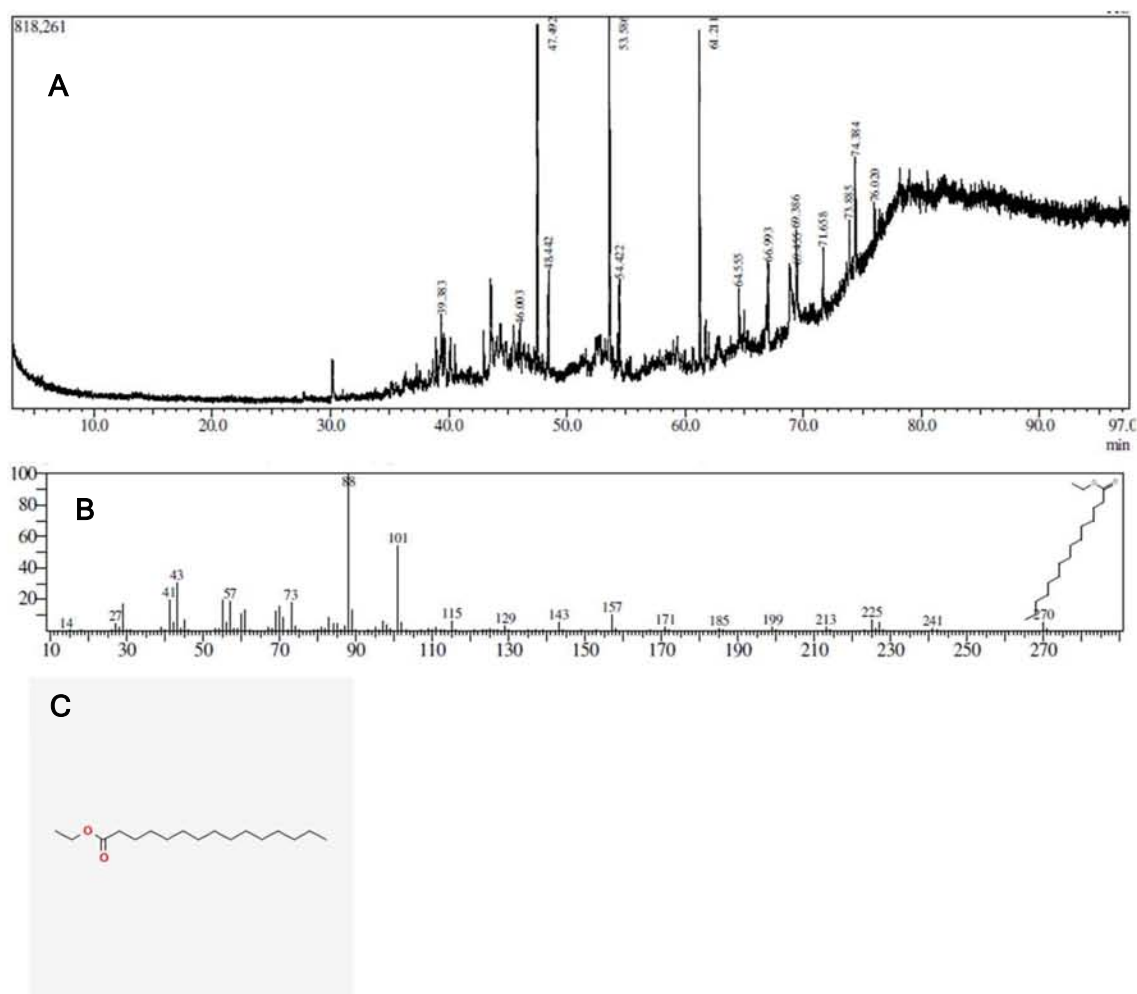


Figura 210. A: Cromatograma fração 7, altura do pico 1: 18,96%; B: Tempo de retenção entre 47.485-47.495; Tempo de retenção específico: 47.492; Nomenclatura: Pentadecanoic acid, ethyl ester; Ethyl pentadecanoate; n- Pentadecanoic acid ethyl ester. C: Estrutura química 2D, fonte (*PubChem*); CID: 38762; Fórmula:  $C_{17}H_{34}O_2$  ; Peso molecular: 270; SI: 82.

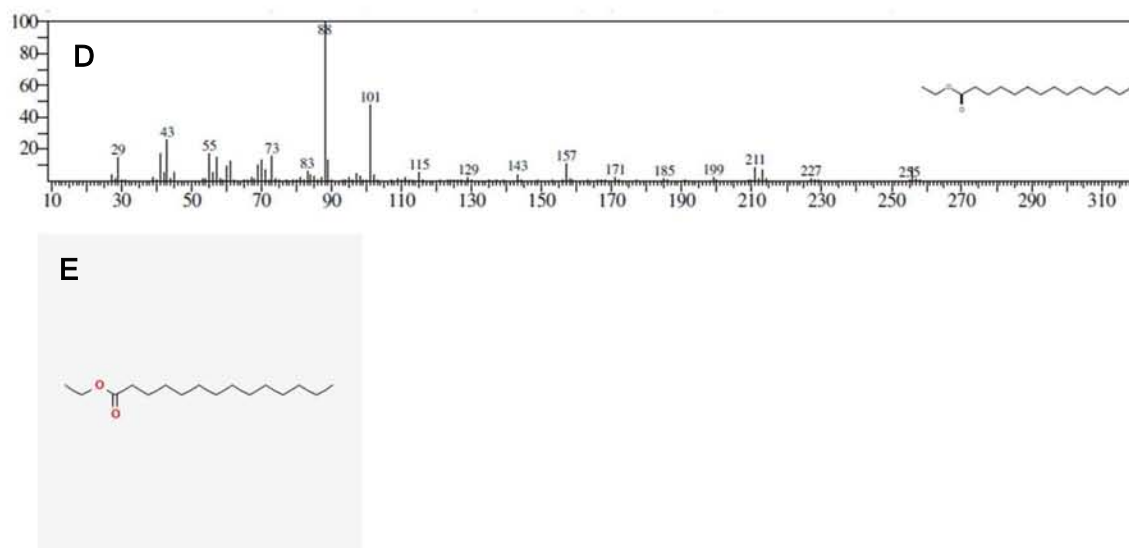


Figura 211. A: Cromatograma fração 7, altura do pico 2: 18,90%; D: Tempo de retenção entre 53.580-53.590; Tempo de retenção específico: 53.586; Nomenclatura: Tetradecanoic acid, ethyl ester; Myristic acid, ethyl ester; Ethyl myristate; Ethyl tetradecanoate; Ethyl ester of tetradecanoic acid ; Ethyl. E: Estrutura química 2D, fonte (*PubChem*); CID: 31283; Fórmula:  $C_{16}H_{32}O_2$  ; Peso molecular: 256; SI: 88.

Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 7 (Fr 07) continuação.

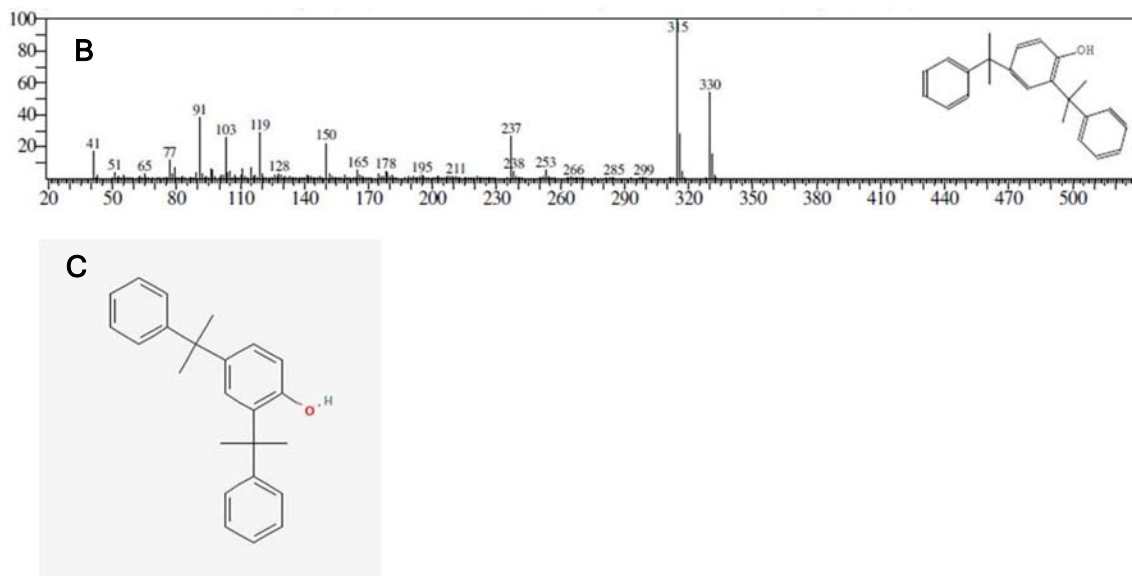


Figura 212. **A**: Cromatograma fração 7, altura do pico 3 (Página 271): 18,54%; : Tempo de retenção entre 61.205-61.215; Tempo de retenção específico: 61.211; Nomenclatura: *Phenol, 2,4-bis(1-methyl-1-phenylethyl); 2,4-Bis (dimethylbenzyl) phenol; 2,4-Bis(1-methyl-1-phenylethyl) phenol***C**: Estrutura química 2D, fonte (*PubChem*); CID: 76013; Fórmula: C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>O ; Peso molecular: 330; SI: 90

Análise das frações por cromatografia gasosa CG-MS, fração 8 (Fr 08)

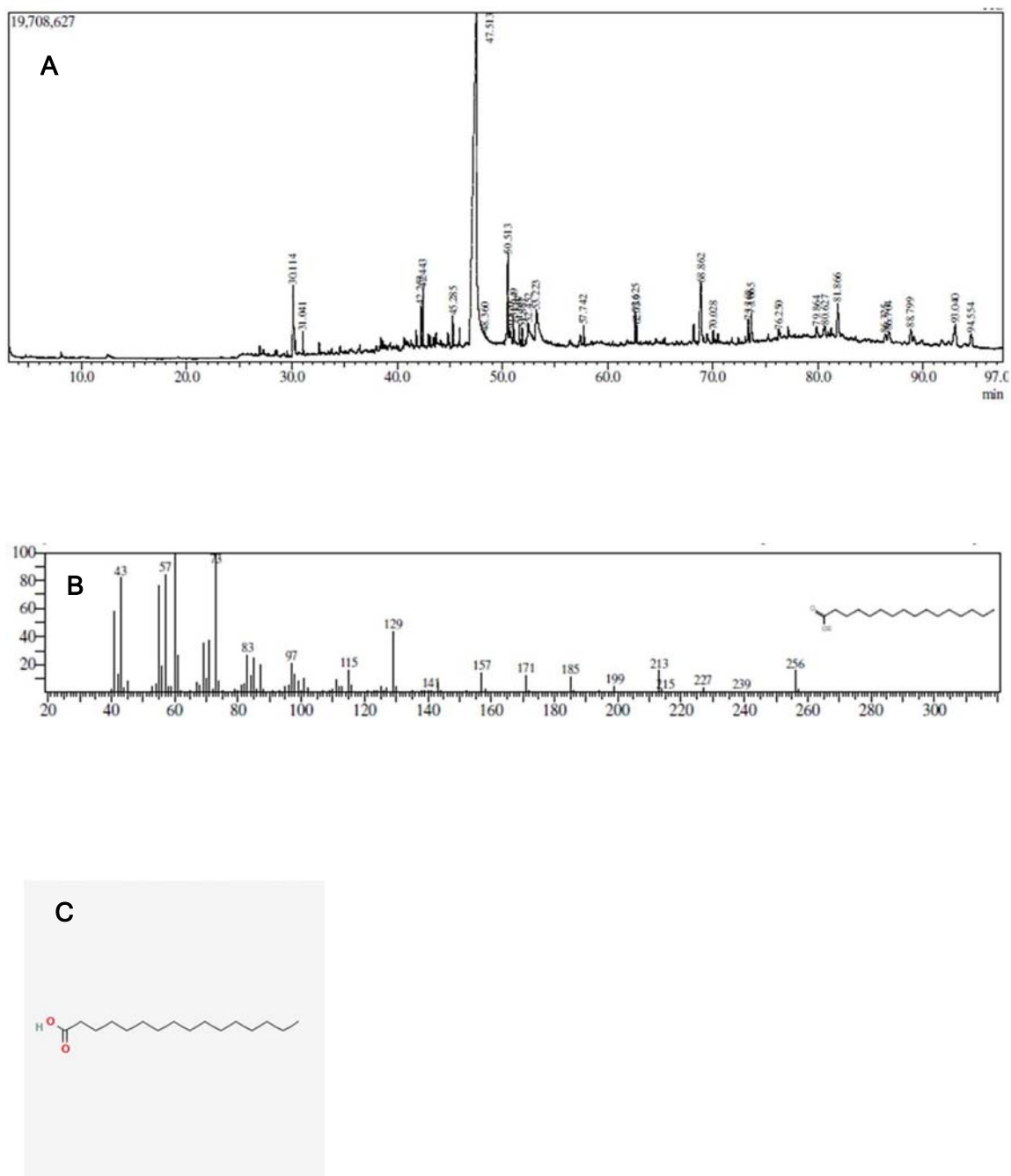
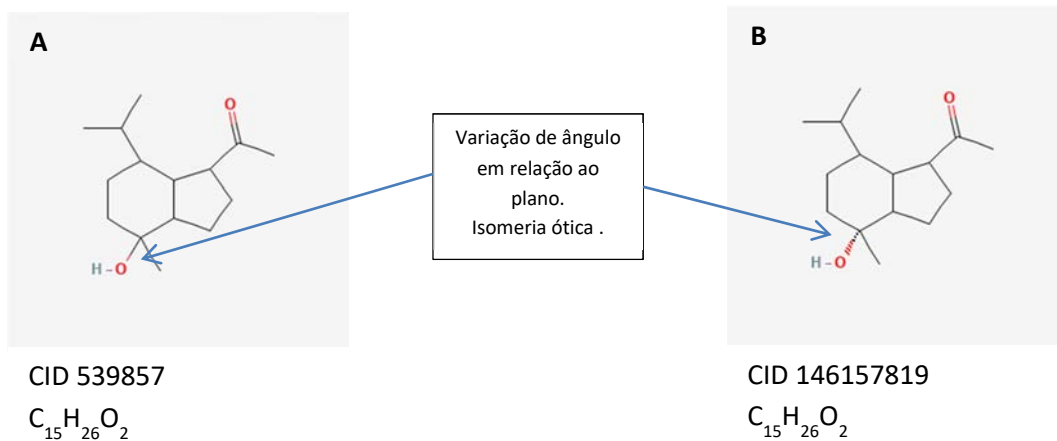
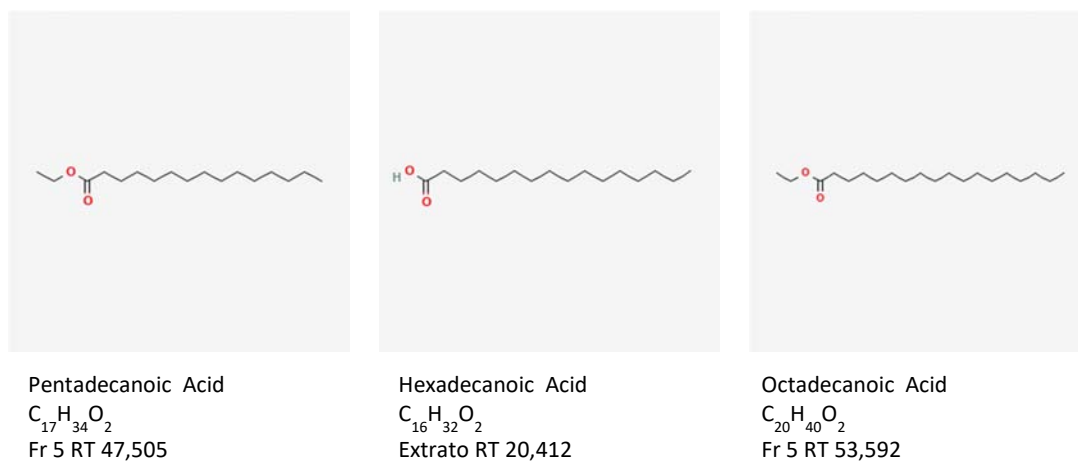


Figura 212. **A**: Cromatograma fração 8, altura do pico: 30,12%; : Tempo de retenção entre 47,510-47,520; Tempo de retenção específico: 47,513; Nomenclatura: *n*-Hexadecanoic acid; Hexadecanoic acid; *n*-Hexadecoic acid; Palmitic acid; Palmitic acid; **C**: Estrutura química 2D, fonte (PubChem); CID: 985; Fórmula: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> ; Peso molecular: 256; SI: 87.

## APÊNDICE C



**Figura 214.** **A:** Obtido no extrato: 4-Hydroxy-7-isopropil-4-methyloctahydro; *Oplopanone*; **B:** Obtido na fração 2: *Oplopanone*.



**Figura 215.** Variações de estruturas químicas de ácidos graxos presentes na fração 5.

## APÊNDICE D

Tabela referente às formulações lipossomais.

Lipossoma em mM	Solução Lipossomal em g	Composto1 em g	Composto 2 em g	Volume final ml
DODAC V 10	DODAC: 0,1173	---	---	20
DODAC V 4	DODAC: 0,047	---	---	20
DODAC V 1	DODAC: 0,0115	---	----	20
DODAC/ArC 10/2	DODAC: 0,12	ArC : 0,012	---	20
DODAC/ArC 10/4	DODAC: 0,1173	ArC : 0,024	---	20
DODAC/ArC 10/8	DODAC: 0,1173	ArC : 0,048	---	20
DODAC/2AEH <sub>2</sub> F/ArC 2/2/2	DODAC: 0,024	2AEH <sub>2</sub> F: 0,006	ArC: 0,012	20
DODAC/2AEH <sub>2</sub> F/Arc 10/4/4	DODAC: 0,1173	2AEH <sub>2</sub> F: 0,0112	ArC: 0,024	20
DODAC/2AEH <sub>2</sub> F 4/4	DODAC: 0,047	2AEH <sub>2</sub> F: 0,0112	----	20
DODAC/2AEH <sub>2</sub> F 10/4	DODAC: 0,1173	2AEH <sub>2</sub> F : 0,0112	---	20

## ANEXO A

Análise do ciclo hídrico do local e período de três meses anterior ao da coleta de *Baccharis dracunculifolia* .

**CLIMATEMPO**  
A StormGeo Company

**SERGIO MESTIERI CHAMMAS**

**Local: São Sebastião da Gramma, SP**

**Fonte: CIIAGRO - São Sebastião da Gramma, SP**

Data	Precipitação (mm)	Data	Precipitação (mm)	Data	Precipitação (mm)
01/01/2020	14.8	01/02/2020	0.8	01/03/2020	0.0
02/01/2020	14.7	02/02/2020	0.3	02/03/2020	0.0
03/01/2020	4.6	03/02/2020	1.5	03/03/2020	0.0
04/01/2020	2.8	04/02/2020	15.7	04/03/2020	0.0
05/01/2020	6.3	05/02/2020	33.6	05/03/2020	0.3
06/01/2020	8.0	06/02/2020	2.8	06/03/2020	0.0
07/01/2020	0.3	07/02/2020	5.0	07/03/2020	0.0
08/01/2020	9.4	08/02/2020	0.0	08/03/2020	1.9
09/01/2020	1.5	09/02/2020	4.6	09/03/2020	0.0
10/01/2020	4.8	10/02/2020	20.7	10/03/2020	0.0
11/01/2020	0.3	11/02/2020	94.6	11/03/2020	3.3
12/01/2020	3.6	12/02/2020	0.3	12/03/2020	0.3
13/01/2020	0.0	13/02/2020	0.0	13/03/2020	0.0
14/01/2020	0.0	14/02/2020	0.0	14/03/2020	0.0
15/01/2020	0.0	15/02/2020	0.0	15/03/2020	0.3
16/01/2020	0.0	16/02/2020	44.0	16/03/2020	26.5
17/01/2020	0.9	17/02/2020	4.6	17/03/2020	2.9
18/01/2020	0.3	18/02/2020	11.8	18/03/2020	0.0
19/01/2020	1.8	19/02/2020	2.3	19/03/2020	1.8
20/01/2020	3.3	20/02/2020	25.4	20/03/2020	0.3
21/01/2020	0.0	21/02/2020	47.9	21/03/2020	12.9
22/01/2020	27.5	22/02/2020	0.0	22/03/2020	0.6
23/01/2020	17.8	23/02/2020	3.0	23/03/2020	0.0
24/01/2020	17.8	24/02/2020	5.3	24/03/2020	0.0
25/01/2020	0.3	25/02/2020	0.3	25/03/2020	0.0
26/01/2020	0.0	26/02/2020	64.9	26/03/2020	0.0
27/01/2020	0.0	27/02/2020	4.1	27/03/2020	0.0
28/01/2020	0.0	28/02/2020	33.2	28/03/2020	0.0
29/01/2020	5.8	29/02/2020	0.0	29/03/2020	15.3
30/01/2020	22.4			30/03/2020	4.5
31/01/2020	2.1			31/03/2020	0.0
<b>TOTAL</b>	<b>171.1</b>	<b>TOTAL</b>	<b>426.7</b>	<b>TOTAL</b>	<b>70.9</b>
<b>NDC</b>	<b>23</b>	<b>NDC</b>	<b>23</b>	<b>NDC</b>	<b>13</b>

**NDC = número de dias com chuva**

Um dia de chuva corresponde a um período de 24 horas com acumulado de pelo menos 0,2 mm de chuva (American Meteorological Society - rain day)

*Bianca Lobo Silva*

Bianca Lobo Silva meteorologista  
CREA: 506384046-1