

Universidade do Vale Do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

CARLOS AUGUSTO PRIANTE DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL À BASE DE *Acmella*  
*oleracea* (L.) R. K. Jansen COM ATIVIDADES CICATRIZANTE,  
ANTIBACTERIANA E ANTITUMORAL

São José dos Campos- SP

2021

**Carlos Augusto Priante da Silva**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL À BASE DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen COM ATIVIDADES CICATRIZANTE, ANTIBACTERIANA E ANTITUMORAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Cristina Pacheco Soares

Co-Orientador: Prof Dr Renato Farina Menegon

São José dos Campos, SP

2021

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Silva, Carlos Augusto Priante da  
Desenvolvimento de biomaterial à base de *Acmella oleracea*  
(L.) R. K. Jansen com atividades cicatrizante, antibacteriana e  
antitumoral / Carlos Augusto Priante da Silva; orientadora,  
Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares; co-orientador Prof. Dr.  
Renato Farina Menegon. - São José dos Campos, SP, 2021.  
1 CD-ROM, 91 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José  
dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

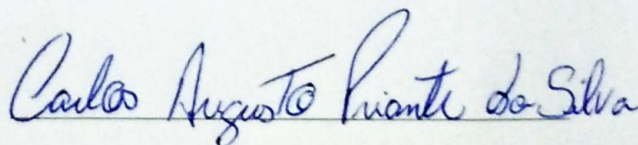
1. Engenharia Biomédica. 2. Materiais Biocompatíveis. 3.  
Quitosana. 4. Asteraceae. I. Pacheco Soares, Profa. Dra. Cristina  
, orient. II. Menegon, Prof. Dr. Renato Farina, co-orient. III.  
Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Carlos Augusto Priante da Silva, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em  
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o  
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado  
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de  
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e  
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 24 de Agosto de 2021.

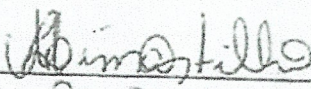
  
Autor(a) da Obra

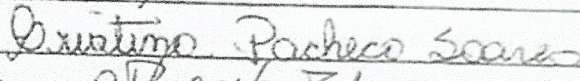
Data da defesa: 25 / 05 / 2021

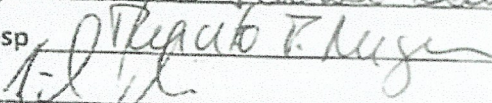
CARLOS AUGUSTO PRIANTE DA SILVA

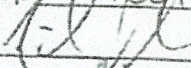
“DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL À BASE DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen COM ATIVIDADES CICATRIZANTE, ANTIBACTERIANA E ANTITUMORAL.”

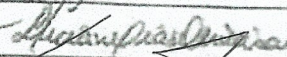
Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

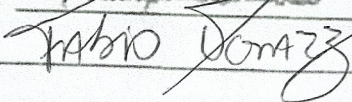
PROF.ª DR.ª MAIARA LIMA CASTILHO 

PROF.ª DR.ª CRISTINA PACHECO SOARES 

PROF. DR. RENATO FARINA MENEGON - Unifesp 

PROF. DR. NEWTON SOARES DA SILVA 

PROF.ª DR.ª LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA - UNESP 

PROF. DR. FABIO FERREIRA PERAZZO - Unifesp 

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 25 de maio de 2021.

## DEDICATÓRIA

“Hoje, ainda almejamos saber por que estamos aqui e de onde viemos. O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa suficiente para nossa busca contínua.”

*Stephen Hawking*

**Dedico este estudo,**

Aos meus pais, Carlos e Adriana.

Obrigado por acreditarem em mim, me direcionando mais ao fundo nesta estrada do conhecimento. Direcionando-me nesta estrada e me mostrando novamente a placa de:

*Siga em frente*

## AGRADECIMENTOS

*Meus agradecimentos a toda minha família que sempre me apoiou e incentivou a continuar batalhando neste mundo complexo da pesquisa acadêmica.*

*Agradeço também aos meus orientadores Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares e Coorientador Prof. Dr. Renato Farina Menegon, em uma parceria que dura 10 anos e que sempre me apoiaram em minhas loucuras, enlouquecendo juntos, minha família de laboratório!*

*Aos Mestres que colaboraram imensamente com este trabalho, com conhecimento e conselhos, com apoio e presença por 10 anos. Eu lhes agradeço Prof. Dr. Newton Soares da Silva e Profa. Dra. Walderez Moreira Joaquim, uma relação para poucos.*

*Á todos os meus amigos de laboratório que em todos estes anos foram e chegaram constantemente mudando a família do laboratório, mas sempre agregando ao conhecimento de vida e pesquisa.*

*Ao Prof. Dr. Milton Beltrame Junior e Profa. Dra. Andreza Ribeiro Simone do laboratório de Síntese Orgânica por disponibilizar seu espaço para parte da realização deste trabalho.*

*Obrigado Joaquim e Sr. Antônio por todo o conhecimento de vida e botânica me passado durante o cultivo das plantas utilizadas neste trabalho.*

*Após 4 anos desta tese e 10 de parceria não cabe e não é possível expressar em uma mera folha todos os agradecimentos e sentimentos que tento expressar!*

*A simplicidade de um café leva a ideias mais malucas e cientificamente precisando de comprovação. Assim começou esta tese...*

*Obrigado por me ajudar a seguir em frente!*

## RESUMO

*Acmella oleracea* popularmente conhecida como jambu, é utilizada na medicina alternativa e culinária popular do Brasil e diversos outros países, tendo diversos metabólitos secundários associados à sua bioatividade, como compostos fenólicos e flavonoides. Estas atividades incluem sua capacidade anestésica, antibacteriana e cicatrizante. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma membrana de quitosana a base do extrato foliar de *A. oleracea* para aplicação médica em feridas superficiais, avaliando sua capacidade antibacteriana, cicatrizante e antitumoral, para indicação no tratamento de câncer epidermóide. O extrato metanólico utilizado foi obtido por maceração assistida por ultrassom e em seguida fracionado com os solventes Acetato de etila e Butanol. A atividade cicatrizante e tóxica das amostras (Extrato bruto, Fração Butanol e Fração Acetato de etila) assim como o biomaterial (Membrana de quitosana, Membrana de quitosana associada ao extrato bruto e Membrana de quitosana associada a fração butanol) foram avaliadas através da capacidade proliferativa em linhagem L929 (fibroblasto de camundongo) e HEp-2 (Carcinoma de laringe humana) por fechamento de ferida *in vitro* e ensaios de citotoxicidade (Cristal violeta e MTT), além de genotoxicidade por teste de micronúcleo. A ação antibacteriana dos extratos e membrana em cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, foi avaliada pela densidade celular e formação unidades formadoras de colônias a partir do contato com o biomaterial. Estes testes mostraram a capacidade do material de aumentar a proliferação celular e atividade mitocondrial e não levar à formação de micronúcleos em linhagem L929 pela fração butanol, não observado o mesmo na fração acetato de etila e extrato bruto, havendo queda da viabilidade neste último. A atividade antitumoral avaliada pelos mesmos testes em linhagem HEp-2 (Câncer de laringe humano) determinou a capacidade citotóxica da fração butanol ao reduzir a densidade celular e atividade mitocondrial, o que também foi observado na fração acetato de etila e extrato bruto principalmente na maior concentração testada de 1000 µg/mL, não havendo o fechamento da ferida *in vitro*. Teste de citotoxicidade com microrganismos determinaram a capacidade dos extratos e frações em evitar infecções oportunistas que forem infligidas por *S. aureus*, sendo todas as amostras eficientes em reduzir o número de bactérias. A fração butanol apresentou um maior rendimento, melhor atividade proliferativa e cicatrizante, não genotóxica e antibacteriana para a cepa *S. aureus* quando comparado ao extrato bruto e fração Acetato de etila. Ao avaliar a ação das membranas por citotoxicidade indireta observa-se o aumento da densidade celular em células L929 quando incubadas com a membrana associada ao extrato bruto em 48 h de incubação e ação citotóxica do biomaterial associado a fração butanol frente ao teste de cristal violeta, porém havendo aumento da atividade mitocondrial em todos os grupos. Em contrapartida há redução na densidade celular do biomaterial contendo extrato bruto em células HEp-2 e baixa da atividade mitocondrial para a célula em todos os grupos. Apenas a membrana com extrato bruto apresentou atividade antibacteriana com redução no número de células e sem nenhuma unidade de colônia formada. Sendo a única membrana também a permanecer liberando seus compostos após 48h de degradação enquanto outras degradaram em 24h, além de não apresentarem formação de poros visto por microscopia eletrônica de varredura. O biomaterial contendo o extrato bruto foi apontado como a mais viável a compor uma membrana que servirá como biomaterial liberador para atuar em casos de feridas cutâneas, induzindo a cicatrização, matando células tumorais testadas e evitando a infecção local.

**Palavras-chave:** Biomaterial, Quitosana, antitumoral, cicatrizante, *Acmella oleracea*, Asteraceae.

## DEVELOPMENT OF BIOMATERIALS BASED ON *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen WITH HEALING, ANTIBACTERIAL AND ANTITUMOR ACTIVITIES

### ABSTRACT

*Acmella oleracea* popularly known as jambu, is used in alternative medicine and popular cuisine in Brazil and several other countries, having several secondary metabolites associated with its bioactivity, such as phenolic compounds and flavonoids. These activities include its anesthetic, antibacterial and healing capacity. Thus, this work aimed to develop a chitosan membrane based on *A. oleracea* leaf extract for medical application in superficial wounds, evaluating its antibacterial, healing and anti-tumor capacity, for indication in the treatment of epidermoid cancer. The methanol extract used was obtained by maceration assisted by ultrasound and then fractionated with the solvents Ethyl acetate and Butanol. The healing and toxic activity of the samples (crude extract, butanol fraction and ethyl acetate fraction) as well as the biomaterial (chitosan membrane, chitosan membrane associated with crude extract and chitosan membrane associated with butanol fraction) were evaluated using the proliferative capacity in line L929 (mouse fibroblast) and HEp-2 (carcinoma of human larynx) by wound closure in vitro and cytotoxicity assays (Crystal violet and MTT), in addition to genotoxicity by micronucleus test. The antibacterial action of the extracts and membrane in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains was evaluated by cell density and formation of colony-forming units from contact with the biomaterial. These tests showed the material's ability to increase cell proliferation and mitochondrial activity and not lead to the formation of micronuclei in L929 lineage by the butanol fraction, not observed in the ethyl acetate and crude extract fraction, with a decrease in viability in the latter. The antitumor activity evaluated by the same tests in HEp-2 line (Cancer of the human larynx) determined the cytotoxic capacity of the butanol fraction by reducing cell density and mitochondrial activity, which was also observed in the ethyl acetate and crude extract fraction mainly in the largest tested concentration of 1000  $\mu\text{g/mL}$ , with no wound closure in vitro. Cytotoxicity testing with microorganisms determined the ability of extracts and fractions to prevent opportunistic infections that are inflicted by *S. aureus*, with all samples being effective in reducing the number of bacteria. The butanol fraction showed a higher yield, better proliferative and healing activity, non-genotoxic and antibacterial for the *S. aureus* strain when compared to the crude extract and ethyl acetate fraction. When evaluating the action of membranes by indirect cytotoxicity, an increase in cell density in L929 cells is observed when incubated with the membrane associated with the crude extract in 48 h of incubation and cytotoxic action of the biomaterial associated with the butanol fraction compared to the violet crystal test, however, there was an increase in mitochondrial activity in all groups. On the other hand, there is a reduction in the cell density of the biomaterial containing crude extract in HEp-2 cells and low mitochondrial activity for the cell in all groups. Only the membrane with crude extract showed antibacterial activity with a reduction in the number of cells and without any colony units formed. Being the only membrane also to remain releasing its compounds after 48 hours of degradation while others degraded in 24 hours, in addition to not having pore formation seen by scanning electron microscopy. The biomaterial containing the crude extract was identified as the most viable to compose a membrane that will serve as a liberating biomaterial to act in cases of skin wounds, inducing healing, killing tested tumor cells and preventing local infection.

**Keywords:** Biomaterial, Chitosan, antitumor, healing, *Acmella oleracea*, Asteraceae.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Acmella oleracea</i> .....	19
Figura 2: Diferentes inflorescências do jambu em Montes Claros- MG (A), Estado do Pará (B) e Cristália-MG (C). .....	20
Figura 3: Estrutura molecular do espilantol. ....	22
Figura 4: Localização de cultivo da planta: CEN-UNIVAP .....	29
Figura 5: Biomaterial em molde para corpos de prova.....	36
Figura 6: Corpos de prova do biomaterial para ensaios biológicos.....	36
Figura 7: Ensaio de Cristal violeta no período de 24 e 48 horas de incubação de células L929 com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol. ....	39
Figura 8: Ensaio de Cristal violeta no período de 24 e 48 horas de incubação de células HEp-2 com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol. ....	40
Figura 9: Ensaio de MTT no período de 24 e 48 horas de incubação de células L929 com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol.....	41
Figura 10: Ensaio de MTT no período de 24 e 48 horas de incubação de células HEp-2 com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol.....	41
Figura 11: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em linhagem L929 .....	42
Figura 12: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em linhagem HEp-2 .....	43
Figura 13: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pela fração Acetato de etila e Butanol no período de 0 horas de incubação.....	45
Figura 14: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pela fração Acetato de etila e Butanol no período de 24 horas de incubação.....	46
Figura 15: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pela fração Acetato de etila e Butanol no período de 48 horas de incubação.....	47

Figura 16: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelo extrato Bruto e pela combinação das frações Acetato de etila e Butanol no período de 0, 24 e 48 horas de incubação.....	48
Figura 17: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelo extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 0 horas de incubação. ....	49
Figura 18: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelo extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 horas de incubação. ....	50
Figura 19: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelo extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 48 horas de incubação. ....	51
Figura 20: Frequência de micronucleos gerados a partir da incubação das frações acetato de etila e butanol na concentração de 1000 µg/mL, por 24 e 48 horas. ....	52
Figura 21: Ensaio de micronúcleo por fluorescência gerados a partir da incubação das frações de jambu por 24 e 48 horas. ....	53
Figura 22: Densidade celular da cepa <i>Escherichia coli</i> avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação.....	54
Figura 23: Produção de biofilme da cepa <i>Escherichia coli</i> avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação. ....	54
Figura 24: Densidade celular da cepa <i>Staphylococos aureus</i> avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação. ....	55
Figura 25: Produção de biofilme da cepa <i>Staphylococos aureus</i> avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação. ....	56
Figura 26: Ensaio de Cristal violeta no período de 24 horas de incubação de células L929 (a) e HEP-2 (b) e em 48 horas de incubação de células L929 (c) e HEP-e (d) com as membranas Quitosana, Butanol e Bruto. ....	57

Figura 27: Ensaio de MTT no período de 24 horas de incubação de células L929 (a) e HEP-2 (b) e em 48 horas de incubação de células L929 (c) e HEP-e (d) com as membranas Quitosana, Butanol e Bruto. ....	59
Figura 28: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em linhagem L929 .....	60
Figura 29: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em linhagem HEP-2.....	61
Figura 30: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 0 horas de incubação em linhagem L929.....	62
Figura 31: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 24 horas de incubação em linhagem L929.....	63
Figura 32: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 48 horas de incubação em linhagem L929.....	64
Figura 33: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 0 horas de incubação em linhagem HEP-2. ....	65
Figura 34: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 24 horas de incubação em linhagem HEP-2. ....	66
Figura 35: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 48 horas de incubação em linhagem HEP-2. ....	67
Figura 36: Frequência de micronucleos gerados a partir da incubação das membranas de quitosana e associadas ao extrato bruto e butanol por 24 e 48 horas em L929.....	68
Figura 37: Ensaio de micronúcleo por fluorescência gerados a partir da incubação das membranas de quitosana e associadas ao extrato bruto e butanol por 24 e 48 horas em L929.....	69

Figura 38: Densidade celular da cepa <i>Escherichia coli</i> avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h. ....	70
Figura 39: Produção de biofilme da cepa <i>Escherichia coli</i> avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação. ....	71
Figura 40: Densidade celular da cepa <i>Escherichia coli</i> avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h. ....	72
Figura 41: Produção de biofilme da cepa <i>Escherichia coli</i> avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação. ....	72
Figura 42: Análise de superfície através de Microscopia eletrônica de varredura.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química em 100 g de folhas de <i>A. oleracea</i> .....	20
Tabela 2: Aplicações terapêuticas e metabólitos secundários responsáveis pela atividade de <i>Acmella oleracea</i> .....	21
Tabela 3: Número de colônias observadas após tratamento com o biomaterial.....	73
Tabela 4: Valores das medias com desvio padrão das medidas de espessura em micrômetro digital.....	75
Tabela 5: Valores em porcentagem de massa das membranas após diluição em PBS.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*A.oleracea: Acmella oleracea*

CEN: Centro de Estudos da Natureza

DMEN: Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil Sulfóxido

HL60: Células de leucemia promielocítica humana

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IP&D: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

L929: Linhagem de células de fibroblasto de camundongo

MCA: Medicina Complementar Alternativa

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

PBS: Solução Salina Tampão Fosfato

RTG: Regeneração Tecidual Guiada

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

*S. oleracea: Spilanthes oleracea*

## ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	OBJETIVOS .....	18
2.1	Objetivo Geral .....	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	Espécie: <i>A. oleracea</i> , jambu .....	19
3.2	<i>A. oleracea</i> : uma aplicação na regeneração tecidual guiada .....	22
3.3	Biomateriais na RTG, um potencial para plantas medicinais.....	24
3.4	Maceração assistida por ultrassom- MAU .....	27
4	METODOLOGIA .....	29
4.1	Cultivo da planta medicinal.....	29
4.2	Processo de extração e fracionamento .....	29
4.2.1	Extração a frio: MAU.....	29
4.2.2	Fracionamento líquido-líquido .....	30
4.3	Linhagem celular .....	30
4.4	Preparação das células para experimentação.....	31
4.5	Teste de cristal violeta.....	31
4.6	Ensaio de MTT .....	32
4.7	Determinação da Genotoxicidade: Teste de micronúcleo.....	32
4.8	Morte celular.....	33
4.9	Ensaio de cicatrização .....	33
4.10.1	Atividade antibacteriana.....	34
4.10.2	Unidades Formadoras de Colônias (UFC) .....	34
4.11	Desenvolvimento do biomaterial .....	35
4.12	Preparação da membrana para ensaios biológicos.....	36
4.13	Caracterização da membrana.....	36
4.13.1	Porosidade e análise de superfície .....	36
4.13.2	Espessura .....	36
4.13.3	Intumescimento e tempo de degradação .....	36
5	RESULTADOS .....	38
5.1	Extratos e frações.....	38
5.1.1	Citotoxicidade e atividade antitumoral .....	38

5.1.1.1	Cristal violeta.....	38
5.1.1.2	Ensaio de MTT .....	40
5.1.2	Morte celular.....	42
5.1.3	Cicatrização .....	44
5.1.4	Genotoxicidade .....	52
5.1.5	Atividade antibacteriana.....	54
5.2	Membranas .....	56
5.2.1	Citotoxicidade e atividade antitumoral .....	56
5.2.1.1	Cristal violeta.....	56
5.2.1.2	MTT .....	57
5.2.2	Morte celular.....	59
5.2.3	Cicatrização .....	62
5.2.4	Genotoxicidade .....	67
5.2.5	Atividade antibacteriana.....	70
5.3	Caracterização do biomaterial .....	73
5.3.1	Análise de superfície: Porosidade.....	73
5.3.2	Espessura .....	74
5.3.3	Intumescimento e tempo de degradação .....	75
6	DISCUSSÃO.....	76
7	CONCLUSÃO.....	84
	REFERÊNCIAS .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos delimita estudos visando a interação entre a célula que compõem um tecido e um material, sendo este então um biomaterial. Este produto segundo Henche (2006) deve restaurar as funções comprometidas e reparar as perdas do tecido em que está associado. Baseando-se em conceitos de biologia e engenharia, há a busca de substitutos funcionais para um tecido danificado (MORENO, 2014; LANGER; VACANTI, 1993).

Dentre as classes de biomateriais se encaixam aqueles que possam atuar no aumento, substituição ou estimulação na regeneração de tecidos e órgãos de maneira temporária ou permanente, base conceitual da regeneração tecidual guiada (RTG) (BRIÃO, 2020; SANTOS, 2012). Entretanto, para que a interação ocorra pelo tempo determinado deve haver biocompatibilidade, ou seja, o material não deverá causar nenhuma resposta negativa como danos ao tecido ou processo inflamatório (MAIA *et al*, 2010).

Esta capacidade de regeneração de um biomaterial pode ser explorada em casos de recuperação tecidual após o tratamento por procedimento cirúrgico de carcinomas epidermóides. Este grupo de neoplasias atinge as células escamosas da camada superior de pele e mucosa, sendo caracterizado pela apresentação de uma lesão depressiva sob uma massa tumoral e estando entre as principais neoplasias que atingem a região de cabeça e pescoço. O tratamento cirúrgico é o mais indicado e, assim como em outros casos de cânceres de pele como o melanoma, necessita de enxertos ou retalhos a fim de recuperação da área lesionada, o que não se torna tão viável visto os efeitos que causam, como depressão e hiperpigmentação (CARVALHO *et al*, 2020; BROETTO *et al* 2012; PARK *et al*, 2011; PEDRON *et al*, 2006).

Assim é de extrema importância que estes materiais tenham suas características e biofuncionalidade estudadas. Dentre os aspectos avaliados estão, suas propriedades mecânicas, elétricas e térmicas (ORÉFICE *et al*, 2006). As normativas que preveem parâmetros para a validação deste biomaterial são geradas, no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e internacionalmente seguindo a ISO 10993-3 e ISO 10993-5 (FERREIRA, 2015).

A produção de biomateriais compostos a partir de plantas medicinais vem aumentando, o que se deve principalmente as variadas capacidades terapêuticas dos vegetais. Grande parte destes materiais são produzidos no exterior e exportados para uso no Brasil a um custo mais elevado, o que contrasta com a imensa flora nativa brasileira com atividade medicinal nativa brasileira. Ao conter um extrato vegetal este material pode também atuar como um sistema

liberador de fármacos, quando estimulado pelo meio em que se encontra, como temperatura, mudanças de pH, ativando a liberação das substâncias pela mudança de conformação ou degradação do biomaterial (STAYTON, 2005).

Dentre as plantas nativas da Amazônia brasileira e espalhado em cultivo por todo o Brasil está a *Acmella oleracea*, popularmente conhecida como jambu, extensamente utilizada na culinária amazônica brasileira e na medicina complementar alternativa por todo o planeta. Diversas patentes, concentradas principalmente na Ásia e América do Norte, vêm sendo registradas a respeito das muitas atividades terapêuticas como anti-inflamatória, anestésica e cicatrizante, além de aplicações cosméticas e farmacêuticas. Este amplo estudo da planta se deve não somente a suas extensas capacidades terapêuticas como também a sua facilidade de cultivo, adaptação ao meio e alto rendimento. Estes estudos visam principalmente seu composto ativo espilantol em aplicações em revestimento interno, porém, poucos utilizam a planta associada à biomateriais visando suas variadas atividades terapêuticas (BORGES; PICH; AMARAL, 2012; FERREIRA, 2013; OLIVEIRA 2013).

As membranas de quitosana estão entre estes biomateriais que são comumente associados a outras substâncias. Estes compostos possuem a superfície eficiente para a adesão celular além de em baixas concentrações serem inertes, não tendo atividades positivas ou negativas como processo alérgico. Este fator permite que estas membranas possam ser associadas a diversas substâncias ativas e estimular atividades como proliferação celular, antimicrobiana, anestésica, dentre outras, além de seu uso em hidrogéis, cimentos e membranas em várias aplicações médicas para cicatrização, osteoindução, combate a microrganismos patogênicos em implantes ou como arcabouço para outros medicamentos (BALDUINO, 2019; PIAIA, 2014; RAVINDRANATHAN *et al*, 2016; JANEGITZ *et al*, 2007).

Neste contexto pode-se concluir que o desenvolvimento de membranas a partir de quitosana que contenham compostos oriundos do extratos vegetais, como o extrato foliar de jambu à suas formulações, é vantajoso pois podem apresentar não só a capacidade anestésica da planta como também sua atividade antimicrobiana, para evitar infecções oportunistas, atividade cicatrizante e antitumoral, sendo aplicável em diversos procedimentos como implantes cirúrgicos, tratamento de feridas e de câncer epidermóide. Além de ter como vantagem seu baixo custo, já que a planta apresenta fácil manutenção e alto rendimento, além de ser parte do grupo de poucos biomateriais que teriam como ação três capacidades terapêuticas combinadas: cicatrizante, antibacteriana e anestésica (ARORA; VIJAY; KUMAR, 2011; FERREIRA, 2013; PRACHAYASITTIKUL *et al*, 2009; MARTINS, 2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo desenvolver uma membrana de quitosana a base do extrato foliar metanólico de *Acmella oleracea* para aplicação médica em feridas superficiais, avaliando sua capacidade antibacteriana, cicatrizante e antitumoral, para indicação no tratamento de câncer epidermóide.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Extrair através da maceração assistida por ultrassom o material foliar metanólico de *Acmella oleracea* para a produção do biomaterial.
- ii. Identificar pelo ensaio de Cristal Violeta a citotoxicidade e ação antitumoral do extrato bruto metanólico após fracionamento líquido-líquido com os solventes Acetato de etila e Butanol, assim como a viabilidade celular através do ensaio MTT em células L929 (fibroblasto de camundongo) e HEp-2 (carcinoma de laringe humana).
- iii. Avaliar a genotoxicidade pela frequência de Micronúcleos das frações obtidas em células de linhagem L929 após incubação com os extratos fracionados.
- iv. Caracterizar o tipo de morte celular induzida em linhagem L929 e HEp-2 após a aplicação das frações por meio de citometria de fluxo.
- v. Aplicar a fração ideal para avaliar por teste de migração a proliferação celular *in vitro*, e assim seu potencial cicatrizante em fibroblastos L929 e carcinoma de laringe HEp-2.
- vi. Desenvolver biomaterial contendo o extrato de *Acmella oleracea* à base de quitosana, incorporando-o a uma formulação determinada pelos testes citotóxicos e genotóxicos.
- vii. Determinar as características qualitativas da membrana, através de microscopia eletrônica de varredura para verificar formação de poros e testes de absorção e liberação de compostos.
- viii. Avaliar o potencial citotóxico das membranas utilizando o teste de Cristal Violeta, Ensaio de MTT e morte celular.
- ix. Identificar, por testes citotóxicos, a concentração do extrato bruto e de suas frações que apresente atividade antibacteriana em cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, avaliando também a unidade formadora de colônias em desenvolvimento após incubação com a membrana.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir a revisão bibliográfica em que este estudo se baseou, a fim de enfatizar a necessidade da introdução das plantas na engenharia de biomateriais e de introduzir a *Acmella oleracea* alvo desse trabalho.

#### 3.1 Espécie: *A. oleracea*, jambu

O jambu, carcará ou agrião-do-Pará como é conhecido no Brasil possui diversas sinonímias como *Spilanthus oleracea*, *Spilanthus acmella* e *Acmella oleracea* (Figura 1). Nativa da Amazônia esta planta perene se adaptou às diferenças climáticas das regiões do Brasil, podendo ser encontrada em cultivo e/ou estudo nos estados do Amazonas, Acre, Pará, Piauí, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina (BORGES; PICH; AMARAL, 2012; CAVALCANTI, 2008).

Figura 1- *Acmella oleracea*



Fonte: autor.

Por diversas vezes a planta teve seu gênero alterado entre *Spilanthus* e *Acmella*, porém R. K. Jansen revisou estes gêneros e categorizou, por estudos morfológicos e cromossômicos, que os gêneros não eram os mesmos, o que dispersa os dados obtidos por pesquisas (MOORE, 1907). Isto ocorreu pois em 1884 Baker utilizou esta ambiguidade de gêneros na obra *Flora Brasiliensis* citando *Spilanthus oleracea* e *Acmella oleracea* apenas como sinonímias, abrindo espaço aos herbários para identificarem algumas espécies destes gêneros apenas como sinonímias (BRINGEL JR, 2007).

Porém, apesar de ser considerado o mesmo vegetal, observa-se a presença de diferentes inflorescências que são alteradas dependendo do clima, esta variação também ocorre no

número e tamanho de suas folhas (Figura 2). Martins *et al* (2012) determinaram que no estado de Minas Gerais o jambu possuía mais folhas e de maiores tamanhos quando comparadas aos indivíduos cultivados no estado do Pará (KOSTER; PHILIPSON, 1950; MARTINS *et al*, 2012).

Figura 2: Diferentes inflorescências do jambu em Montes Claros- MG (A), Estado do Pará (B) e Cristália-MG (C).



Fonte: Adaptado de Martins *et al*, 2012.

Nos estados do norte e nordeste do Brasil é comum seu consumo como PANC (Plantas Alimentícias Não Convencionais), devido a sua valiosa carga nutricional (Tabela 1), em pratos típicos como pato no tucupi e o tacaca, saladas frias, pães e até mesmo em bebidas destiladas como a cachaça. Nestas receitas o jambú é cozido em água fervente, a erva cozida é adicionada ao prato e o caldo do cozimento é desprezado (SAWAKI, 2000; NASCIMENTO, 2012). Na Índia e China a planta também é consumida em salada cozida a vapor e em condimentos e especiarias, respectivamente (BOSH, 2004)

Tabela 1: Composição química em 100 g de folhas de *A. oleracea*.

Conteúdo	Massa (g)
Água	89
Proteínas	1,9
Lipídeos	0,3
Carboidratos	7,2
Fibras	1,3
Cálcio	0,162
Colina	0,020
Ferro	0,004
Fósforo	0,041
Vitamina B1	0,00003
Vitamina B2	0,00021
Vitamina C	0,020
Cinzas	1,6

Fonte: Adaptado de NASCIMENTO, 2012.

Seu uso na MCA (Medicina Complementar Alternativa) e na indústria é estendido a outros países como Índia, Estados Unidos e Japão, onde são registradas a maior quantidade de patentes envolvendo a aplicação em produtos e medicamentos terapêuticos de *Acmella oleracea*. Entre os anos de 2000 e 2017 um total de 24 patentes foram registradas envolvendo a planta, porém somente uma destas patentes é brasileira (ANDRADE, 2016). Este baixo número de patentes e patentes intelectuais registradas demonstram o ínfimo interesse dos países nas diversas atividades terapêuticas do jambu a serem exploradas e o baixo investimento da ciência brasileira em estudar uma planta nativa de grande potencial na medicina.

Apesar de negligenciado o jambu vem reconquistando espaço na indústria e na medicina alternativa, que vem utilizando suas diversas propriedades terapêuticas em produtos voltados principalmente a área da saúde (Tabela 2). Estas variadas atividades medicinais estão intimamente relacionadas a sua composição fitoquímica, que apresenta desde alquilamidas, como o espilantol de atividade antinociceptiva, a compostos fenólicos antioxidantes em suas folhas e inflorescências.

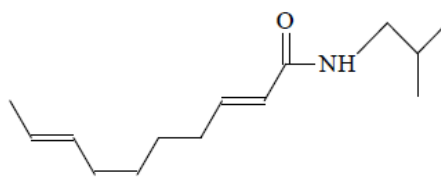
Tabela 2: Aplicações terapêuticas e metabólitos secundários responsáveis pela atividade de *Acmella oleracea*.

<b>Aplicação</b>	<b>Metabólitos associados</b>	<b>Partes Usadas</b>	<b>Frações</b>	<b>Referência</b>
Estomatites (Anestésico)	Espilantol	Folhas e Inflorescências	Bruto (etanólico)	(WU <i>et al.</i> , 2008)
Afecções de boca e garganta (Anestésico)	Espilantol	Folhas e Inflorescências	Bruto (etanólico)	(WU <i>et al.</i> , 2008)
Antimalárico	Espilantol	Inflorescências	Bruto (metanólico)	(MBEUNKUI <i>et al.</i> 2011)
Diurética	Alcaloides	Inflorescências	Bruto (água destilada)	(RATNASOORRIYA <i>et al.</i> , 2004).
Anti-inflamatório	Flavonoides	Folhas	Bruto (água destilada)	(CHAKRABORTY <i>et al.</i> 2010)
Antipirético	Flavonoides	Folhas	Bruto (água destilada)	(CHAKRABORTY <i>et al.</i> 2010)
Antibacteriana	Flavonoides, taninos	Folhas	Acetato de etila e Metanol	(ARORA; VIJAY; KUMAR, 2011).
Antifúngica	Compostos fenólicos	Folhas	Clorofórmio e Hexano	(PRACHAYASITTIKUL <i>et al.</i> , 2009)
Antioxidante	Compostos fenólicos	Folhas	Acetato de etila, Hexano, Clorofórmio e Metanol	(PRACHAYASITTIKUL <i>et al.</i> , 2009)
Antiobesidade	Não especificado	Inflorescências	Bruto	(EKANEM <i>et al.</i> , 2007)
Gastroprotetor	Polissacarídeo.RGal	Folhas	Bruto	(FERREIRA, 2013)

Fonte: autor

Dentre seus compostos bioativos, o espilantol (N-2- metilbutil-2E,6Z,8E-decatrienamida) (Figura 3) gera um amplo interesse pelas indústrias de cosméticos e farmacêutica, sendo utilizado como coadjuvante em cremes faciais rejuvenescedores, xampus, cremes estimuladores sexuais, enxaguantes bucais e cremes dentais para fins antimicrobianos (ALCANTARA *et al*, 2014; SUDEVAN *et al*, 2015; BARBAS *et al*, 2016; CAVALCANTI, 2008; BECKER, 2012; LEY; KRAMMER; BERTRAM, 2005; VILLACHICA *et al*, 1996).

Figura 3: Estrutura molecular do espilantol.



Fonte: Cavalcanti (2008).

A corrida por patentes aumentou a procura por novidades a respeito das capacidades de uso de *A. oleracea*, suas propriedades medicinais há muito estudadas foram aplicadas a necessidades industriais. A nova busca por materiais para uso em procedimentos cirúrgicos trouxe as plantas medicinais como o jambu de volta ao interesse da área da saúde. Os biomateriais já amplamente pesquisados e desenvolvidos foram unidos às capacidades terapêuticas de plantas medicinais criando uma classe de tratamentos fitoterápicos.

### 3.2 *A. oleracea*: uma aplicação na regeneração tecidual guiada

A Regeneração Tecidual Guiada (RTG) foi desenvolvida a partir de estudos na área da cicatrização periodontal realizados por Melcher (1976) e Nyman (1982). Foi evidenciado que dentre os tecidos periodontais como o tecido conjuntivo, tecido epitelial da gengiva, tecido ósseo alveolar, ligamento periodontal e cimento, os dois primeiros são de fácil regeneração após lesão, enquanto os três últimos precisam de mais tempo para recuperação total (MORAES, 2002).

Sendo assim, utiliza-se a RTG na periodontia para facilitar a neoformação e reconstituição da região lesionada dos tecidos em casos de doença periodontal, com auxílio de membranas que atuem como barreiras físicas e evitem o contato de células epiteliais e conjuntivas,

permitindo a cicatrização e recuperação ideal da injúria bucal e podendo ser extrapoladas para lesões cutâneas (REIS *et al*, 2012; DELIBERADOR *et al*, 2008).

Machtei (1994) determinou fatores favoráveis a RTG como a presença de células conjuntivas na face interna das membranas ao invés de células bacterianas e biofilme, higiene oral adequada e uma terapia antimicrobiana associada a RTG, em conjunto estes fatores auxiliam uma melhor cicatrização e recuperação.

Após uma lesão cutânea ou um procedimento cirúrgico como na implantodontia é necessário, assim como na doença periodontal, um maior tempo para regeneração tecidual e recuperação óssea e tegumentar, acaba por facilitar infecções oportunistas geradas pela microbiota local. Torna-se então importante o desenvolvimento e uso de um biomaterial, como uma membrana, que atue como uma barreira física na RTG e que preferencialmente possa servir como estimulador da cicatrização.

O mesmo é necessário em casos de tratamento de câncer epidermóide em área bucal e tecidos externos. Este tipo de câncer ocorre por anormalidades em células epiteliais de pele ou mucosa, sendo muito comum em casos de cânceres de boca e de pele não melanoma. Enquanto o câncer de boca acometeu, no último biênio, aproximadamente 14.700 pessoas, sendo 11.200 homens e 3.500 mulheres, o câncer de pele não melanoma afligiu cerca de 165.580 pessoas entre 85.170 homens e 80.140 mulheres. Os números de mortes relacionadas entre estes cânceres são inversamente proporcionais a quantidade de casos registrados, sendo 5.898 mortes relacionadas ao câncer de boca e 1.958 ao câncer de pele não melanoma (INCA, 2019).

Para ambas as neoplasias o tratamento de radioterapia associado a cirurgia é o mais indicado. Em estágios iniciais I e II a cirurgia indicada é suficientemente eficaz como tratamento, sem grandes alterações estéticas ao paciente. Porém em estágios mais avançados como III e IV além da radioterapia e cirurgia mais invasiva, outros procedimentos estéticos corretivos ao ferimento deixado pelo tratamento são necessários (PEDRON *et al*, 2006).

Neste âmbito se encaixa a RTG em associação com plantas medicinais, com a utilização de membranas compostas por extratos bioativos como barreira e auxiliadora à cicatrização, antimicrobiana e anti-inflamatória, recuperando o tecido e evitando a possível infecção por microrganismos oportunistas.

Dentre as amplas atividades terapêuticas de *Acmella oleracea* estão as capacidades cicatrizante e antimicrobiana. Como evidenciado por Lima e Almeida (2014) o jambu atua significativamente na cicatrização *in vivo* em camundongos com feridas cutâneas e, segundo

Ferreira (2013), a planta também favoreceu a proliferação celular do tecido ulcerado, atuando como gastroprotetor.

Além de atuar como cicatrizante o extrato de *A. oleracea* também age como anti-inflamatório e analgésico local (GREGER, 2016; CHAKRABORTY *et al.* 2004). Yamane (2016) ao macerar as folhas originando o extrato etanólico de jambu caracterizou o uso do mesmo em membranas para uso em feridas cutâneas. A membrana continha espilantol proveniente da maceração e assim atuou como antinociceptiva, além de estimular a produção de colágeno acelerando o processo de cicatrização da pele.

Andrade (2016) determinou em testes para a validação de uma solução contendo o extrato foliar de jambu para uso como analgésico e antimicrobiano em venopunção, reduziu significativamente a sensibilidade local e o número de microrganismos quando testados em humanos.

Utilizando eluentes com graus crescentes de polaridade, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, Prachayasittikul *et al.* (2009) através de cromatografia em coluna de sílica gel determinaram a eficiência no uso da planta como antioxidante e antimicrobiana, neste estudo o extrato de jambu agiu como antimicrobiano apesar de não apresentar efeitos citotóxicos. Estes resultados podem estar associados a presença de flavonóides e taninos encontrados nas frações Acetato de etila e Metanol do extrato foliar de sua sinonímia *Spilanthes acmella* (ARORA; VIJAY; KUMAR, 2011).

Além destas capacidades terapêuticas que evidenciam a vantagem no uso desta planta como componente de um biomaterial que possa ser utilizado na RTG, o jambu também apresenta um fácil cultivo e alto rendimento, se adaptando a diferentes climas e com um desenvolvimento em apenas 2 a 3 meses (ALBURQUERQUE, 1989; VILLACHICA *et al.*, 1996; CAVALCANTI, 2008; BORGES, 2009).

### **3.3 Biomateriais na RTG, um potencial para plantas medicinais**

Com a grande variedade de classes de biomateriais e suas utilizações vem observando-se uma maior frequência de menções à produção de biomateriais associados a compostos a partir de plantas medicinais e isso se deve principalmente às diversas capacidades terapêuticas dos vegetais.

Biomateriais podem ser definidos como dispositivos formados por constituintes sintéticos ou naturais capazes de interagir como sistemas biológicos, influenciando-os. A versatilidade na composição destes materiais permite sua utilização com diversos objetivos como

cirúrgicos, diagnósticos ou terapêuticos. Como exemplos de biomateriais utilizados atualmente temos as suturas, placas, válvulas cardíacas, tendões, biossensores, próteses, implantes, lentes, etc (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

A evolução desses biomateriais acompanhou o desenvolvimento tecnológico da sociedade. Há 2000 a.C no Egito já se utilizava suturas feitas a partir de linho e sendo feitas com intestinos de animais na Idade Média. Próteses dentárias também foram produzidas desde a antiguidade (600 a.C) a partir de diversos materiais como ouro, prata e ferro (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Com a evolução da tecnologia, diversas classes de biomateriais se originaram, sendo constituídos por diversas substâncias. Os cimentos, hidrogéis, membranas e filmes foram produzidos a partir de polímeros variados, metais, etc. O que todos estes biomateriais necessitam ter em comum para aplicação médica é sua biofuncionalidade e biocompatibilidade, cada classe com suas vantagens e desvantagens.

Em alguns casos clínicos como preenchimento do alvéolo dentário após exodontia ou em perda ou comprometimento de tecido ósseo são utilizados biomateriais que possam favorecer a estimulação da proliferação celular e assim a regeneração tecidual, atuando como um biomaterial osteoindutor, o mesmo sendo necessário após determinadas cirurgias de tratamento de cânceres superficiais que deixam cicatrizes no paciente (MEDEIROS *et al*, 2016; PEDRON *et al*, 2006).

Estes materiais possuem ampla aplicação, já que suas características mecânicas, elétricas e térmicas conferem ao biomaterial os aspectos necessários para sua aplicação em específico. Assim faz-se necessário um padrão no estudo e produção destes materiais. No Brasil esta padronização é gerida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e internacionalmente seguindo a ISO 10993-3 e ISO 10993-5 (FERREIRA, 2015; ORÉFICE *et al*, 2006).

Além de testes físicos, testes biológicos devem ser realizados a fim de comprovar não só sua eficácia de sua aplicação, como também um possível efeito adverso dentro de seu tempo de ação e degradação (CAO; WANG, 2009).

A ampla aplicação dos biomateriais dependente de sua composição aumenta ainda mais se adicionados extratos vegetais de capacidade terapêutica à sua formulação. Quando adicionado um extrato vegetal ao biomaterial, seja qual for sua classe, este passa a apresentar suas atividades medicinais, já previamente estudadas, sendo o biomaterial passa então a ser considerado um sistema liberador de fármacos. Ao interagir com o produto o extrato será liberado dependente das propriedades mecânicas citadas, sendo estimulado por mudanças de

temperatura, pH, umidade, etc, do meio em que se encontra enquanto há a degradação do biomaterial (STAYTON, 2005).

Os cimentos citados anteriormente são pertencentes aos grupos de biomateriais que devem oferecer não somente a osteoindução como também biocompatibilidade, biodegradação e osteocondução e são comumente associados a compostos de origem vegetal. Testes de citotoxicidade e genotoxicidade são testes iniciais realizados *in vitro* para a validação do produto a ser usado *in vivo* (ROGERO *et al*, 2003).

Destacando-se para a cultura celular *in vitro*, os hidrogéis são a melhor classe de biomaterias para estudos por apresentar uma rede de poros interligados, retendo substâncias e permitindo melhor transporte de oxigênio, nutrientes e resíduos (DRURY; MOONEY, 2003; TIBBITT; ANSETH, 2009; KLEMM *et al*, 2001; RECOUVREUX *et al*, 2011).

As membranas ou *scaffolds* de colágeno, quitosana, etc possuem a superfície eficiente para adesão celular, o que pode, associada a diversas substâncias ativas, estimular atividades como proliferação celular, dentre outras. Esta característica pode permitir seu uso em várias aplicações médicas como para cicatrização, osteoindução, combate a microrganismos patogênicos em implantes ou como arcabouço para outros medicamentos (PIAIA, 2014). Como exemplo de biomaterias poliméricos formados a partir de colágeno há as biopróteses de válvulas cardíacas, as resinas utilizadas em restauração dentária e os hidrogéis aplicados sob a pele em casos de queimadura (ORÉFICE *et al*, 2012).

Em casos de regeneração tecidual guiada (RTG) as membranas podem ser utilizadas para reconstituição de novo tecido e como barreira de proteção física da região. Esta barreira irá prevenir o aparecimento de outros tecidos na região. Sendo então ideal para procedimento diversos procedimentos e tratamentos que requerem regeneração rápida e prevenção à infecção (GERZSON *et al*, 2016).

Oliveira (2013) após um estudo de desenvolvimento de metodologias de produção de membranas determinou a eficiência das membranas formadas por associação da quitosana com gelatina e glicerina, principalmente quando reticuladas por vapor, caracterizando sua flexibilidade e facilidade de manuseio, indicando seu uso para a RTG.

Para um biomaterial ter vantagens em seu uso na RTG é necessário também que apresente a capacidade de ser absorvido ou não, dependendo da finalidade de seu uso. Na regeneração tecidual guiada as membranas reabsorvíveis se tornam vantajosas ao proporcionar mais conforto ao paciente, não necessitam de um procedimento cirúrgico para sua retirada e menor complicação clínica (DELIBERADOR *et al*, 2008). Dentre estes materiais reabsorvíveis se

encontram a quitosana e o colágeno, suas membranas devem ter absorção acima de 8 a 12 semanas (REIS; BORGES; OLIVEIRA, 2012).

Ainda que o Brasil possua uma riqueza quase inequívoca em sua flora nativa, o investimento em pesquisas envolvendo plantas medicinais e seus compostos na área da biotecnologia é baixo quando comparado à países pesquisadores de menor flora. Pode-se citar como exemplo a *Hevea brasiliensis*, da qual é extraído o látex natural e utilizado para a produção da membrana de látex. Este biomaterial de grande biocompatibilidade passa a agir como estimulante da angiogênese, cicatrização, facilitador da adesão celular, podendo ser utilizadas em tratamentos para queimadura (HERCULANO *et al*, 2009; ANDRADE *et al*, 2011).

Pode-se citar também como potencial uso terapêutico a *Dysphania ambrosioides*, nativa brasileira, utilizada como aditivo ao biomaterial sintetizado a partir de quitosana, com o intuito de estimular a cicatrização óssea alveolar (MEDEIROS *et al*, 2016).

Para a associação ideal de um extrato originário de plantas medicinais à um biomaterial é necessário a melhor escolha do método extrativo, preferencialmente um que não degrade em excesso os componentes bioativos e que possa gerar um maior rendimento final tornando viável sua produção.

### **3.4 Maceração assistida por ultrassom- MAU**

O método de extração empregado pode alterar a constituição química dos compostos extraídos, conferindo maior seletividade àqueles de interesse, abrangendo métodos de extração contínua a quente por *Soxhlet*, ou ainda por fluído supercrítico, turbólise, infusão, percolação, decocção e maceração, podendo esta ser assistida por microondas ou ultrassom. Estes fazem uso de diferentes fatores como uso de calor ou irradiações, o que pode definir a eficiência do extrato para uso terapêutico e seu rendimento ideal (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009; LIDIA *et al*, 2017; CALGARO *et al*, 2017; FERNÁNDEZ *et al*, 2018; KUSUMA; ALTWAY; MAHFUD, 2018; TIWARI *et al*, 2011).

De fácil manuseio de equipamento, a maceração assistida por ultrassom (MAU) consiste numa técnica extrativa onde o material vegetal sólido se mantém em contato com o solvente extrator em um ambiente controlado, definindo-se a temperatura e tempo de extração (KLEJDUSA *et al*, 2009; GARCIA-SALAS *et al*, 2010).

A técnica se baseia em um fenômeno conhecido como cavitação, onde colisões levam à lise celular liberando seu conteúdo, como os compostos bioativos, diminuindo o tempo necessário para extração e a quantidade de solvente envolvido (CASTRO; CAPOTE, 2007; CHEMAT; HUMA; KHAN, 2011; VILKHU *et al*, 2008).

A MAU tem sido utilizada como alternativa ao método extrativo a quente por *Soxhlet*, apresentando melhor rendimento e menor decomposição dos componentes químicos. Este método demonstra também maior rendimento em extração de compostos orgânicos como gorduras e compostos fenólicos, utilizando-se principalmente água, álcool, ou suas misturas como solventes polares (CASAZZA *et al*, 2010; LUQUE-GARCÍA, LUQUE DE CASTRO, 2003; ESCRIVÁ *et al*, 1994; BISCAIA, 2007; ROCKENBACH *et al*, 2008).

A combinação de um método extrativo, com eficiência e melhor rendimento, e os compostos bioativos extraídos de uma planta medicinal nativa brasileira comumente utilizada na medicina alternativa e culinária popular à um biomaterial polimérico a base de quitosana, já amplamente conhecida por suas atividades, pode ampliar as atividades terapêuticas já conhecidas da planta e assim agregar ao estudo da RTG.

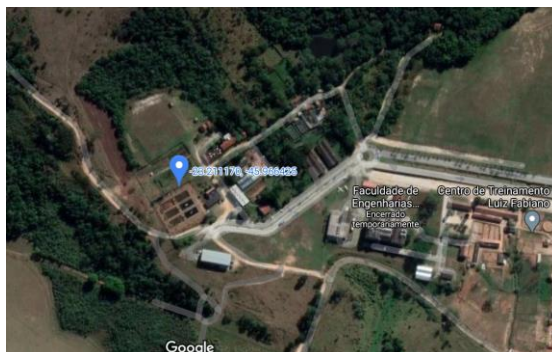
## 4 METODOLOGIA

A seguir os protocolos experimentais que este estudo utilizou para a obtenção de seus resultados.

### 4.1 Cultivo da planta medicinal

O semeio da planta ocorreu em estufa associada a um sistema de irrigação e de equipamento de sombrite para garantir o suprimento necessário de água e luz adequado para o desenvolvimento das plantas. Estas estufas estão localizadas no Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) em São José dos Campos-SP (Figura 4) com temperatura variando entre 17 e 29,5 °C no primeiro semestre de 2017. A identificação da planta foi realizada pela Profa. Dra. Renata Jimenez de Almeida Scabbia da Universidade Mogi das Cruzes (UMC) e depositada no Herbarium Mogiense (UMC) com o registro: HUMC 6847.

Figura 4: Localização de cultivo da planta: CEN-UNIVAP



Fonte: Google maps.

### 4.2 Processo de extração e fracionamento

#### 4.2.1 Extração a frio: MAU

Com a co-orientação do Prof Dr Renato Farina Menegon a extração assim como caracterização fitoquímica do extrato foi realizada no Laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos da Unifesp-Diadema. Para a extração foram colhidas folhas de *Acmella oleracea*, após estas atingirem sua fase adulta, este material foi seco em estufa a 50 °C até que a variação do peso atingir 10 a 15% do peso fresco. As folhas foram, então, pulverizadas em almofariz e em seguida extraídas usando o método de Maceração Assistida por Ultrassom (MAU) em

proporção de 1g de matéria seca para cada 10 mL de solvente Metanol 90% durante 60 minutos de maceração em equipamento ultrassônico ajustado em 40% de potência de 2000 watts, sendo a energia total transferida para o sistema quantificada pelo próprio aparelho. Após o término da extração por ultrassom o material ficou em maceração por 7 dias, completado este período o solvente foi evaporado sob pressão reduzida utilizando-se de aparelho rotaevaporador (Büchi) e em seguida distribuído em placas de Petri e alocados em estufa à 50°C para a secagem final.

#### **4.2.2 Fracionamento líquido-líquido**

O extrato bruto obtido foi ressuspenso em 20 mL de água destilada, filtrado e fracionado utilizando um funil de separação de 150 mL. Neste funil foram adicionados 20 mL de acetato de etila, agitando-se e aguardando a separação das fases. A fase orgânica foi separada e armazenada em um erlenmeyer de 100 mL. A fração aquosa foi retornada ao funil, e extraída da mesma forma por mais duas vezes, juntadas no erlenmeyer, formando a Fração Acetato de etila.

A fração aquosa foi novamente extraída, agora empregando-se o n-butanol como líquido extrator, seguindo o mesmo procedimento já descrito para a fração acetato de etila, obtendo-se, assim, a Fração n-butanólica.

Ao término de todas as extrações foram adicionados 0,5 g de sulfato de sódio anidro nas fases orgânicas para remover vestígios de água, após dez minutos as frações finais foram filtradas e secas em rotaevaporador. Após a secagem as frações foram armazenadas em freezer a -20 °C. Estes extratos secos foram diluídos em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB e 1% de antibiótico para ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares animais e diluídas em meio de cultura Luria Broth pra cepas bacterianas estudadas, sendo calculadas as concentrações para aplicação nas células já testadas em trabalhos anteriores de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL, com atividade citotóxica previamente avaliada e de melhor atividade cicatrizante determinada (PRIANTE-SILVA, 2015).

#### **4.3 Linhagem celular**

As linhagens celulares L929 (Fibroblasto de Camundongos, ATCC CCL-1) e HEp-2 (Carcinoma de Laringe Humano, ATCC CCL-23) utilizadas nos experimentos estão relacionadas a diversos estudos e pesquisas sobre citotoxicidade e alterações morfológicas

celulares. Estas linhagens foram obtidas a partir do Instituto Adolfo Lutz - Seção de Cultura Celulares (SP) e propagadas no laboratório de Dinâmica e Compartimentos Celulares, localizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

As células foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (TPP, Switzerland) com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco BRL) e 1% de antibiotico e antimicótico (Gibco BRL) e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Este meio foi trocado a cada dois dias.

#### **4.4 Preparação das células para experimentação**

Para a realização dos experimentos as células foram removidas das garrafas de culturas e passadas para placas de cultura de 24, 48 ou 96 poços (TPP, Switzerland), dependendo do teste realizado em um número experimental e amostral de 3 e 5 respectivamente.

Nesta remoção foi adicionada tripsina para que as células se destacassem da garrafa de cultura e centrifugadas em tubo Corning® de 15 mL. Descartou-se o sobrenadante e em seguida ressuspendeu-se o pellet formado, desta suspensão foram retirados 10 µL para ser realizada a contagem do número de células em câmara de Neubauer. Foi então calculada a concentração de células, em volume de 10<sup>5</sup> células, e meio de cultura necessários para diferentes concentrações da futura aplicação dos extratos.

Após plaqueadas, as células foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para a devida aderencia. Em seguida às células, foram adicionados os extratos e suas frações em concentrações crescentes de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL (dependente de cada ensaio), em seguida estas voltam a ser incubadas em estufa a 37 °C por períodos de 24 e 48 horas (dependente de cada ensaio).

#### **4.5 Teste de cristal violeta**

Após o plaqueamento em placas de 48 poços e incubação com extrato por 24 e 48 h nas concentrações de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL, foram adicionados nos poços a solução de coloração de Cristal Violeta (Sigma®) a 5% por 3 minutos. Decorrido este tempo as placas foram lavadas em água corrente por 2 minutos. Por fim adicionou-se a solução de eluição de SDS a 1%, por 1 hora em temperatura ambiente.

A leitura da absorbância das placas foi feita em espectrofotômetro a 570 nm (Elisa Spectracount, Packard, EUA). A análise estatística deu-se pelo teste ANOVA em GraphPad Prism<sup>®</sup> 6 com Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +. Sendo os valores obtidos transformados em porcentagem pela equação:  $(\text{Absorbância do Controle} - 0,045) / (\text{Absorbância do Amostra} - 0,045) * 100$ , onde 0,045 representa a leitura de absorbância de um poço da placa sem amostra.

#### **4.6 Ensaio de MTT**

Para ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma<sup>®</sup>) seguiu-se o protocolo de plaqueamento, citado no subtópico 4.4, a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poços em placas de 48 poços. Foram então adicionadas sobre as culturas de células, cultivadas em triplicata, as diluições do extrato em suas diferentes concentrações e um somente de células, constituindo o grupo controle. As culturas foram incubadas com as diluições por períodos de 24 horas.

Após a incubação os poços foram lavados com PBS, a seguir foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) diluído em PBS. As células foram incubadas por 60 minutos a 37 °C em estufa. Posteriormente foram adicionados às placas 200  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma<sup>®</sup>) por poço, e agitadas por 60 minutos para diluição dos cristais de formazan. A leitura da absorbância das placas foi feita em espectrofotômetro a 570 nm (Elisa Spectracount, Packard, EUA). A análise estatística deu-se pelo teste ANOVA em GraphPad Prism<sup>®</sup> 6 com Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +. Sendo os valores obtidos transformados em porcentagem pela equação:  $(\text{Absorbância do Controle} - 0,045) / (\text{Absorbância do Amostra} - 0,045) * 100$ , onde 0,045 representa a leitura de absorbância de um poço da placa sem amostra.

#### **4.7 Determinação da Genotoxicidade: Teste de micronúcleo**

Neste teste utilizou-se a concentração ideal, previamente determinada por testes citotóxicos, de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de cada extrato e fração, utilizando a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  como comparação para os resultados obtidos.

Para a realização da análise da integridade do núcleo e a possível presença de micronúcleos, as linhagens em estudo foram marcadas com DAPI (4', 6- Diamidino - 2 - fenilindol) diluído em PBS na concentração de 300 nM. As células plaqueadas separadamente a uma densidade

de  $2 \times 10^5$  por poços em placas de 24 poços possuem em cada poço 400  $\mu\text{L}$  de meio DMEM (com 10% de SFB e de 1% antibiótico e antimicótico) e as devidas concentrações de extratos, tendo como controle para formação de micronúcleo poços incubados com EMS (Metano Sulfonato de Etila), além de células incubadas sem a adição de extrato vegetal. Após a incubação a citocalasina B foi adicionada sob os poços para interromper a divisão celular. E então retirado o meio de cultura e os poços lavados com PBS, sendo em seguida adicionado 100  $\mu\text{L}$  de DAPI incubando por 5 minutos, após a retirada do corante as células foram lavadas duas 2 vezes com 100  $\mu\text{L}$  de PBS. A visualização foi feita através de Microscópio Óptico Leica DMIL, com câmera CCD- Leica DFC310. A análise estatística deu-se pelo teste ANOVA em GraphPad Prism<sup>®</sup> 6 com Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

#### **4.8 Morte celular**

Para a análise do tipo de morte induzida, apoptose ou necrose as células foram marcadas com Kit apoptose contendo Anexina V, Iodeto de Propídeo e Tampão Anexina. Para o teste, as células foram plaqueadas separadamente a uma densidade de  $1 \times 10^5$  por poços em placas de 24 poços. Em cada poço contendo 400  $\mu\text{L}$  de meio DMEM (com 10% de SFB e de 1% antibiótico e antimicótico). Após a incubação com o extrato ou membrana diluída e com estaurosporina como grupo positivo para morte as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de formoldeído em 1% de PBS e incubadas sob gelo por 15 min. Decorrido o tempo foram centrifugadas novamente, descartando o sobrenadante e adicionados 500  $\mu\text{L}$  de PBS para lavagem, sendo centrifugadas novamente para descarte da solução e ressuspensas em 1 mL de etanol 70% a  $-20$  °C em *overnight*. Após este período foi adicionado nestas células 5  $\mu\text{L}$  Anexina V para cada 100  $\mu\text{L}$  de tampão utilizados, incubando por 20 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas, descartando o sobrenadante, e marcadas com 1  $\mu\text{L}$  de Iodeto de Propídeo, incubando por 5 minutos. Os dados foram obtidos por análise em citômetro de fluxo (Citômetro Accuri C6-BD) e analisados por software FCS Express 7 Research Edition.

#### **4.9 Ensaio de cicatrização**

Para avaliar a capacidade de cicatrização celular, através do aumento da proliferação e migração celular, as linhagens estudadas foram plaqueadas em  $5 \times 10^5$  célula em placa de 24 poços. Após incubação por 24 h em estufa à 5% CO<sub>2</sub> e 37°C com meio de cultura DMEM (com 10% de SFB e de 1% antibiótico e antimicótico), foi realizada uma injúria na monocamada utilizando uma ponteira de 200 µL em linha reta na região central de cada poço. Em seguida adicionada as concentrações dos extratos vegetais, permanecendo o grupo controle (sem a adição do extrato). Após os períodos de incubação de 0, 24 e 48 h foram retiradas fotos das lesões através de microscópio óptico, segundo protocolo adaptado de Moraes, 2018.

#### **4.10.1 Atividade antibacteriana**

Os estudos com células bacterianas foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual-Univap sob orientação do Prof Dr Newton Soares da Silva. Para avaliar a atividade antibacteriana foram utilizadas duas cepas *Escherichia coli* (ATCC- 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC- 25923) cultivadas em meios de cultura Brain Heart Infusion (BHI) e experimentalmente utilizado Luria Broth (LB), a 37 °C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Em placas de cultura de 24 poços, 5 µL de cultura bacteriana foi adicionada a cada poço somado a 300 µL de seu respectivo meio de cultura. Nestas placas foram adicionadas as concentrações do extrato de *Acmella oleracea* estudadas, após o período de incubação de 24 h o sobrenadante retirado e sua absorvância captada em espectrofotômetro a 570 nm. A leitura da absorvância das placas foi feita em espectrofotômetro a 590 nm (Elisa Spectracount, Packard, EUA). Para avaliação do biofilme formado as placas foram secas em estufa a 65°C e após resfriamento coradas com solução de cristal violeta a 1% por 10 min, decorrido este período os poços foram lavados com PBS e secos em temperatura ambiente *overnight*. Em seguida diluídos em etanol 95% sob agitação por 1h para leitura em espectrofotômetro a 570 nm. A análise estatística deu-se pelo teste ANOVA em GraphPad Prism<sup>®</sup> 6 com Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +. Sendo os valores obtidos transformados em porcentagem pela fórmula:  $(\text{Absorvância do Controle} - 0,045) / (\text{Absorvância do Amostra} - 0,045) * 100$ , onde 0,045 representa a leitura de absorvância de um poço da placa sem amostra.

#### **4.10.2 Unidades formadoras de colônias (UFC)**

As unidades formadoras de colônias foram avaliadas somente com os grupos avaliados utilizando os biomateriais como tratamento. Após o período de 24 h de incubação das células bacterianas com o biomaterial por citotoxicidade indireta (vide 4.12) 20 µL do sobrenadante dos poços foram passados para placa de 96 poços juntamente com 180 µL de meio LB, sendo realizada a diluição seriada até a concentração de  $10^3$ . O volume de 20 µL desta concentração final foram transferidas para uma placa de petri contendo meio BHI juntamente a 1,5% de ágar, decorrido o período de 24h foram retiradas fotos para contagem das colônias formadas.

#### **4.11 Desenvolvimento do biomaterial**

A membrana de quitosana foi preparada segundo metodologia adaptada de Oliveira (2013).

A solução de quitosana a 2% (m/v) (Quitosana obtida de carapaça de caranguejos grautecnico- Sigma Aldrich) foi adicionada em ácido acético a 1% (m/v) em agitação magnética por aproximadamente 30 minutos em temperatura ambiente e em seguida armazenada a 4°C. O pó de gelatina (Gelatina de pele suína, força do gel 300, tipo A- Sigma Aldrich) foi dissolvido em água destilada a 40°C por 30 minutos, sob agitação magnética, para a obtenção de uma concentração de 4% (m/v).

A incorporação das duas soluções é realizada de maneira que se obtenha a proporção de 1:1 (v/v), em agitação magnética e temperatura ambiente por 1 hora. Neste momento foi adicionado a massa dos extratos vegetais com concentração calculada para 1000 µg/mL para cada 30 mL, para extrato bruto e fração butanol separadamente. Após incorporação com a matéria vegetal, para a evaporação do solvente estes 30 mL foram transferidos para placas de acrílico com depressões para moldes de corpos de prova (Figura 5) e, posteriormente, secas em estufa a 50 °C por 48 h.

Figura 5: Biomaterial em molde para corpos de prova.

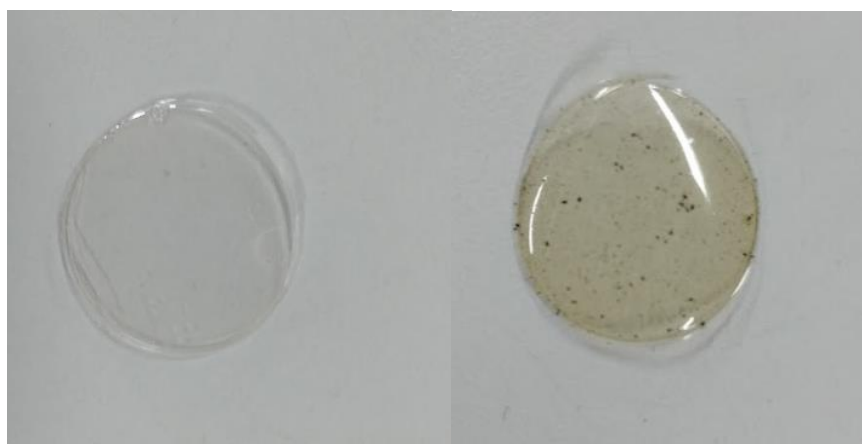


Fonte: autor

#### 4.12 Preparação da membrana para ensaios biológicos

A avaliação da atividade de membrana foi avaliada por teste de citotoxicidade indireta. Para utilização das membranas nos ensaios biológicos realizados com os extratos, citados anteriormente, corpos de prova de aproximadamente 16,25 mm de diâmetro (Figura 6) foram adicionados juntamente a 1mL de meio de cultura (DMEM para L929 e HEp-2 e LB para *S. aureus* e *E. coli*) à tubos corning de 15 mL. Estes tubos foram agitados a 37 °C por 7 dias. Em seguida foi reajustado o pH da solução e estocado a 20 °C. Em cada poço das placas de cultura de 24 poços foram adicionados a proporção de 1mL de membrana diluída. As mesmas metodologias para testes *in vitro* citadas anteriormente foram utilizadas com este 1 mL de membranas diluídas.

Figura 6: Corpos de prova do biomaterial para ensaios biológicos.



Fonte: autor

#### 4.13 Caracterização da membrana

#### **4.13.1 Porosidade e análise de superfície**

A análise da presença de poros na superfície da membrana produzida será realizada visualmente através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando corpo de prova de de aproximadamente 16,25 mm de diâmetro secos previamente em estufa por 24 h. Para a Microscopia Eletrônica de Varredura, as amostras foram metalizadas com ouro no equipamento EMITECH K550X, a seguir foi possível adquirir as imagens por microscopia eletrônica de varredura (EVO MA10) no Laboratório Multiusuário, localizado no IP&D (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento) Universidade do Vale do Paraíba - Univap – campus Urbanova.

#### **4.13.2 Espessura**

As membranas armazenadas a baixa umidade tiveram sua espessura medida através de um micrômetro digital (Digimess) e os resultados expressos como a média das medições feitas em cada amostra de membrana.

#### **4.13.3 Intumescimento e tempo de degradação**

Para avaliar a capacidade de absorver líquidos, o corpo de prova em triplicata teve sua massa medida e em seguida foi imerso em solução tampão salina (PBS) por 24 h e 48 h. Após este período o excesso de solução foi removido por secagem em estufa por 24h a 30 °C e pesado novamente para comparação de suas massas antes e depois da imersão.

O grau de intumescimento foi determinado pelo aumento da massa em porcentagem, calculado por: Grau de intumescimento (%)= massa inicial – massa final/ massa inicial x100

## **5 RESULTADOS**

A sessões a seguir descrevem os resultados obtidos após a experimentação relatada no tópico Metodologia.

### **5.1 Extratos e frações**

A seguir segue-se a demonstração dos resultados da avaliação da atividade do extrato e frações em suas determinadas concentrações.

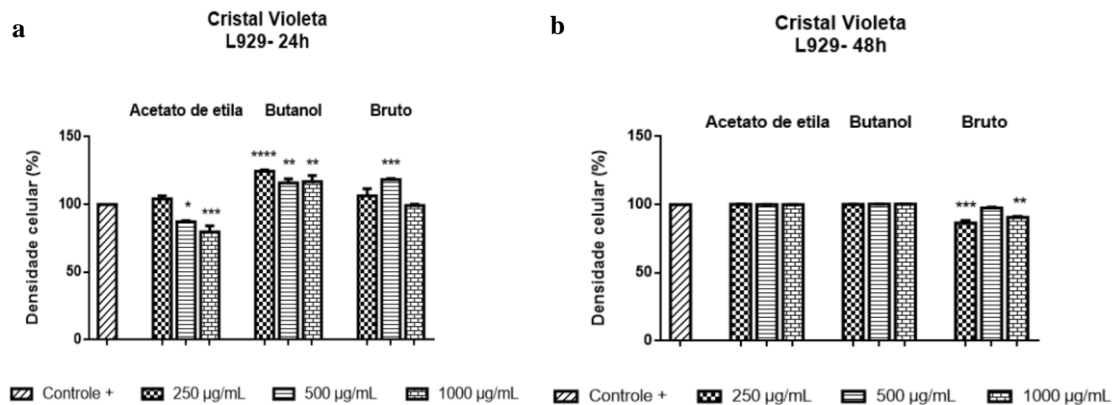
#### **5.1.1 Citotoxicidade e atividade antitumoral**

Para avaliação da citotoxicidade e ação antitumoral foram testados somente o extrato e frações oriundo da extração assistida por ultrassom em suas respectivas concentrações e períodos de incubação.

##### **5.1.1.1 Cristal violeta**

Avaliando a densidade celular na linhagem celular fibroblástica através do teste de Cristal violeta nota-se uma redução da absorbância obtida em espectrofotômetro e portanto uma queda na porcentagem de células na fração Acetato de etila nas duas maiores concentrações avaliadas de 13 e 20 % respectivamente (500  $\mu\text{g/mL}$ -  $P\leq 0,05$  e 1000  $\mu\text{g/mL}$ -  $P\leq 0,001$ ) e aumento nas frações Butanol de 25, 16 e 17% nas frações crescentes (250  $\mu\text{g/mL}$ -  $P\leq 0,0001$ , 500  $\mu\text{g/mL}$ -  $P\leq 0,01$  e 1000  $\mu\text{g/mL}$ -  $P\leq 0,01$ ) e em extrato bruto de 18 % na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $P\leq 0,001$ ) no período de incubação de 24 h, (Figura 7a). No período de concentração de 48 h com os extratos as houve alteração na densidade celular somente quando incubadas com o extrato bruto, esta redução foi significativa quando comparada ao grupo controle nas concentrações de 250  $\mu\text{g/mL}$  de 14% ( $P\leq 0,001$ ) e 1  $\text{mg/mL}$  de 10 % ( $P\leq 0,01$ ) (Figura 7b).

Figura 7: Ensaio de Cristal violeta no período de 24 e 48 horas de incubação de células L929 com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol.

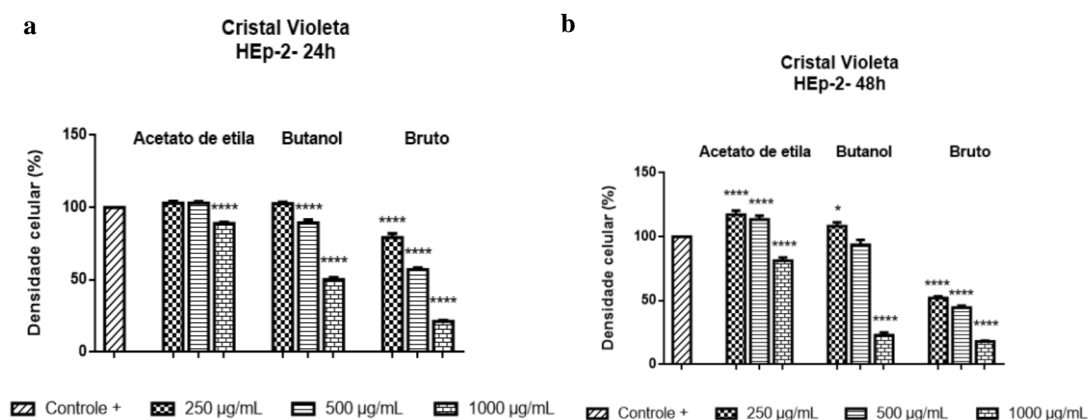


Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

O mesmo teste quando realizado com células de linhagem HEp-2 demonstra na figura 8a uma queda na densidade celular, observadas em porcentagem de células, em 24 h de incubação na maior concentração avaliada da fração Acetato de etila de 11% (1000 µg/mL-  $P \leq 0,0001$ ) e em 250 µg/mL ( $P \leq 0,0001$ ) e 1000 µg/mL ( $P \leq 0,0001$ ) de Butanol de 11 e 50% respectivamente, queda também observada em todas as concentrações incubados com extrato Bruto ( $P \leq 0,0001$ ) (Figura 8a) de 20, 43 e 79% em concentrações crescentes. Já no período de incubação de 48 h a queda se mantém significativamente em 1000 µg/mL ( $P \leq 0,0001$ ) da fração Butanol de 77% e Acetato de etila de 20% assim como em todos os tratamentos com extrato bruto de 48, 55 e 82% nas concentrações crescentes. Havendo também um aumento na porcentagem de células nas menores concentrações da fração Acetato de etila ( $P \leq 0,0001$ ) de 17 e 13% respectivamente e em 250 µg/mL ( $P \leq 0,05$ ) da fração Butanol de 8% (Figura 8b).

Figura 8: Ensaio de Cristal violeta no período de 24 e 48 horas de incubação de células HEp-2 com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol.



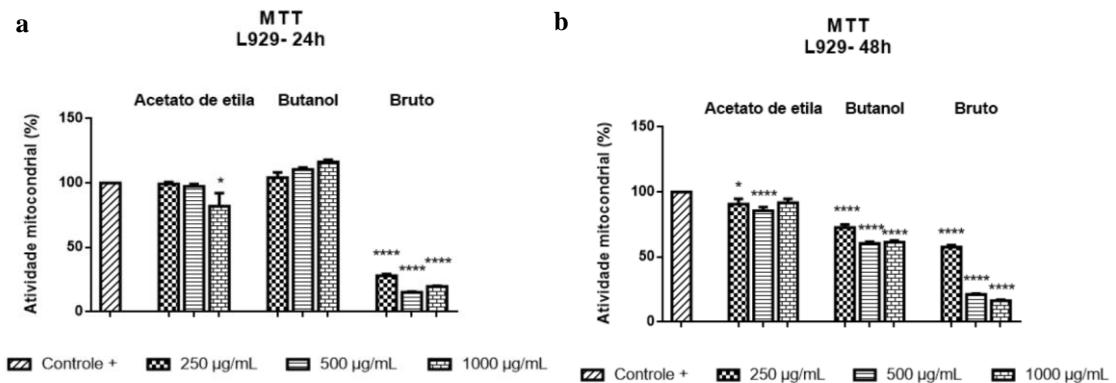
Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

### 5.1.1.2 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT avalia a dissolução de cristais de formazana produzidos durante o teste somente em células com atividade mitocondrial, sendo assim pode-se determinar a viabilidade das células após o tratamento com os extratos. Pode-se observar na figura 9a queda na porcentagem da viabilidade pela atividade mitocondrial na concentração de 1000 µg/mL ( $P \leq 0,05$ ) de Acetato de etila de 18% e um aumento sem significância nas maiores concentrações de Butanol de 4, 10 e 16%. No entanto houve uma redução significativa ( $P \leq 0,0001$ ) desta atividade em todas as concentrações do extrato Bruto de 72, 85 e 80% em relação ao grupo controle. Em 48 h de incubação houve queda na atividade com significância de 9% para 250 µg/mL ( $P \leq 0,05$ ) e 14% para 500 µg/mL ( $P \leq 0,0001$ ), queda também observada em todas as concentrações crescente de butanol de 27, 40, 39% ( $P \leq 0,0001$ ) respectivamente e de 43, 79 e 84% para concentrações crescentes de extrato bruto ( $P \leq 0,0001$ ) (Figura 9b).

Figura 9: Ensaio de MTT no período de 24 e 48 horas de incubação de células L929 com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol.

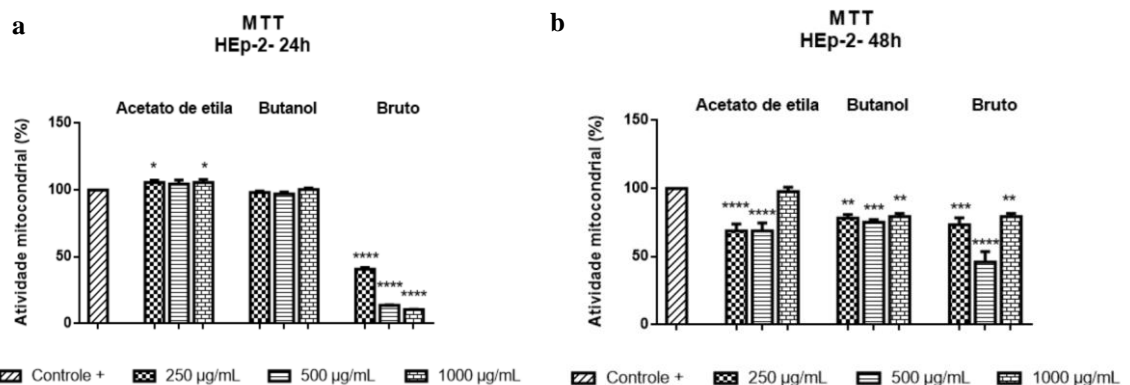


Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

O ensaio mostrou na linhagem tumoral HEP-2 uma baixa significativa na atividade mitocondrial somente na incubação com o extrato bruto, em todas as concentrações avaliadas com  $P \leq 0,0001$ , além de um aumento da porcentagem de viabilidade em 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $P \leq 0,05$ ) e 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $P \leq 0,05$ ) no período de 24 h (Figura 10a). Já em 48h de incubação com os extratos observa-se uma queda na atividade nas menores concentrações de acetato de etila ambas de 31% ( $P \leq 0,0001$ ), também observada em todas as concentrações crescentes de butanol de 22, 25 e 20 % ( $P \leq 0,01$ ,  $P \leq 0,001$  e  $P \leq 0,01$ ), além das concentrações do extrato bruto de 27, 54 e 21% em concentrações crescentes ( $P \leq 0,001$ ,  $P \leq 0,0001$  e  $P \leq 0,01$ ), (Figura 10b).

Figura 10: Ensaio de MTT no período de 24 e 48 horas de incubação de células HEP-2 com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol.



Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

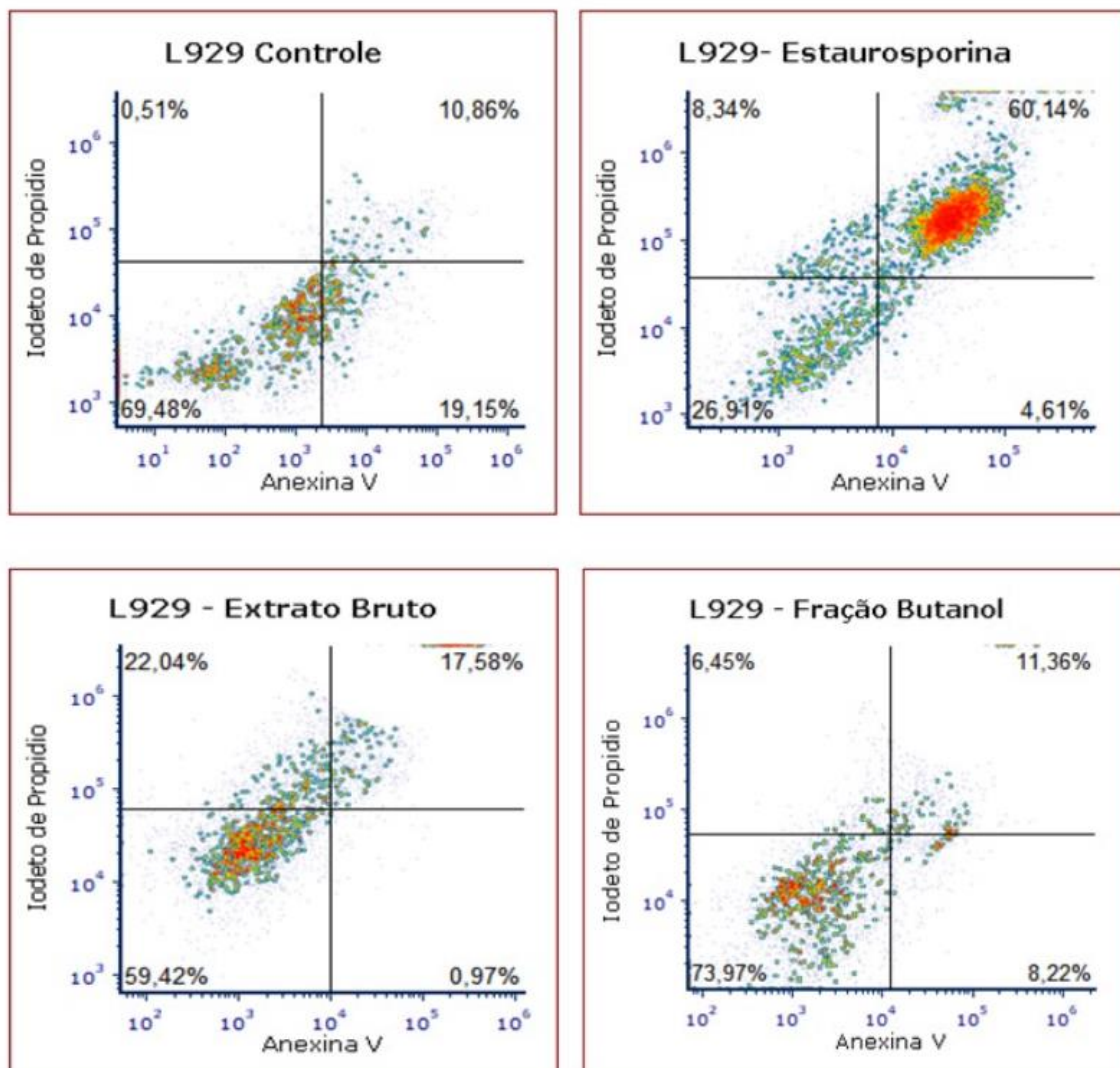
Fonte: autor

### 5.1.2 Morte celular

Após a incubação com os extratos selecionados por apresentarem melhor resposta citotóxica, foi realizada a citometria de fluxo com marcação para morte celular, utilizando iodeto de propídio e anexina V. Os resultados obtidos demonstram que após 24 horas de interação com o extrato bruto ocorreu 17,58% de morte por apoptose e 22,04% de morte por necrose, enquanto com a fração butanol observou-se 11,36% de morte por apoptose e 6,45% de morte por necrose, apresentando também uma maior taxa de células viáveis que o grupo controle de 73,97 e 69,48% (Figura 11).

Figura 11: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em linhagem L929.

### Morte Celular - extrato

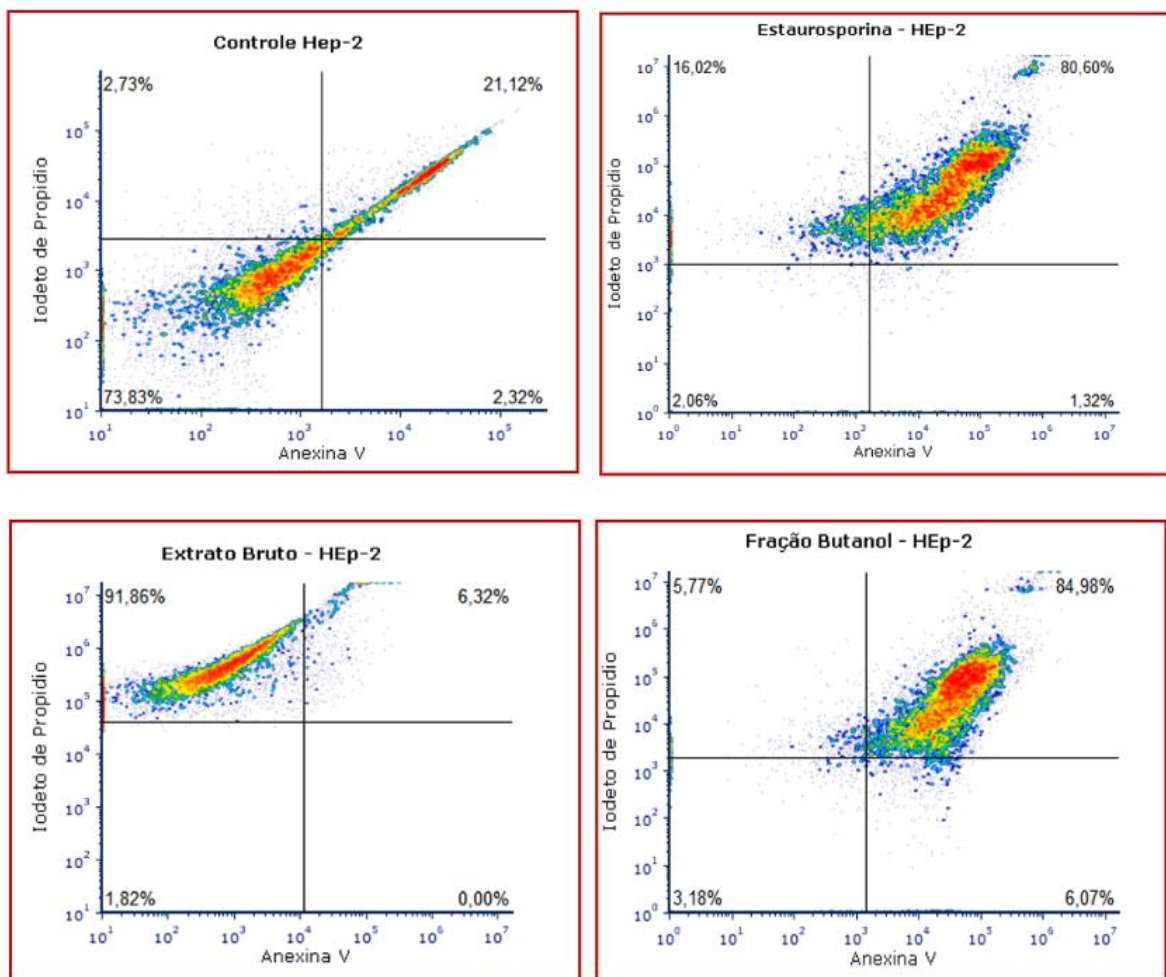


Fonte: autor

Em contrapartida ao aplicar o extrato bruto sobre linhagem HEP-2 por 24h observa-se 91,85% de células em fase de morte por necrose enquanto 84,98% das células estão em fase de apoptose ao serem incubadas com a fração butanol, diferença está quando comparada ao grupo controle sem incubação com os extratos que apresenta 73,83% de células viáveis (Figura 12).

Figura 12: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em linhagem HEP-2.

### Morte celular- extrato



Fonte: autor

### 5.1.3 Cicatrização

Esta atividade foi determinada após a avaliação visual das micrografias retiradas após os períodos de 0, 24 e 48 h com os extratos em questão nas menores e maiores concentrações testadas anteriormente, 250 µg/mL e 1000 µg/mL. Inicialmente no período de 0 h de incubação pode-se observar a injúria realizada na monocamada celular quando comparada ao Controle com 100% de confluência (Figura 13).

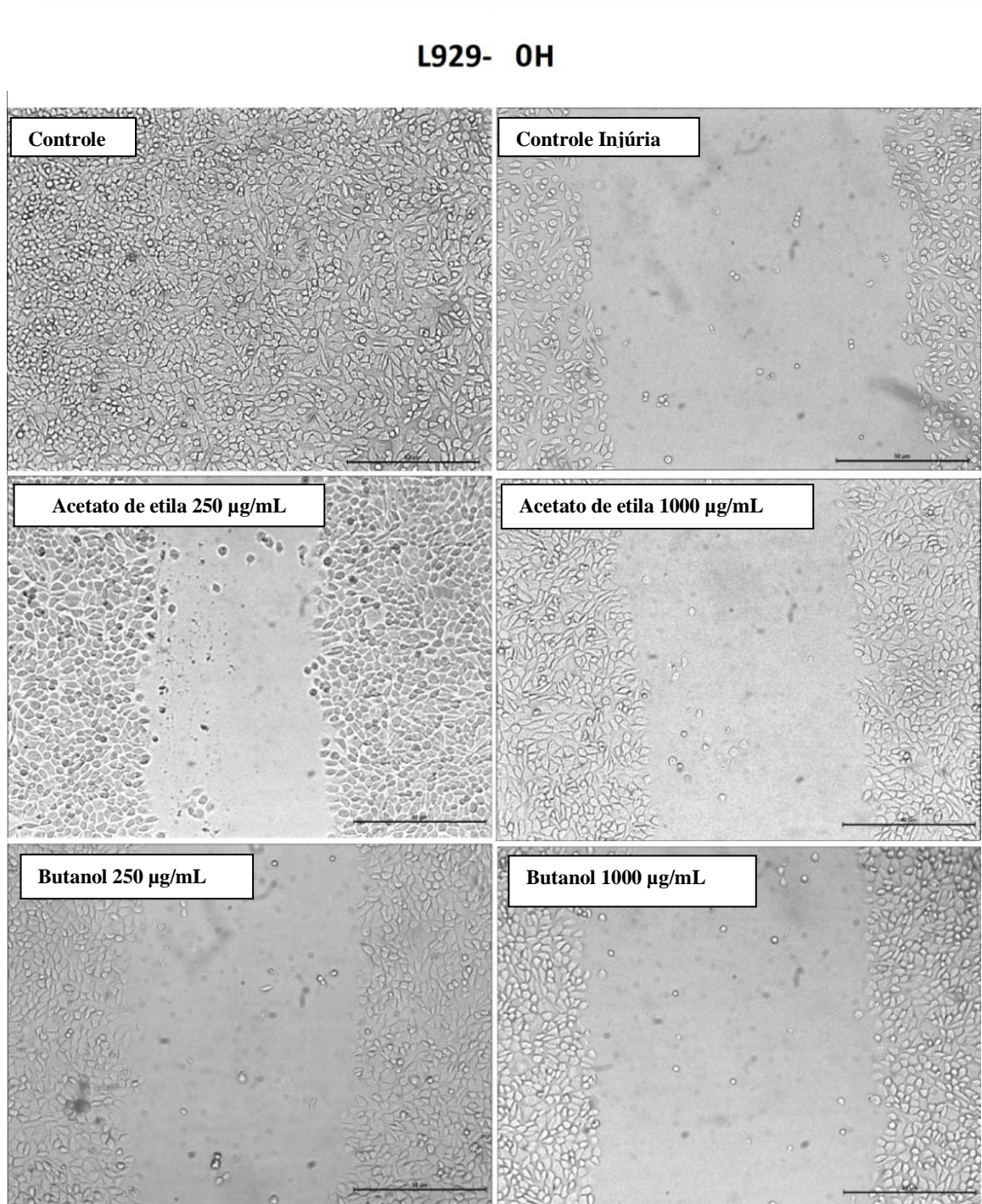
No período de 24 h há a divisão e migração celular no intuito de fechar a injúria realizada, caracterizando a cicatrização quando comparado ao grupo controle. Na figura 14 nota-se que nas frações Acetato de etila e Butanol a atividade cicatrizante pode ser observada a partir da concentração de 250 µg/mL, com toda a injúria fechada, o que não é observado no grupo controle.

Em 48 h de incubação com os extratos, como esperado, as frações acetato de etila e Butanol mantiveram sua ação proliferativa fechando completamente a injúria em ambas as concentrações testadas (Figura 15).

Para fins comparativos, o extrato bruto foi testado nas mesmas concentrações e períodos de incubação, os resultados mostram que visualmente não há fechamento da injúria e assim não há atividade cicatrizante quando comparada ao grupo controle, apresentando visualmente grânulos de extratos não dissolvidos em meio de cultura podendo ser um fator que influenciou a baixa atividade do extrato (Figura 16). As frações Acetato de etila e Butanol apresentaram melhores resultados e assim foi avaliado uma combinação entre os dois extratos, este grupo apresentou melhor resultado em 1000 µg/mL com fechamento da injúria em 100%, o que não foi observado no grupo controle. A concentração de 250 µg/mL se assemelhou ao controle e assim não se considera com atividade cicatrizante (Figura 16).

Após a incubação da linhagem tumoral HEP-2 com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol determinou-se que não há o fechamento da injúria até 48 horas de avaliação. Quando comparados ao grupo controle pode-se observar que após 24 horas houve proliferação celular o suficiente para delinear a injúria comparado ao período de 0 horas (Figura 17, 18). Contudo em 48 horas houve dano a célula, com modificação de sua morfologia e diminuição na densidade celular em todas as amostras avaliadas, com ênfase no extrato bruto (Figura 19).

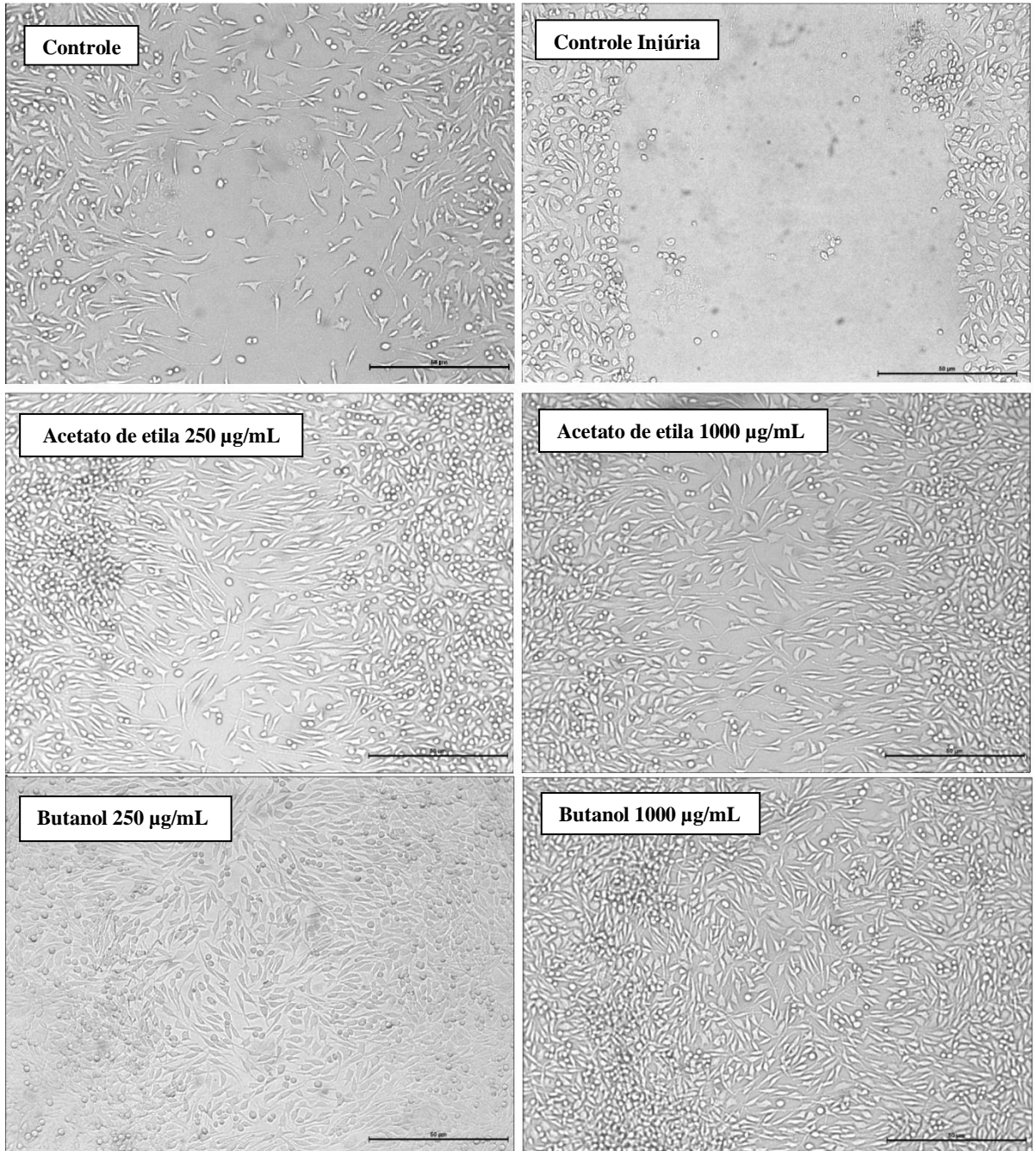
Figura 13: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pela fração Acetato de etila e Butanol no período de 0 horas de incubação.



Fonte: autor

Figura 14: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pela fração Acetato de etila e Butanol no período de 24 horas de incubação.

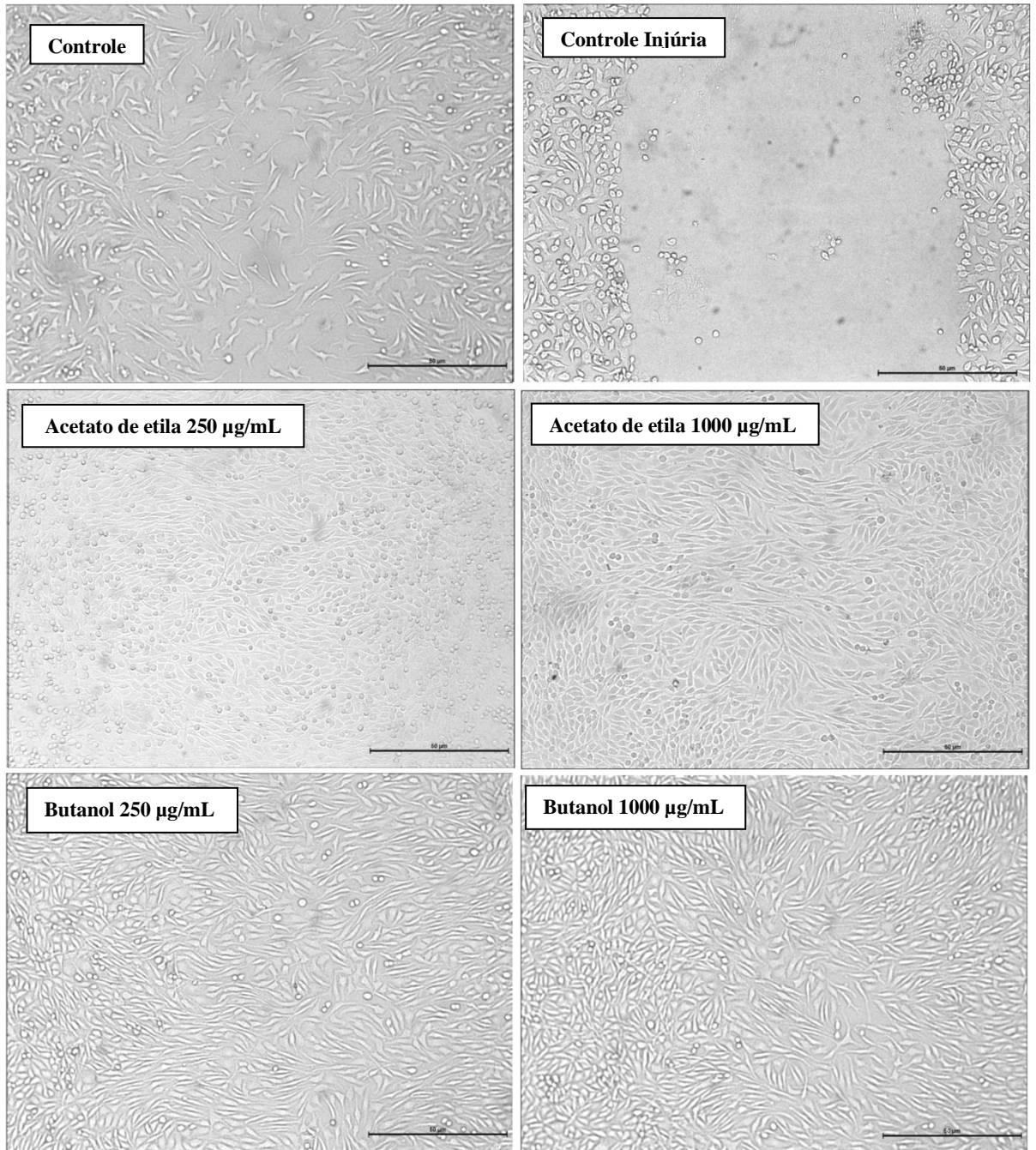
### L929- 24H



Fonte: autor

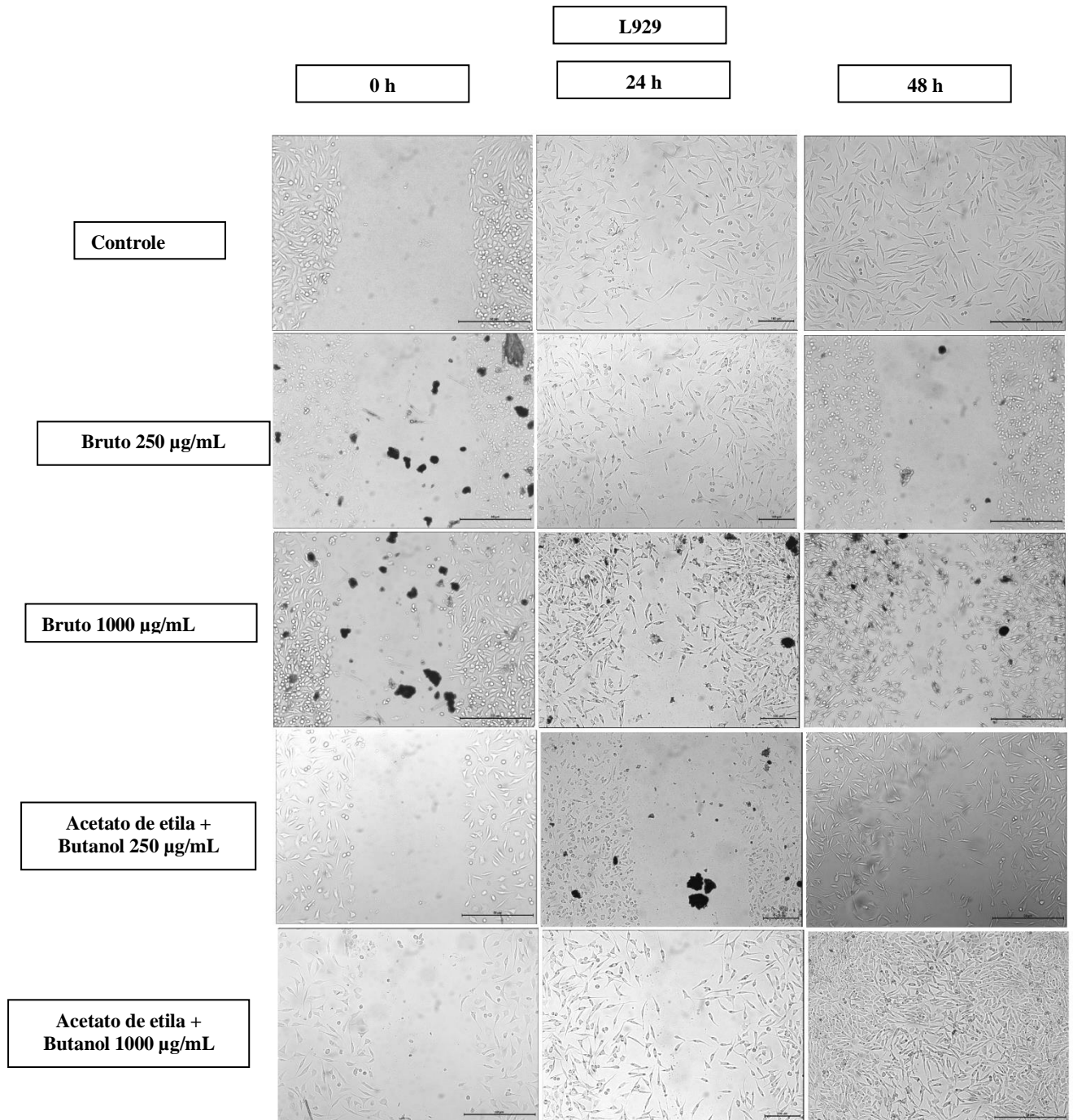
Figura 15: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pela fração Acetato de etila e Butanol no período de 48 horas de incubação.

### L929- 48H



Fonte: autor

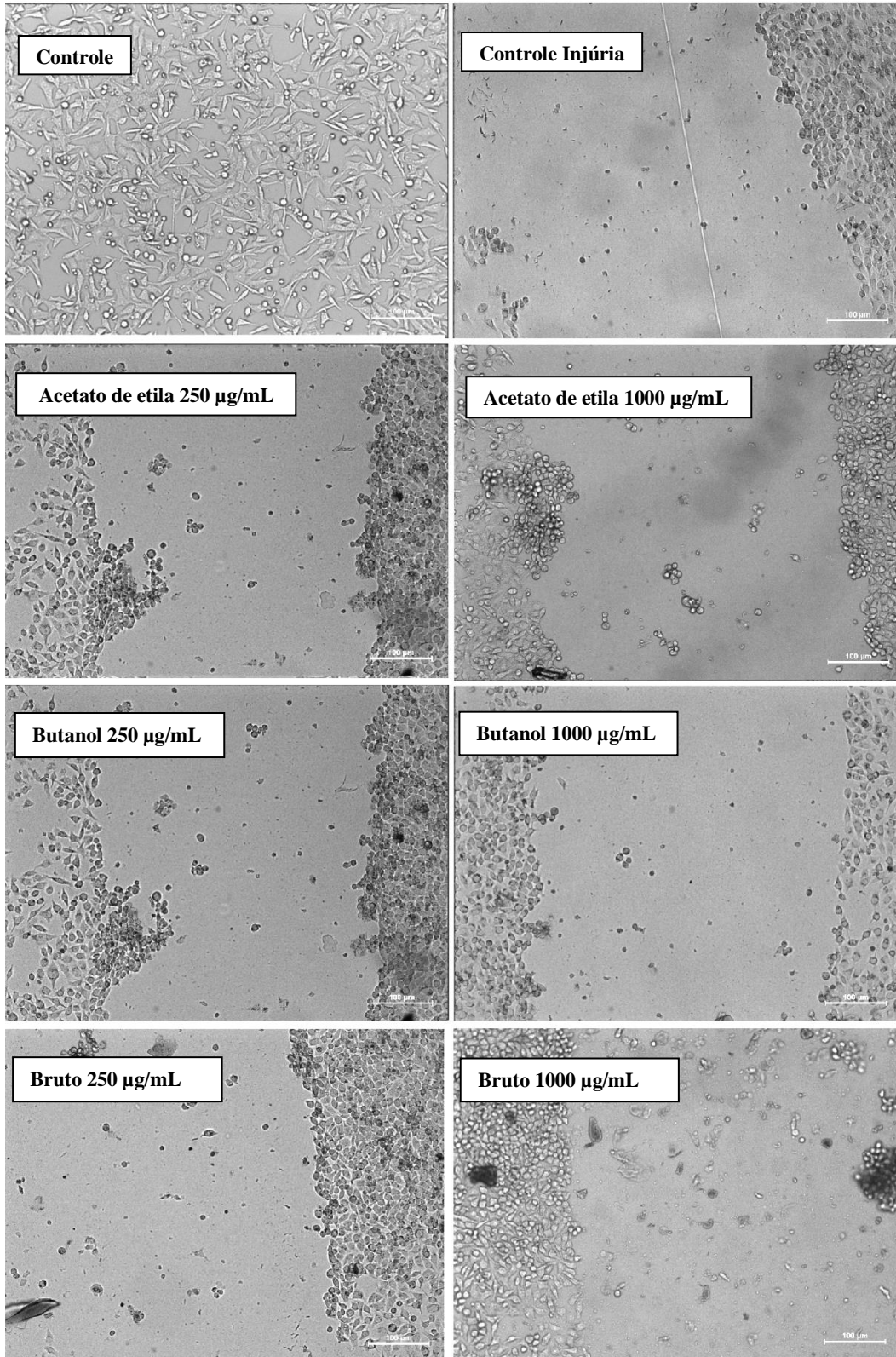
Figura 16: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelo extrato Bruto e pela combinação das frações Acetato de etila e Butanol no período de 0, 24 e 48 horas de incubação.



Fonte: autor

Figura 17: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelo extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 0 horas de incubação.

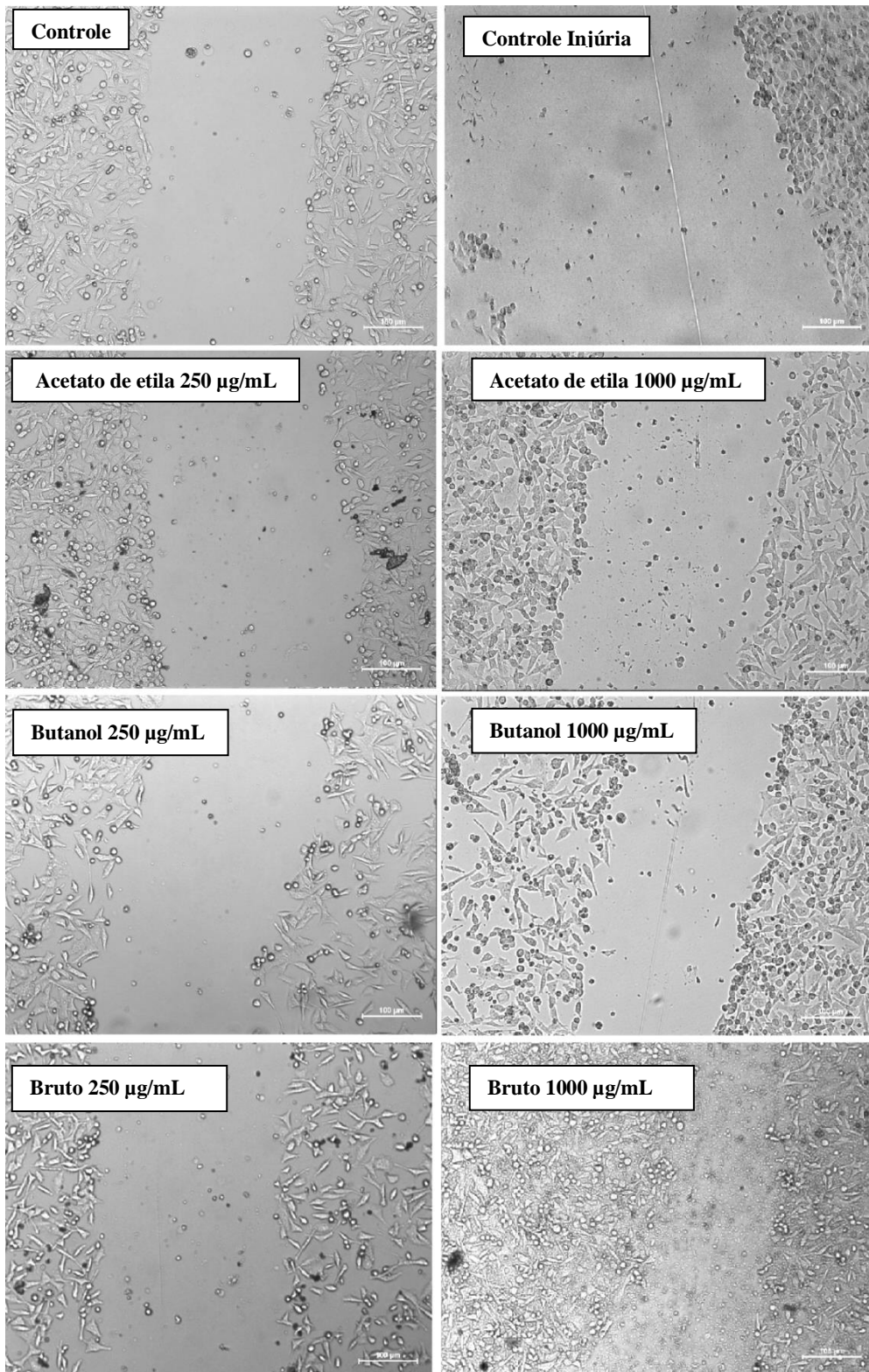
### HEp-2- 0H



Fonte: autor

Figura 18: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelo extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 horas de incubação.

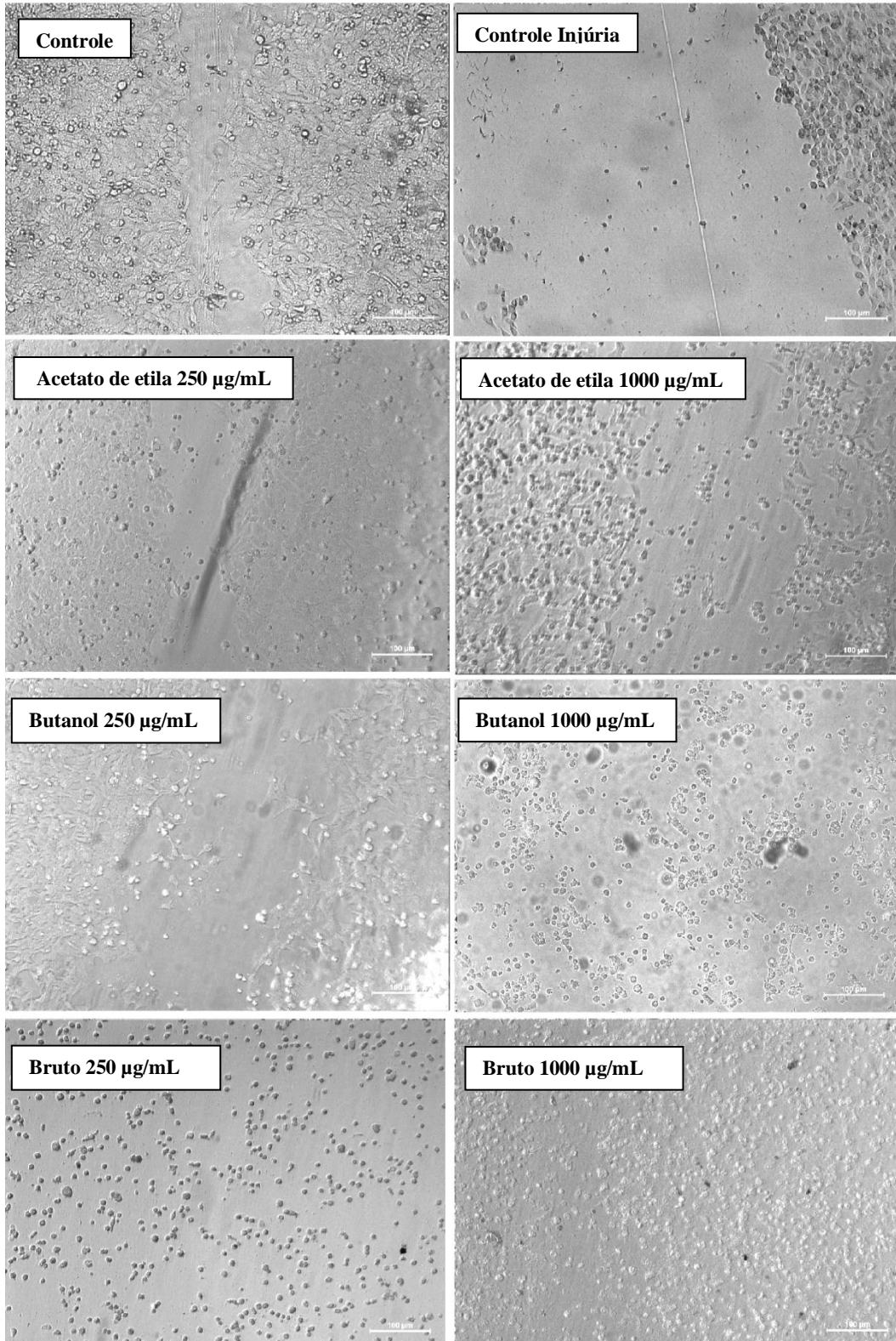
### HEp-2- 24H



Fonte: autor

Figura 11: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelo extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 48 horas de incubação.

### HEp-2- 48H

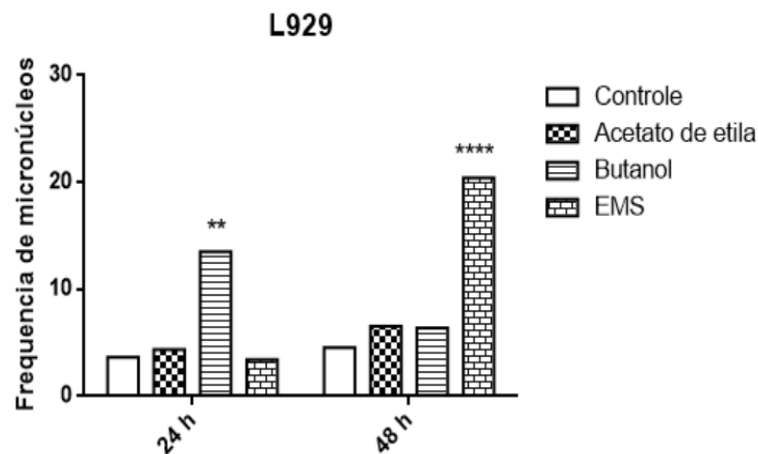


### 5.1.4 Genotoxicidade

O teste de frequência de micronúcleos aparentes foi realizado somente na maior concentração (1000 µg/mL) do extrato bruto e frações Acetato de etila e Butanol e apontou a fragmentação do material genético em pequenos núcleos. Esta fragmentação se mostrou mais evidente na fração Butanol no período de incubação de 24 horas com o extrato vegetal com diferença estatística entre as amostras com  $P \leq 0,01$  (Figura 20).

Em contrapartida, ainda na figura 20, no período de incubação de 48 horas com os extratos não houve diferença estatística entre os grupos tratados, demonstrando assim nenhum dano ao material genético aparente.

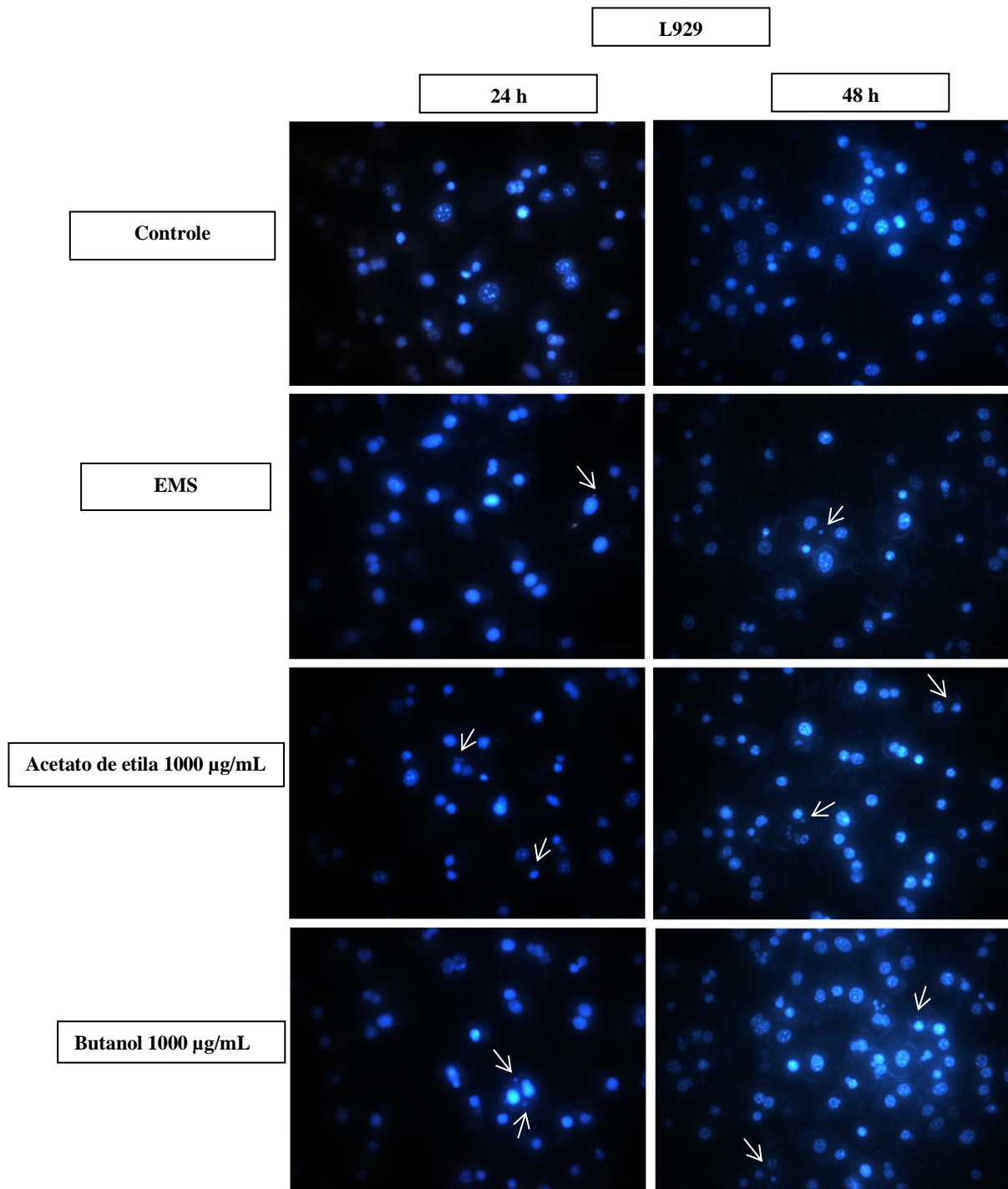
Figura 20: Frequência de micronúcleos gerados a partir da incubação das frações acetato de etila e butanol na concentração de 1000 µg/mL, por 24 e 48 horas.



Fonte: autor

Apesar de presentes em todos os grupos, a frequência de micronúcleos não se torna estatisticamente significativa, a microscopia de fluorescência permitiu visualizar estes fragmentos nucleares destacados na Figura 21.

Figura 21: Ensaio de micronúcleo por fluorescência gerados a partir da incubação das frações de jambu por 24 e 48 horas.

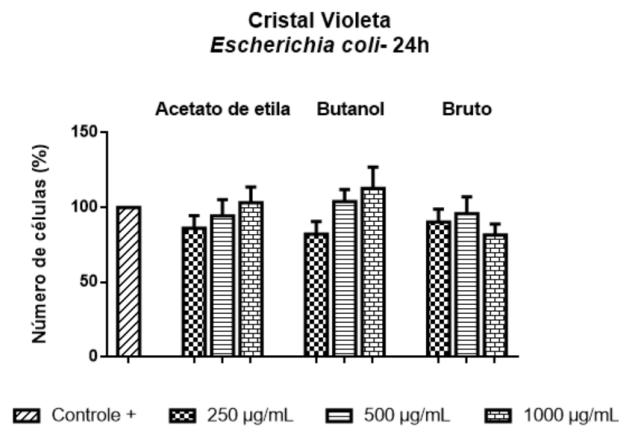


Fonte: autor

### 5.1.5 Atividade antibacteriana

Após a incubação das cepas bacterianas com os extratos vegetais foi possível observar que não houve nenhuma alteração significativa na redução da densidade celular em *Escherichia coli*, apesar da redução sem diferenças estatísticas no número de células bacterianas na placa de cultura após 24 h de incubação (Figura 22). A formação do biofilme nesta cepa também não foi afetada, determinando a ineficiência do extrato bruto e suas frações em combater a ação da *E. coli* (Figura 23).

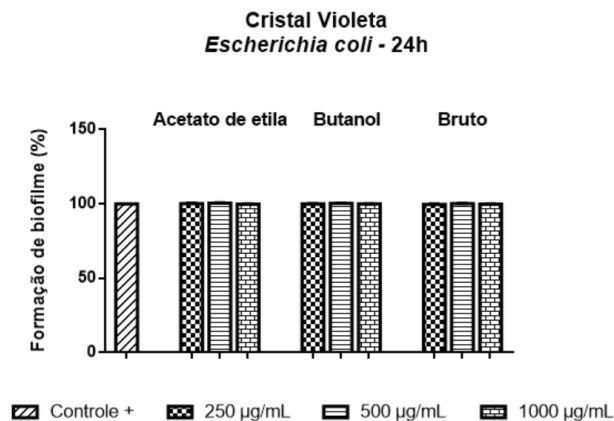
Figura 22: Densidade celular da cepa *Escherichia coli* avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação.



Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

Figura 23: Produção de biofilme da cepa *Escherichia coli* avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação.



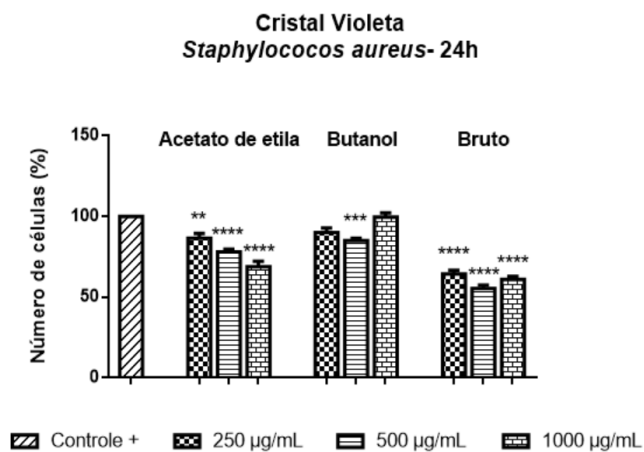
Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

Em contrapartida foi possível observar em *Staphylococcus aureus* diferenças estatísticas com redução significativa em todas as concentrações e frações do extrato testadas, com exceção da concentração de 250 µg/mL e 1000 µg/mL da fração Butanol respectivamente. Esta queda foi mais expressa na fração bruto com  $P \leq 0,0001$  com redução de em 36, 45 e 39% nas concentrações crescentes e em 500 µg/mL e 1000 µg/mL da fração Acetato de etila com redução de 22 e 31% respectivamente (Figura 24).

A formação de biofilme nesta cepa bacteriana foi afetada somente em 500 µg/mL do extrato bruto ( $P \leq 0,05$ ) em aumento de 1% em relação ao grupo controle, não havendo redução significativa em nenhuma outra concentração e fração testada (Figura 25).

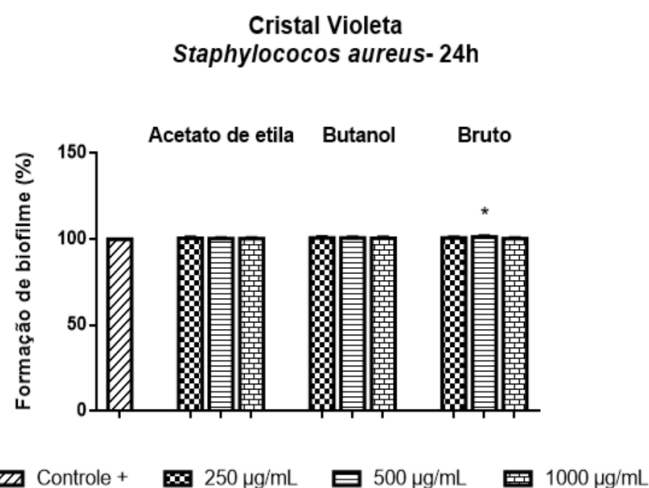
Figura 24: Densidade celular da cepa *Staphylococcus aureus* avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação.



Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

Figura 25: Produção de biofilme da cepa *Staphylococcus aureus* avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação.



Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

## 5.2 Membranas

A seguir segue-se a demonstração dos resultados da avaliação da atividade das membranas nas concentrações de 1000 µg/mL de extrato bruto e butanol, descartando a fração Acetato de etila por sua baixa atividade nos testes de cristal violeta e MTT citados anteriormente.

### 5.2.1 Citotoxicidade e atividade antitumoral

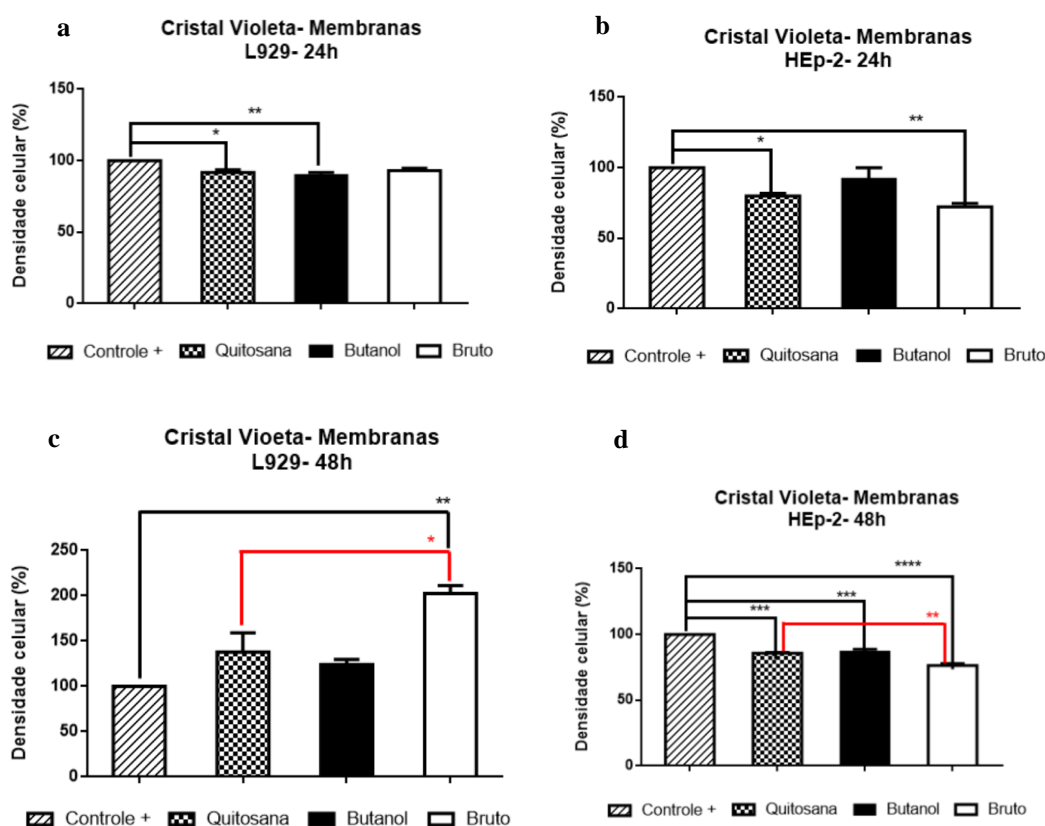
#### 5.2.1.1 Cristal violeta

Quando incubadas as células de linhagem L929 com as membranas diluídas na concentração de 1000 µg/mL pode-se observar uma alteração na densidade celular em todas as membranas no período de 24 h de incubação, com redução significativa quando comparado o grupo controle (somente células) às membranas produzidas a partir da fração butanol ( $P \leq 0,01$ ) e quitosana ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 26a). Já na incubação da membrana diluída com a linhagem de câncer de laringe humana observa-se uma redução na densidade celular após o teste de cristal violeta com significância quando avaliadas membranas de quitosana e extrato bruto (Figura 26b).

Após 48 horas de teste com as membranas em células L929 observa-se um aumento na porcentagem da densidade celular com significância quando incubadas com o biomaterial contendo extrato bruto ( $P \leq 0,01$ ) comparadas ao grupo controle. Ao comparar a ação citotóxica da membrana de quitosana sem adição dos extratos pode-se notar aumento na porcentagem de densidade celular em relação à membrana contendo o extrato bruto ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 26c).

Ainda em 48 horas há uma queda na porcentagem de densidade celular com significância em todos os grupos testados quando comparados ao grupo controle com  $P \leq 0,001$  para membrana de quitosana e membrana contendo a fração butanol e  $P \leq 0,0001$  para membrana contendo extrato bruto. Somente entre a membrana de quitosana e a membrana de quitosana associada ao extrato bruto pode-se observar uma diferença na citotoxicidade com significância de  $P \leq 0,01$  (Figura 26d).

Figura 26: Ensaio de Cristal violeta no período de 24 horas de incubação de células L929 (a) e HEP-2 (b) e em 48 horas de incubação de células L929 (c) e HEP-2 (d) com as membranas Quitosana, Butanol e Bruto.



Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

### 5.2.1.2 MTT

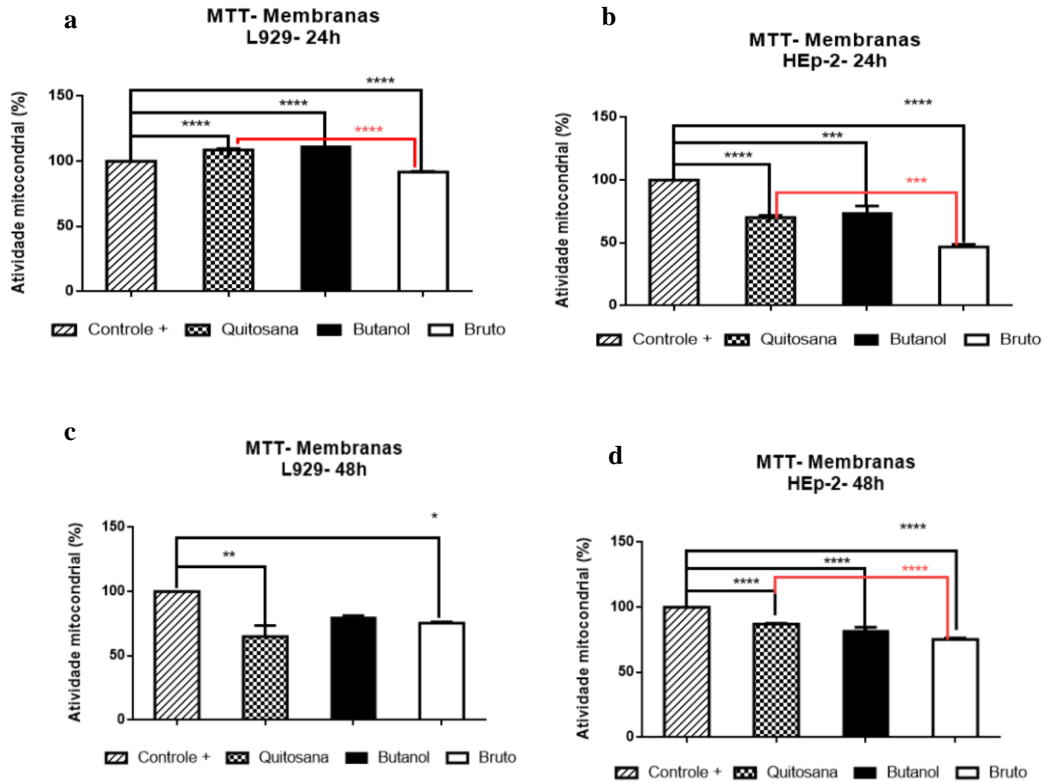
Ao analisar a atividade mitocondrial na figura 27a, em linhagem celular L929 observa-se uma queda somente na membrana associada ao extrato bruto, quando comparado ao grupo controle e a membrana de quitosana. Pode-se observar também um aumento na porcentagem desta atividade comparando a membrana de quitosana e a membrana com butanol ao grupo controle.

Entretanto, esta atividade caiu na linhagem tumoral HEP-2 ao comparar as membranas de quitosana ( $P \leq 0,0001$ ), membrana associada a fração butanol ( $P \leq 0,001$ ) e membrana associada ao extrato bruto ( $P \leq 0,0001$ ) quando comparadas ao grupo controle. Também na figura 27b ao comparar a influência da membrana de quitosana na atividade mitocondrial das células tumorais houve ainda redução significativa na membrana com extrato bruto ( $P \leq 0,001$ ).

Em 48 horas de incubação há uma queda na porcentagem de atividade mitocondrial quando incubados os biomateriais com células de linhagem L929 com significância quando comparados os grupos de membrana de quitosana ( $P \leq 0,01$ ) e membranas com o extrato bruto ( $P \leq 0,05$ ) ao grupo controle (Figura 27c).

Há também uma redução com significância de  $P \leq 0,0001$  quando comparados todos os biomateriais testados incubados com células de linhagem HEP-2 quando comparados ao grupo controle. Havendo também somente uma redução da atividade mitocondrial quando comparados entre os grupos de biomateriais, entre a membrana de quitosana e membrana de quitosana associada ao extrato bruto ( $P \leq 0,0001$ ) (Figura 27d).

Figura 27: Ensaio de MTT no período de 24 horas de incubação de células L929 (a) e HEP-2 (b) e em 48 horas de incubação de células L929 (c) e HEP-2 (d) com as membranas Quitosana, Butanol e Bruto.



Legenda: Significância de  $P \leq 0.05$  (\*),  $P \leq 0.01$  (\*\*),  $P \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0.0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

## 5.2.2 Morte celular

Após a incubação das linhagens celulares com as membranas previamente diluídas na concentração final de 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  as células foram avaliadas por citometria de fluxo para determinação do tipo de morte celular induzida. Observa-se que após a incubação da linhagem L929 com a membrana de quitosana sem adição do extrato 63,6% das células apresentam-se viáveis enquanto 26,73% estão em apoptose. Já para as células incubadas por 24h com a membrana de quitosana associada ao extrato bruto 84,45% estão viáveis enquanto 11,15% estão em apoptose. Após a incubação com a membrana de quitosana associada ao extrato butanol 78,87% das células estão viáveis enquanto 19% representam células necróticas (Figura 28). Ao realizar o teste de morte celular na linhagem tumoral HEP-2 pode-se observar que a membrana de quitosana, quitosana associada ao extrato bruto e quitosana associada ao extrato butanol apresentaram 52,88%, 42,02% e 35,25% respectivamente de células viáveis

comparadas ao grupo controle com 46,63%. Já as células em estado de apoptose representam 36,26%, 47,53%, 51,34% e 43,72% para membrana de quitosana, quitosana associada ao extrato bruto, quitosana associada ao extrato butanol e grupo controle respectivamente, apresentando então uma maior quantidade de células em processo de morte quando comparadas ao número de células viáveis (Figura 29).

Figura 28: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em linhagem L929.

### Morte celular – membrana

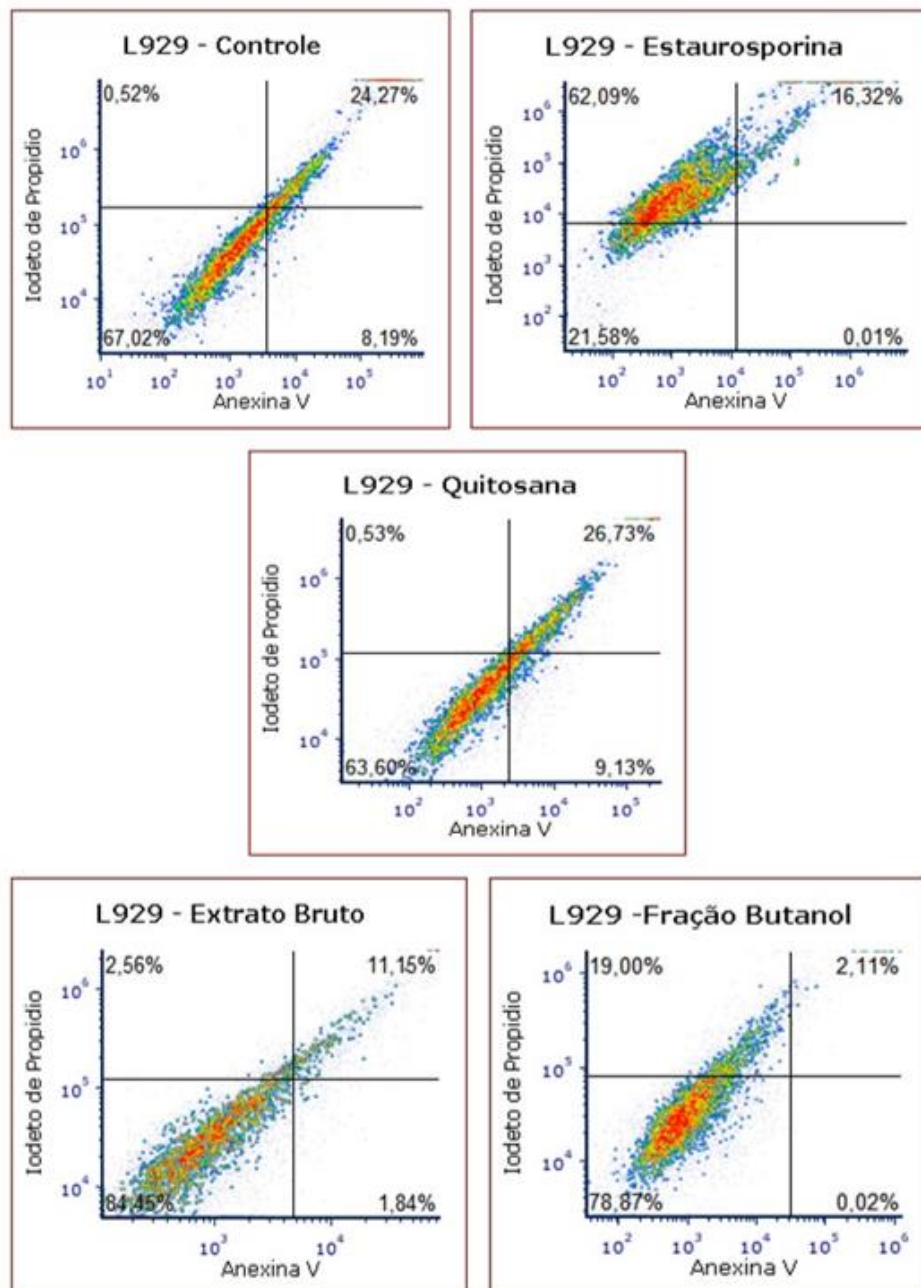
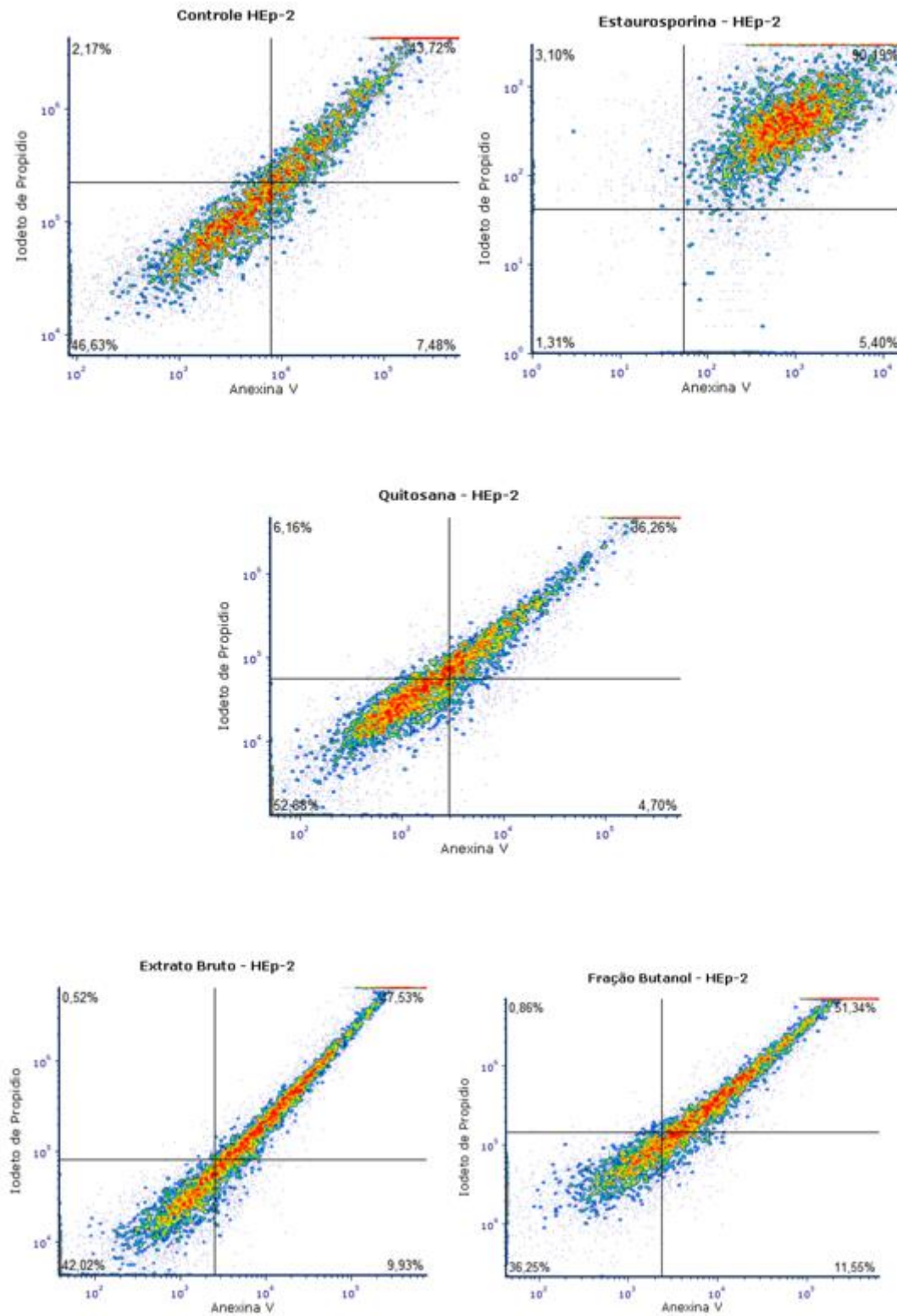


Figura 29: Ensaio de morte celular por citometria de fluxo em linhagem HEP-2.

### Morte celular- membrana

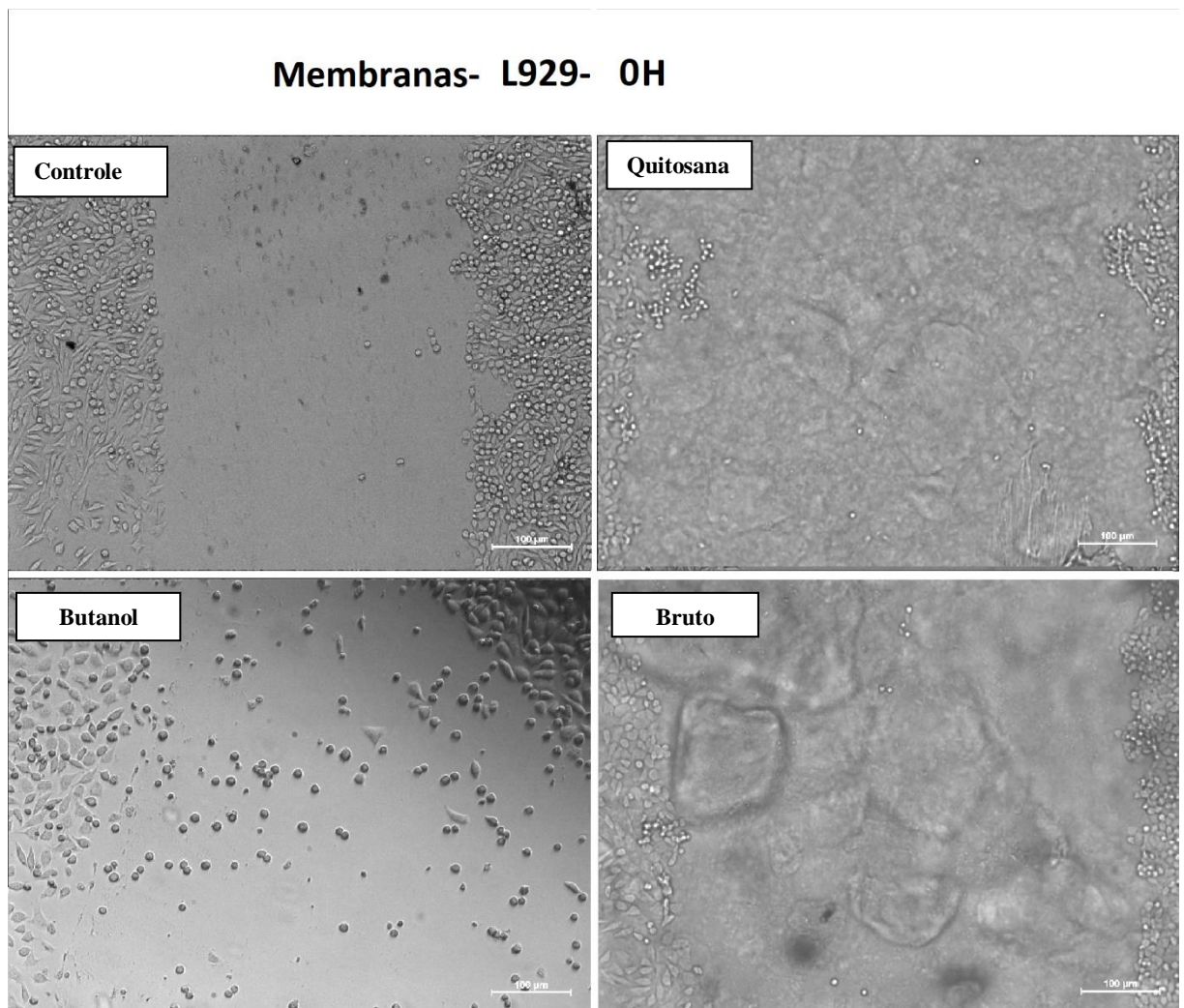


Fonte: autor

### 5.2.3 Cicatrização

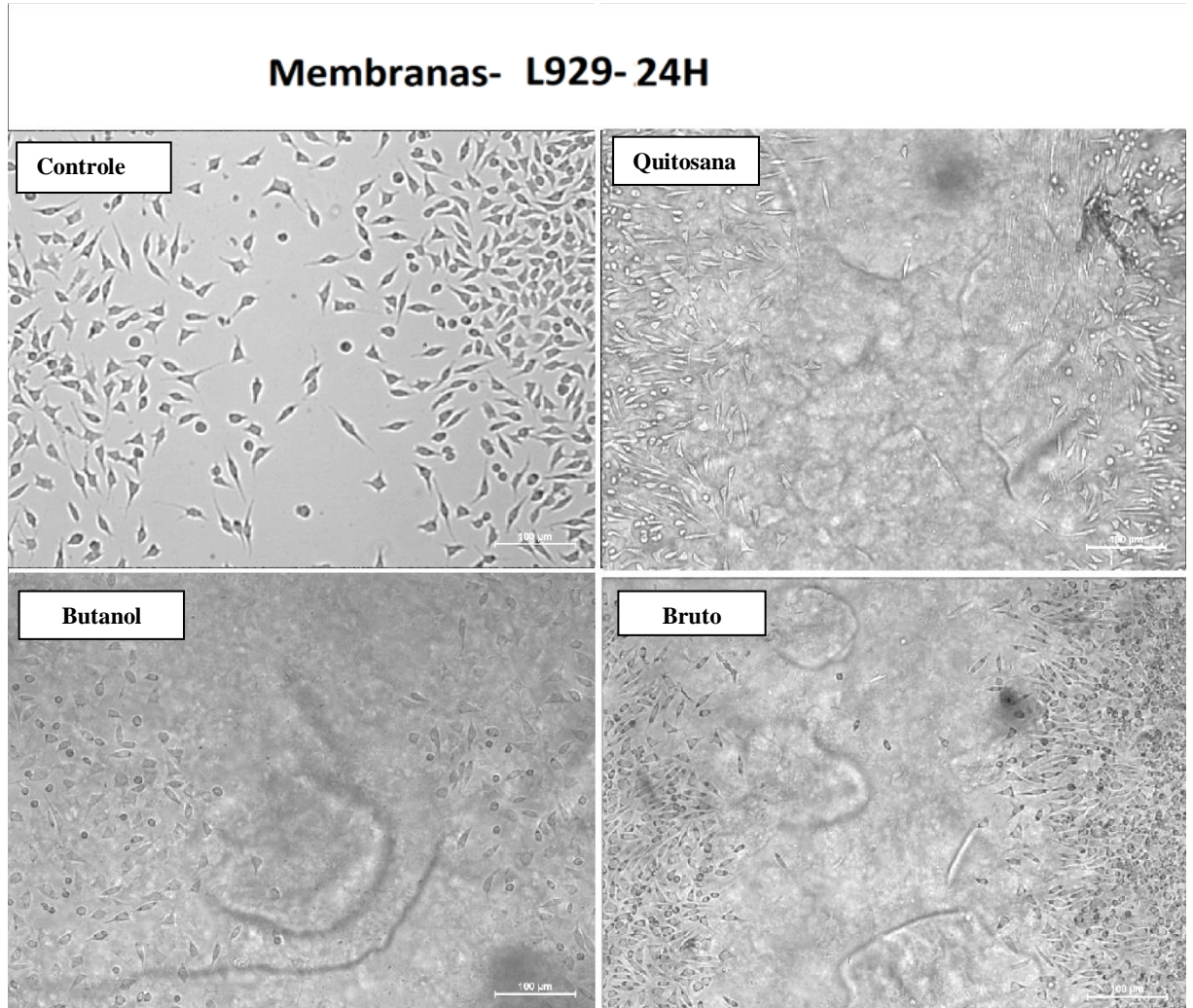
Quando incubadas as membranas com a linhagem L929, nota-se quem diferentemente da ação dos extratos o biomaterial não permite o fechamento da injúria em 24 e 48 h. Não havendo diferença visual entre as injúrias do período de 24 h (Figura 30) e 48 h (Figura 31) quando comparados as imagens de 0 h (Figura 32). Contudo é possível observar uma maior presença de células na injúria no grupo contendo a membrana associada ao extrato bruto no período de incubação de 48 h.

Figura 30: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 0 horas de incubação em linhagem L929.



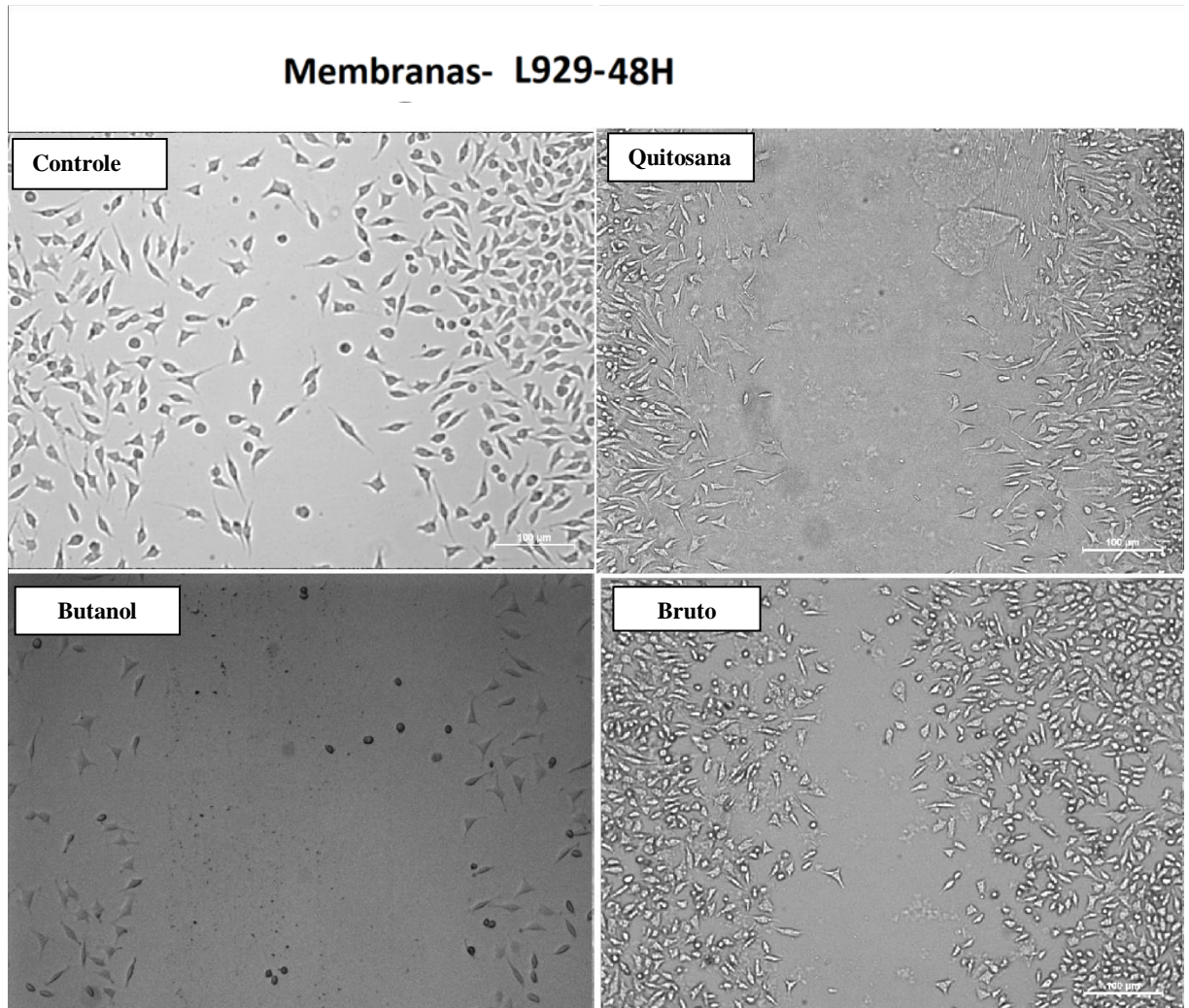
Fonte: autor

Figura 31: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 24 horas de incubação em linhagem L929.



Fonte: autor

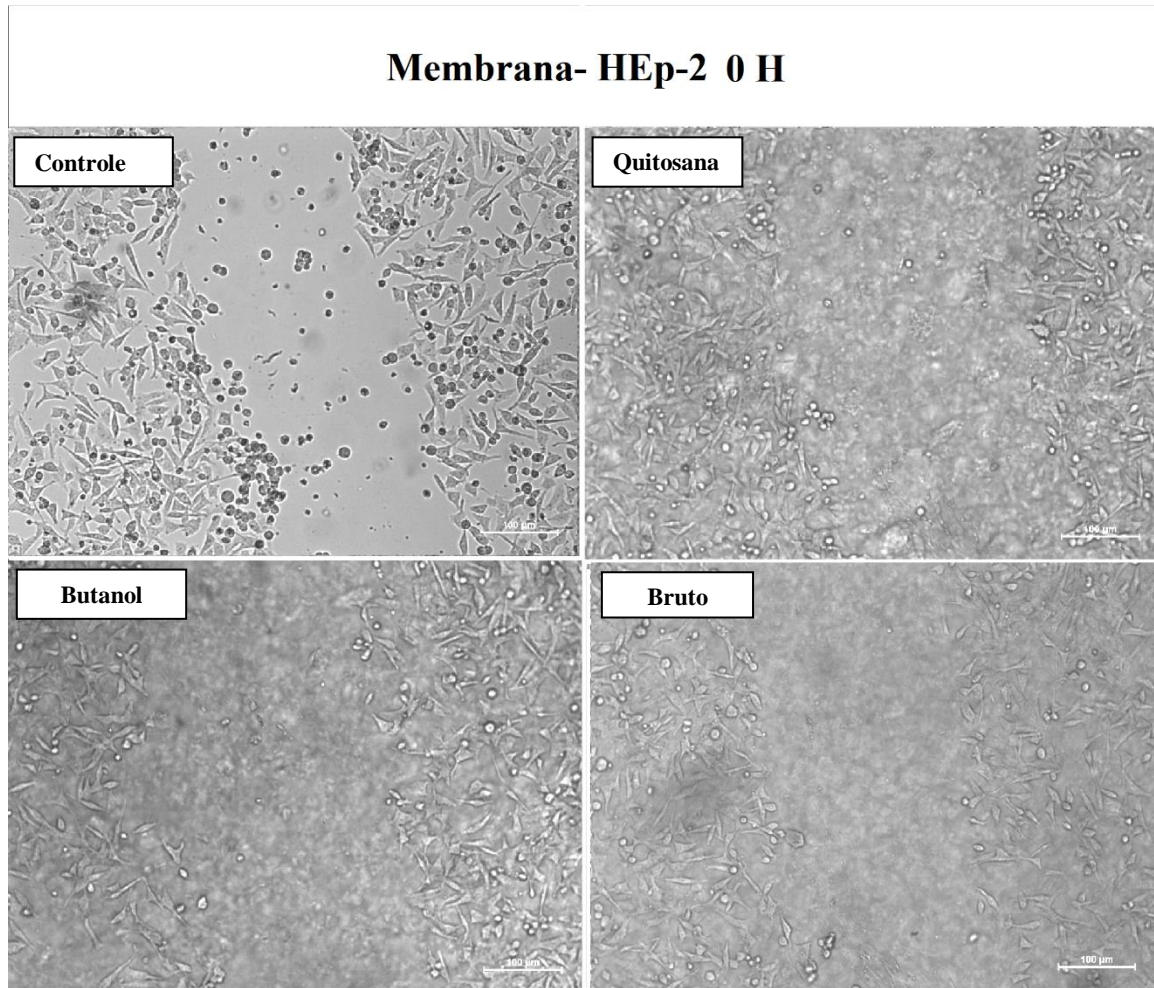
Figura 32: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 48 horas de incubação em linhagem L929.



Fonte: autor

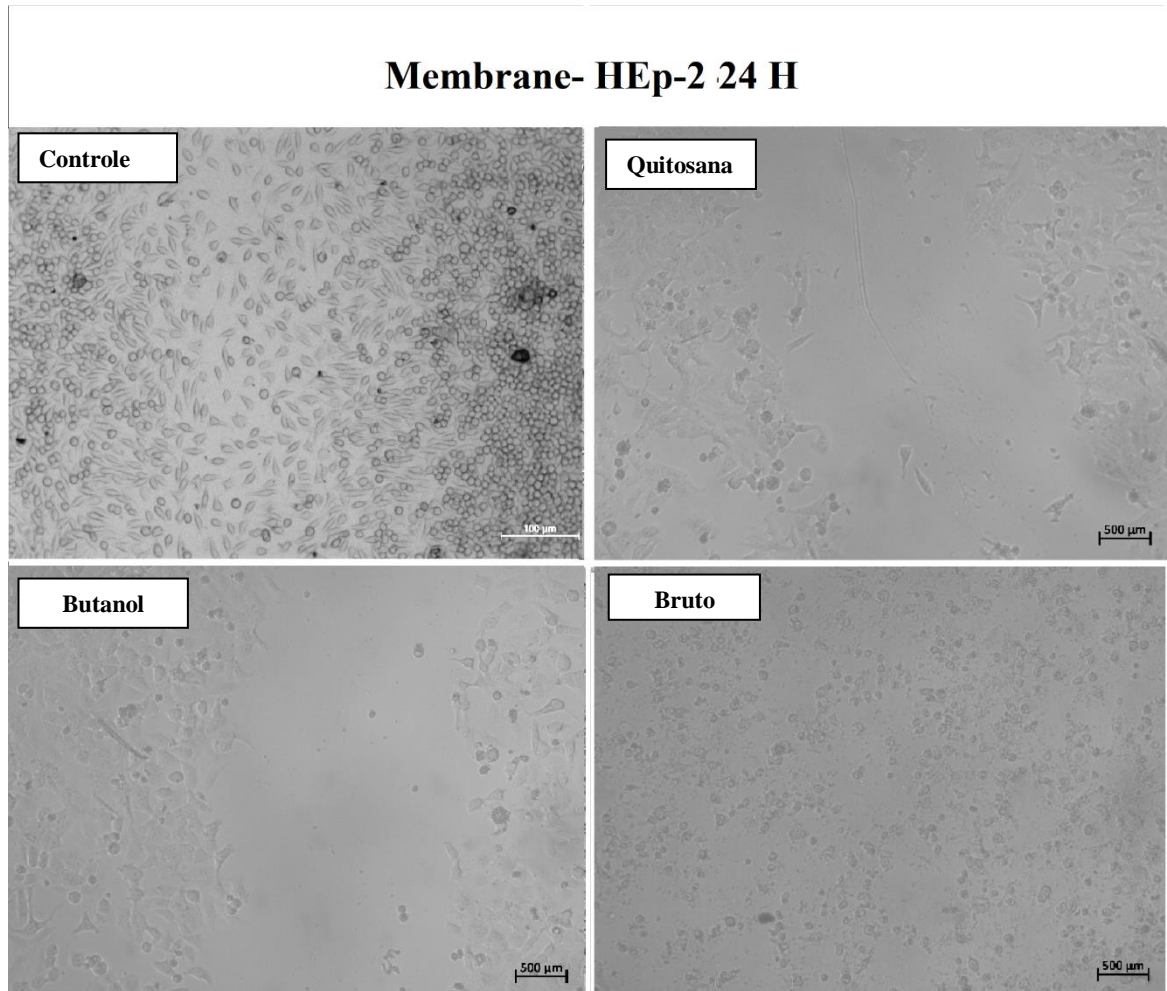
Após a realização da injúria na monocamada da linhagem tumoral HEp-2 determina-se não só o impedimento no fechamento da injúria de todas as membranas testadas assim como é possível observar a alteração na morfologia celular, e provável morte, quando incubadas as células em contato com a membrana diluída associada a fração butanol em 48 h de incubação e ao extrato bruto no período de 24h (Figura 33) e 48 h (Figura 34) quando comparados ao grupo controle de 0 h (Figura 35).

Figura 33: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 0 horas de incubação em linhagem HEp-2.



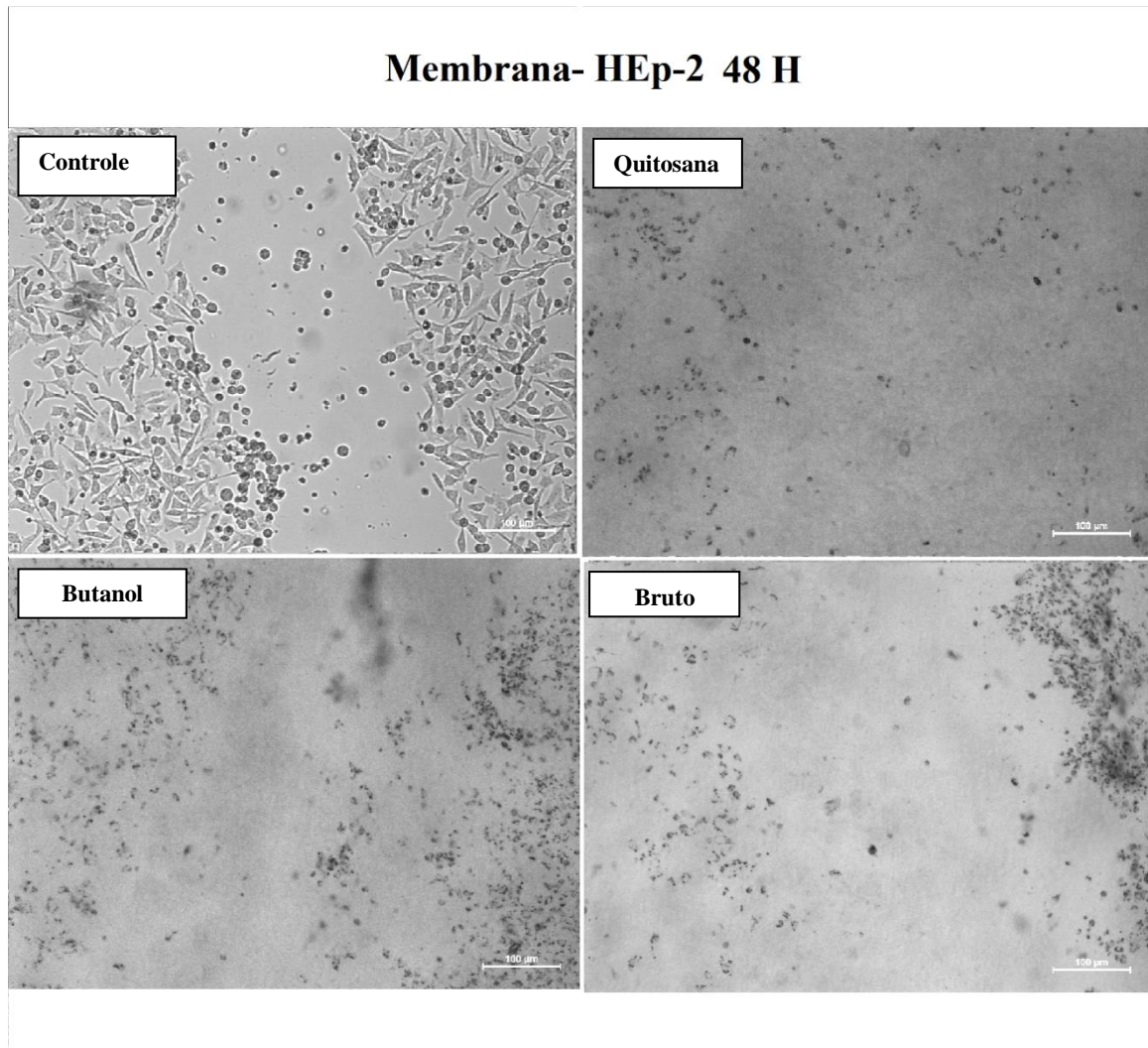
Fonte: autor

Figura 34: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 24 horas de incubação em linhagem HEp-2.



Fonte: autor

Figura 35: Ensaio de migração celular, avaliando a cicatrização induzida pelas membranas de quitosana e membranas associadas a fração Butanol e ao extrato bruto no período de 48 horas de incubação em linhagem HEp-2.

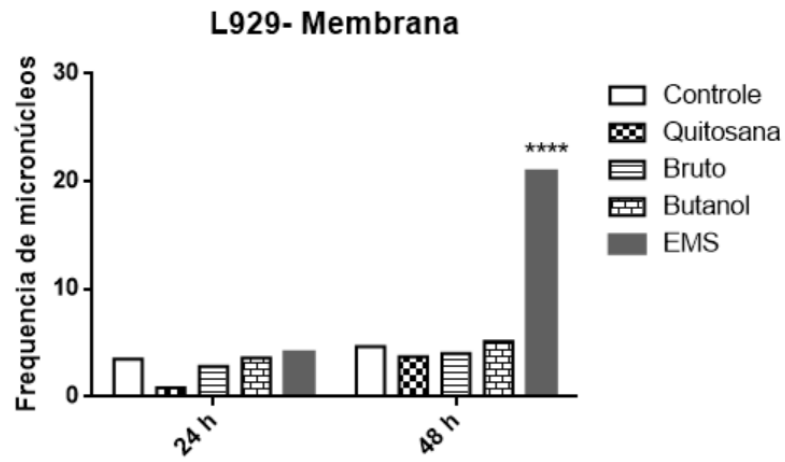


Fonte: autor

#### 5.2.4 Genotoxicidade

O ensaio para detectar a geração de micronúcleos em células de linhagem L929 após a incubação com o biomaterial observou-se uma baixa frequência de micronúcleos em todas as membranas avaliadas quando comparadas ao grupo positivo para geração destes fragmentos (EMS), com valores próximos a quantidade de micronúcleos presentes no grupo controle, não apresentando então diferença estatística (figura 36). Sendo possível notar esta baixa frequência de danos ao DNA nas imagens por fluorescência (figura 37).

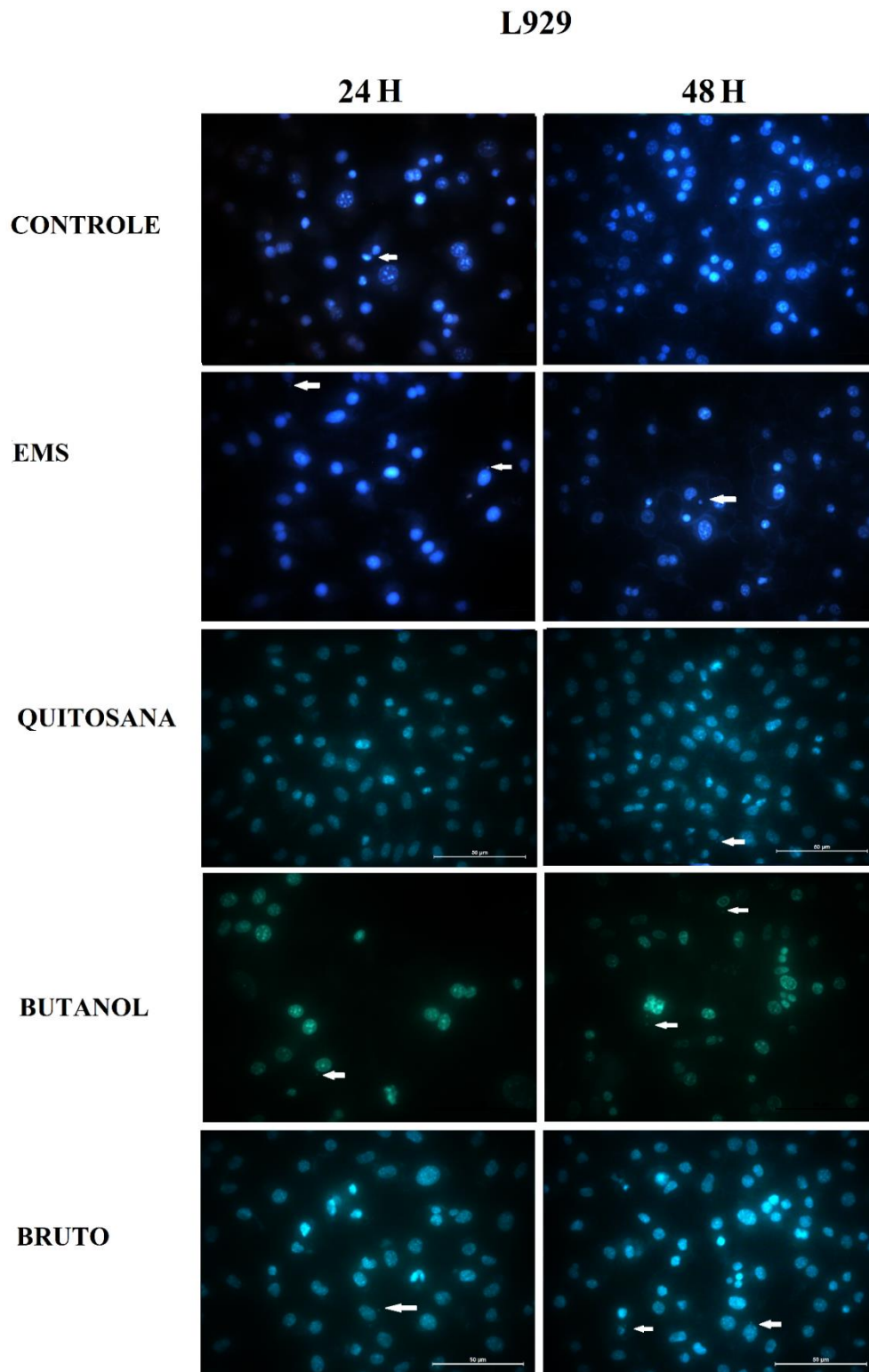
Figura 36: Frequência de micronúcleos gerados a partir da incubação das membranas de quitosana e associadas ao extrato bruto e butanol por 24 e 48 horas em L929.



Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

Figura 37: Ensaio de micronúcleo por fluorescência gerados a partir da incubação das membranas de quitosana e associadas ao extrato bruto e butanol por 24 e 48 horas em L929.

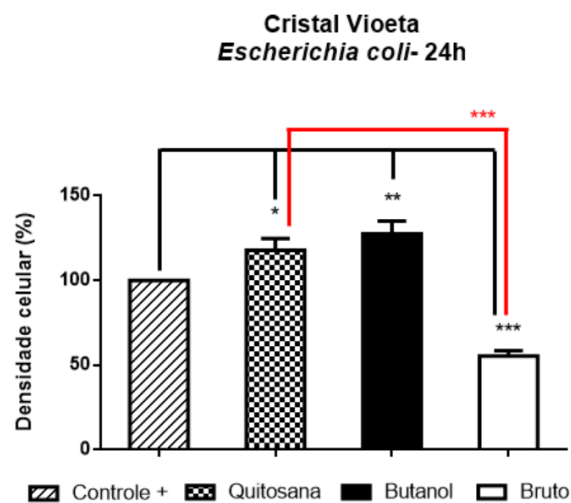


Fonte: autor

### 5.2.5 Atividade antibacteriana

Após a incubação da membranas com a cepa bacteriana *Escherichia coli* observa-se que há uma queda na densidade celular somente quando em contato com o produto da membrana associada ao extrato bruto em relação ao grupo controle de 45% ( $P \leq 0,001$ ), enquanto há uma aumento na porcentagem da densidade celular quando incubadas as bactérias com membrana de quitosana de 18% ( $P \leq 0,05$ ) e membrana de quitosana associada a fração butanol de 28% ( $P \leq 0,001$ ) (Figura 38), com aumento na produção de biofilme de 6% somente quando incubadas com a membrana de quitosana sem adição de extratos (Figura 39). Ao comparar a ação do biomaterial de quitosana e dos biomateriais de quitosana associados aos extratos vegetais pode-se concluir que a membrana contendo o extrato bruto é mais eficiente em reduzir a densidade bacteriana (Figura 39).

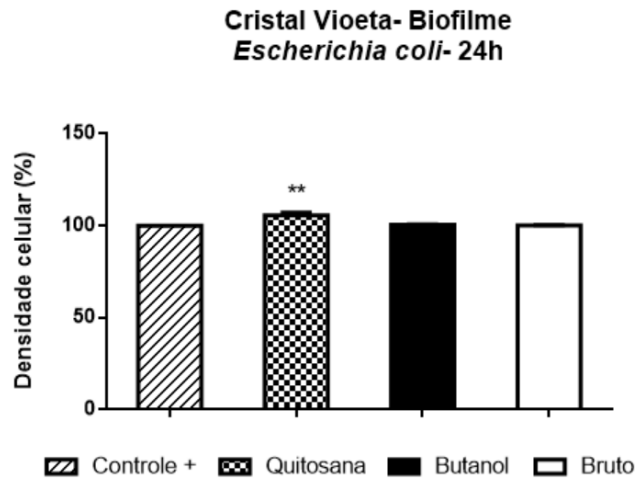
Figura 38: Densidade celular da cepa *Escherichia coli* avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h.



Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

Figura 39: Produção de biofilme da cepa *Escherichia coli* avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação.

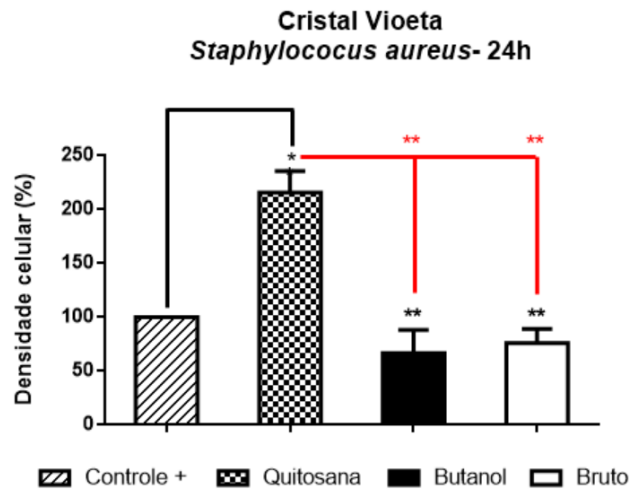


Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

Contudo ao incubar os biomateriais com a cepa *S. aureus* determinou-se a queda na porcentagem da densidade celular quando incubadas com a membrana associada a fração butanol e ao extrato bruto, queda de 33 e 24% respectivamente, enquanto há um aumento na densidade celular de 115% ao incubar com o biomaterial de quitosana sem adição dos extratos. Quando comparada a ação entre as membranas observa-se que os biomateriais associados a fração butanol e extrato bruto possuem maior eficiência na redução da densidade celular (Figura 40). Não é possível observar a interferência das membranas na formação do biofilme bacteriano (Figura 41).

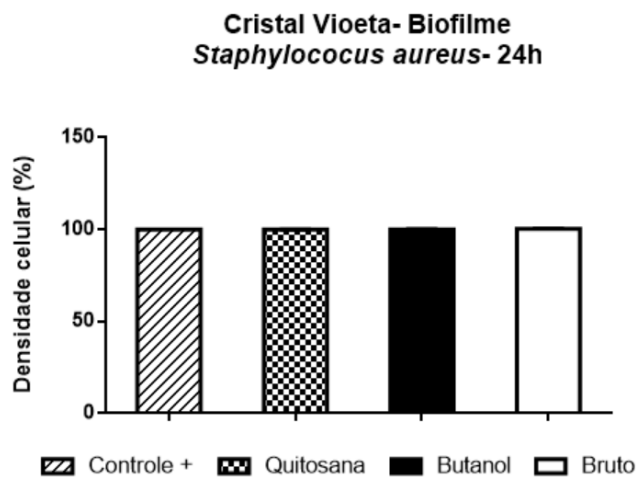
Figura 40: Densidade celular da cepa *Escherichia coli* avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h.



Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

Figura 41: Produção de biofilme da cepa *Escherichia coli* avaliada por Cristal violeta após incubação com o extrato Bruto e frações Acetato de etila e Butanol no período de 24 h de incubação.



Legenda: Significância de  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$ (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) quando comparados ao grupo controle +.

Fonte: autor

Para melhor determinação da ação das membranas na redução da densidade celular realizou-se o teste para contabilizar as unidades formadoras de colônias. Após 24h de incubação com a cepa *E. coli* já tratadas por citotoxicidade indireta das membranas podem-se observar que o grupo tratado com o biomaterial contendo o extrato bruto não gerou nenhuma colônia bacteriana, apresentando-se semelhante ao grupo de controle negativo que contém

bactérias tratadas com antibiótico. Em contrapartida após o tratamento com a membrana contendo a fração butanol apresentou alta formação de colônias, não sendo possível sua contagem, semelhante ao grupo contendo bactérias tratadas com a membrana contendo somente quitosana e visualmente menor quando comparadas ao controle positivo onde não houve tratamento (Tabela 3).

Ao avaliar a unidade formado de colônias em cepa *S. aureus* após a incubação com as membranas foi possível observar novamente a semelhança visual entre o grupo tratado com a membrana contendo extrato bruto e o grupo controle negativo tratado com antibiótico, sem colônias aparentes. O grupo tratado com a membrana contendo a fração butanol apresentou poucas colônias formadas visualmente (16) em menor número comparado ao grupo tratado com a membrana de quitosana e ao grupo controle não tratado (Tabela 3).

Tabela 3: Número de colônias observadas após tratamento com o biomaterial.

<b>Membrana</b>	<b>E. coli</b>	<b>S. aureus</b>
<b>Controle</b>	Crescimento confluyente	Crescimento confluyente
<b>Quitosana</b>	Crescimento confluyente	Crescimento confluyente
<b>Quitosana + Extrato Bruto</b>	0	0
<b>Quitosana + Fração Butanol</b>	Crescimento confluyente	16

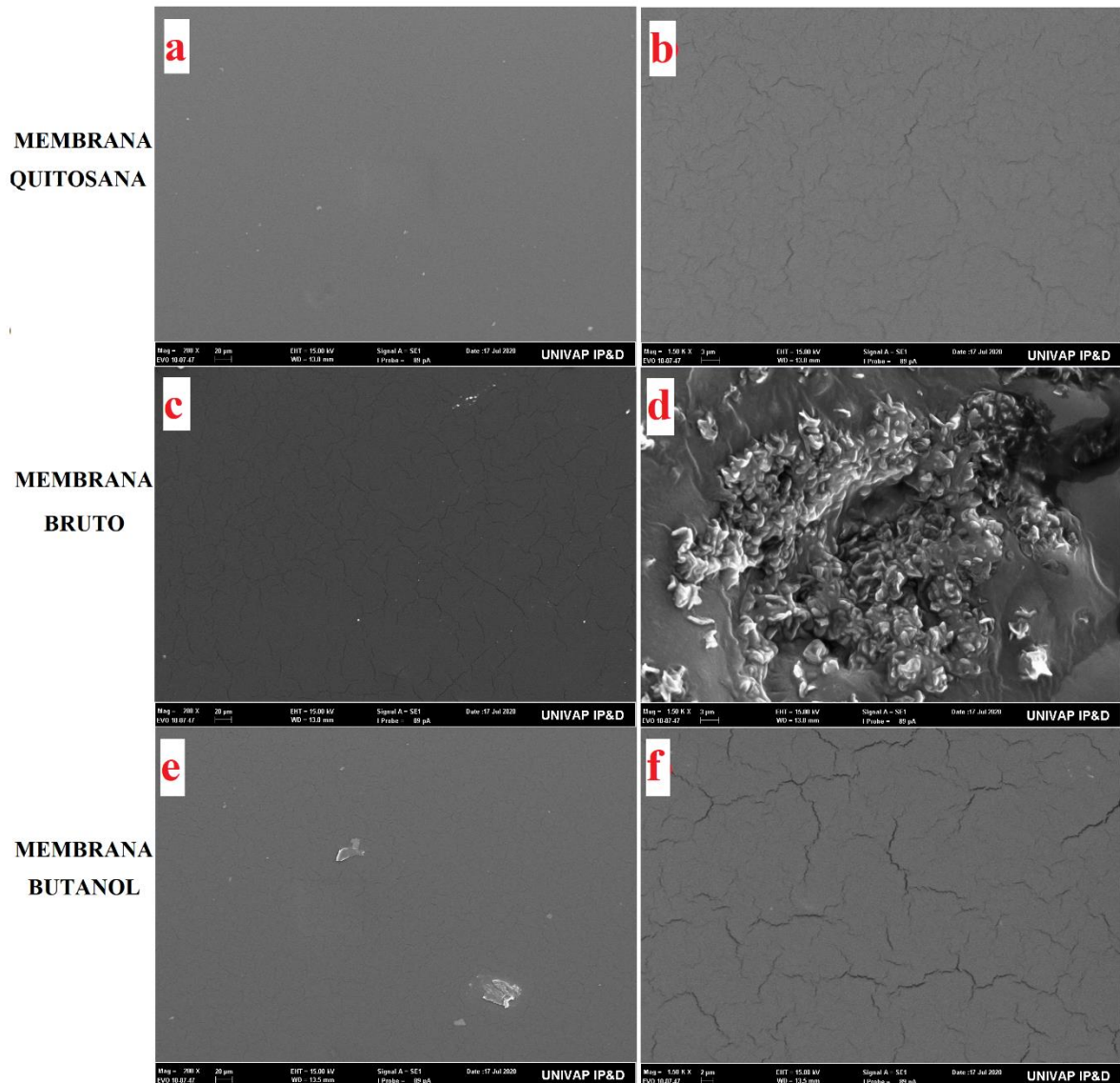
Fonte: autor

### **5.3 Caracterização do biomaterial**

#### **5.3.1 Análise de superfície: Porosidade**

Após a aquisição das imagens em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi possível observar ranhuras nas membranas, sem a presença definida de poros (Figura 42). Em membranas de quitosana associada ao extrato bruto detectou-se a presença de aglomerados de extrato, devido à baixa diluição do extrato bruto na solução do biomaterial (Figura 42d).

Figura 42: Análise de superfície através de Microscopia eletrônica de varredura.



Legenda: (a) Membrana quitosana em 200x e 20µm, (b) Membrana quitosana em 1500x e 3µm, (c) Membrana bruto em 200x e 20µm, (d) Membrana quitosana em 1500x e 3µm, (e) Membrana butanol em 200x e 20µm e (f) Membrana butanol em 1500x e 3µm.

Fonte: autor

### 5.3.2 Espessura

Após as medidas da espessura das membranas com n10 por micrometro digital foi calculado as medias com desvio padrão por grupo (Tabela 4). Pode-se observar que as medidas de espessura entre os grupos de membrana de quitosana e membrana associada a fração butanol apresentaram-se semelhantes havendo uma maior discrepância de valores ter estes grupo e a membrana associa ao extrato bruto.

Tabela 4: Valores das médias com desvio padrão das medidas de espessura em micrômetro digital.

<b>Membrana</b>	<b>Média (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Quitosana</b>	85 $\pm$ 14
<b>Quitosana + Extrato Bruto</b>	123 $\pm$ 34
<b>Quitosana + Fração Butanol</b>	88 $\pm$ 21

Fonte: autor

### 5.3.3 Intumescimento e tempo de degradação

Após 24 horas de incubação a 37 °C em Solução Tampão Salina (PBS) somente a membrana de quitosana apresentou dissolução parcial, deixando a solução em aspecto gelatinoso, diminuindo sua massa em 36 % (Tabela 5). Enquanto as membranas contendo o extrato bruto e fração butanol apresentaram intumescimento com aumento de massa, de 135 % e 59 % respectivamente, além de perda do formato inicial.

Ao fim de 48 horas de incubação houve dissolução total das membranas de quitosana e membrana de quitosana associada a fração butanol, não havendo pesagem. Contudo a membrana de quitosana associada ao extrato bruto permaneceu em dissolução parcial, havendo perda de partes do biomaterial e assim, a diminuição de sua massa de 84 % em relação ao período de 24 h, porém ainda apresentando um aumento de 51 % em relação a massa inicial, sinalizando a necessidade de maior período para dissolução total (Tabela 5).

Tabela 5: Valores em porcentagem de massa das membranas após diluição em PBS.

<b>Membrana</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>Quitosana</b>	100 %	64 %	0 % (Dissolvida)
<b>Quitosana + Extrato Bruto</b>	100 %	235 %	151 %
<b>Quitosana + Fração Butanol</b>	100 %	159 %	0 % (Dissolvida)

Fonte: autor

## 6 DISCUSSÃO

Durante um processo de extração vegetal é necessário que haja a lise celular e solubilidade do ativo no líquido extrator para liberação da matriz contendo entre seus compostos os metabólitos secundários, de ampla ação biológica. A natureza e tamanho dessas partículas influenciam a escolha da metodologia de extração, como uso ou não de calor e o tempo de exposição a esse fator, além da escolha do solvente a ser utilizado. Estes fatores acabam por determinar a seletividade do processo extrativo, bem como o rendimento que será encontrado após o procedimento de extração (SANTOS, 2013; ANDREO; JORGE, 2006; VIERA, 2016; PIOVESAN, 2016).

Franzen *et al* (2018) determinou em seus experimentos um maior rendimento no método de extração por ultrassom, quando exposto o material vegetal por 120 minutos. Estes dados corroboram com o observado neste estudo, onde após a maceração assistida por ultrassom das folhas de jambu por 60 minutos e o devido fracionamento com os solventes Acetato de etila e Butanol, foi observado um maior rendimento, com estatística significativa, na fração Butanol da maceração assistida por ultrassom, quando comparados a extração por Soxhlet realizada em estudos anteriores (PRIANTE-SILVA, 2015).

A composição bioativa e as atividades terapêuticas de uma planta medicinal podem variar de acordo com determinados fatores como o uso de solventes na extração e diluição do extrato vegetal, assim como o tempo de contato com o solvente extrator e a pressão utilizada. (SASIDHARAN *et al*, 2011; HERNÁNDEZ *et al*, 2009). A solubilidade dos compostos está intimamente relacionada à afinidade química e à polaridade, sendo então crítica a escolha do solvente a ser utilizado em uma extração (BISCAIA, 2007; MOURE *et al*, 2001; ROCKENBACH *et al*, 2008). Por manter contato direto com o solvente e não atingir temperatura alta, além do efeito de cavitação gerado facilitando a lise celular e extração da matriz, este método de extração também foi citado por Achat *et al*. (2012) como eficiente, com bons rendimentos, na obtenção de compostos fenólicos a partir das folhas de oliva.

Como já observado extratos etanólicos extraídos a frio ou a quente tendem a obter um melhor rendimento nos teores de metabólitos vegetais (OLIVEIRA *et al*, 2016), porém, com baixa seletividade entre as diversas classes químicas. Dai e Mumper (2010) destacam também que etanol ou metanol, de preferência uma mistura aquosa, acetona e acetato de etila são de maior eficiência na extração e diluição de polifenóis de origem vegetal. Contudo as diferentes características e polaridades de compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos, fazem

com que estes possam não ser solúveis em determinados solventes particulares (TURKMEN; SARI; VELIOGLU, 2006).

Estes fatores podem influenciar a atividade biológica dos compostos e assim torna-se necessária a avaliação da citotoxicidade dos extratos. Apesar de muito consumida no norte e nordeste do Brasil, além de China e Índia, além de aplicada de variadas formas na fitoterapia, *Acmella oleracea* possui respostas tóxicas diversas em estudos relacionados ao potencial uso danoso da planta, apresentando desde atividade citotóxica *in vitro* e tóxica *in vivo* até atividade proliferativa celular e assim cicatrizante (BORGES *et al*, 2013; PRIANTE-SILVA, 2012; FERREIRA, 2013). A variação de respostas a essas atividades está relacionada ao método de extração, solvente utilizado, concentração do extrato aplicado e a parte vegetal em foco, dentre outras.

Estas atividades são em geral associadas à presença de compostos fenólicos, flavonoides e ao espilantol ((2E,6Z,8E)-N-isobutyl-2,6,8-decatrienamide), uma alquilamida característica da *A. oleracea*, obtido a partir da inflorescência e das folhas da planta (BORGES *et al*, 2013; NAKATAMI; NAGASHIMA, 1992; SILVA *et al*, 2016). Estes compostos também estão ligados a diversos estudos relacionados à toxicidade de plantas medicinais.

Como relatado por Lima; Almeida (2014) e Ferreira (2013) que apontaram a capacidade de induzir a cicatrização *in vivo* em feridas cutâneas e tecido ulcerado, respectivamente. Yamane (2016) também aponta a capacidade de induzir a produção de colágeno de membranas associadas ao espilantol oriundo do extrato macerado de jambu, auxiliando a cicatrização cutânea. Em contrapartida Nomura (2013) determinou a toxicidade *in vivo* da planta quando administrada em camundongos na dose letal de 889 mg/kg. Um indício ainda maior da influência da metodologia à resposta bioativa da planta.

A característica de promover a proliferação celular, e assim a cicatrização, fica evidenciado também neste estudo quando observa-se no ensaio de Cristal violeta um aumento da densidade celular na linhagem L929 (fibroblasto de camundongo) na Fração Butanol, assim como um aumento da atividade mitocondrial na concentração de 1000 µg/mL da mesma fração e no mesmo período de incubação de 24 horas, respostas essas mais vantajosas em relação à fração Acetato de etila, em relação a viabilidade em seu uso na RTG. Corroborando com as imagens observadas pelo teste de migração celular, encontrando após 24 h de incubação com este extrato a injúria completamente recuperada, caracterizando uma proliferação celular evidente quando comparado ao grupo controle sem a adição de extrato de jambu.

O oposto é observado na fração composta pelo extrato bruto, sem fracionamento, onde no período de 48 horas de incubação as células de fibroblastos de camundongo apresentaram uma

redução da densidade celular assim como uma queda na atividade mitocondrial em 24 e 48 horas de incubação, não ultrapassando 14% de redução, porém mostrando a influência negativa à viabilidade celular. Refletindo no teste de migração celular, onde a injúria permaneceu mesmo após 48 h de incubação, indicando uma baixa na atividade celular e/ou uma queda na proliferação celular, podendo ser necessário um maior período de incubação para o total fechamento da injúria. O mesmo foi observado em estudos anteriores utilizando o extrato bruto de *Acmella oleracea*, obtido com extração por Soxhlet em etanol 70% e diluído em metanol, observou-se uma importante redução da viabilidade celular pelo ensaio MTT e despolimerização do citoesqueleto levando as células à morte por apoptose (PRIANTE-SILVA, 2012).

Estes dados anteriores diferem do observado neste estudo onde aproximadamente 40% das células L929 se apresentaram em processo de morte em 24h, este número mesmo que menor representa uma alta taxa de células em estresse e alteração que podem se recuperar em 48h ou mais de incubação. Já quando incubados com a fração butanol aproximadamente 74% se apresentaram viáveis, número este maior que o observado no grupo controle (69%) e que corrobora com o observado no teste de cristal violeta, com um aumento na densidade celular.

Ainda em estudos anteriores, foi encontrado como compostos principais nas frações butanol os flavonoides e ácidos fenólicos, sendo estes associados ao aumento da densidade celular observada assim como a baixa na densidade celular quando incubadas em cultura de fibroblastos de camundongo e em altas doses de extrato de jambu, visto que flavonoides possuem uma relação de dose dependências com suas atividades (PRIANTE-SILVA, 2015).

Flavonoides e outros compostos fenólicos são apontados como potenciais compostos antitumorais principalmente por sua atividade antioxidante, reduzindo a formação de radicais livres e neutralizando as espécies oxidantes (SIMÕES *et al*, 2003; MILITÃO, 2005). Sonoda *et al.* (2004) caracterizou esta capacidade dos flavonoides em células de leucemia humana (HL60), onde 10 dos 17 flavonoides testados apresentaram citotoxicidade. Ainda sobre células leucêmicas flavonoides como apigenina, miricetina e quercetina são capazes de induzir a morte por apoptose através do estímulo da liberação do citocromo-c (BEUTLER *et al*, 1998).

Esta atividade antitumoral foi observada também neste estudo após incubar células de câncer de laringe humana (HEp-2) com a fração butanol. Após o período de 24 e 48 horas de incubação houve queda na densidade celular de todos os extratos testados na concentração de 1000 µg/mL, sendo mais expressiva esta queda na fração butanol e extrato bruto. Havendo, porém, uma queda na atividade mitocondrial somente no extrato bruto em 24 e 48 h, infere-

se então uma provável morte celular com ativação por vias mitocôndrias como sugerido por (BEUTLER *et al*, 1998) citado anteriormente.

Esta morte foi observada por citometria onde aproximadamente 98% de células incubadas com o extrato bruto e 97% após incubação com a fração butanol apresentaram-se em estado de morte por apoptose ou necrose, corroborando com a baixa densidade observada no teste de cristal violeta e com a alteração na morfologia observada no teste de cicatrização.

Determinou-se também a interferência do extrato na proliferação celular, onde todas as amostras impediram o fechamento da ferida em até 48 horas de incubação. Houve ainda uma mudança na morfologia celular e alteração na densidade celular observadas no teste de migração. Resultados semelhantes aos obtidos por Moraes (2018), quando avaliada em maior concentração de 2000 µg/mL o extrato da raiz de jambu também interferiu na proliferação de HEP-2.

Moraes (2018) determinou ainda uma redução da densidade celular, pelo ensaio de cristal violeta, da fração acetato de etila e butanol quando incubados em 24 e 48 horas na concentração de 1000 µg/mL. Uma baixa na apresentação de micronúcleos gerados quando comparados a grupo controle, relacionado esse fato à morte celular.

Designa-se micronúcleo uma porção de material genético de aparência arredondada ou ovalada no citoplasma, este é oriundo de uma lise do DNA gerados principalmente por compostos carcinógenos (SETÚBAL *et al*, 2005).

Este fator traz grande importância visto que para que a fração butanol, que apresenta atividade cicatrizante e antitumoral para HEP-2, possa ser empregada a um biomaterial, este não deve possuir atividade genotóxica, como incentivar o aparecimento destes fragmentos por exemplo. Sendo assim, quando avaliado por microscopia de fluorescência observou-se que há a presença significativa de micronúcleos gerados pela fração butanol quando comparado ao controle em 24 h, porém esse número de micronúcleos decresce, deixando de ter diferença significativa, em 48 h de incubação com a mesma fração. Podendo este fato não estar relacionado exclusivamente ao extrato, mas a outros fatores como o estresse celular presente no procedimento de plaqueamento para experimentação.

Assim, para que o biomaterial gerado possa realizar também a atividade antibacteriana, os extratos que compõem a membrana tiveram esta atividade avaliada sob cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Todas as concentrações (250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL) da fração Acetato de Etila e extrato bruto, assim como a concentração de 500 µg/mL da fração butanol, mostraram atividade antibacteriana para *Escherichia coli*, mas nenhuma das frações influenciou a síntese do biofilme bacteriano. Resultado este diferente

quando comparado ao observado por estudos prévios em vias de publicação, onde o extrato bruto etanólico de jambu extraído por *Soxhlet* apresentou, após fracionamento, atividade antibacteriana da fração butanol em 1 mg/mL (PRIANTE-SILVA, 2015), evidenciando novamente a influência da metodologia de extração e escolha de solvente à atividade biológica do extrato.

Outros estudos apontam também as frações acetato de etila e metanol do extrato foliar de *Acmella oleracea* como citotóxica em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (ARORA *et al*, 2011). O mesmo foi observado nos testes de inibição em *E. coli* de Daysi *et al*, 2013 e Borate; Disale (2013), onde o extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea* apresentou uma das maiores zonas de inibição com extrato metanólico agindo sobre *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia sp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Sendo associada esta atividade em *Streptococcus* à presença de flavonoides, compostos fenólicos e terpenos, indicando a planta para uso potencial no combate à caries (THOMPSON, SUKESH, SINGH, 2012).

Ao fazer parte da microbiota de pele e fossas nasais, as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* podem acometer outras regiões, invadindo tecidos após uma lesão por exemplo, isto acaba por trazer um fator de risco às pessoas debilitadas imunologicamente, queimados, entre outros (SANTOS *et al*, 2007). Assim como invadir novas regiões após um procedimento cirúrgico ou lesões, situações estas que necessitam de um processo de cicatrização ideal e rápido sem que haja uma infecção para interferir negativamente.

Assim, os resultados observados com as frações neste estudo tornam promissor a associação destes a um biomaterial que possa agregar suas atividades terapêuticas observadas. Nestes resultados temos a eficiência das membranas em diminuir a densidade celular *in vitro* da linhagem tumoral HEP-2, principalmente a membrana de quitosana associada ao extrato bruto e a membrana somente de quitosana. Quando associado a diminuição significativa na atividade mitocondrial por todas as membranas testadas na mesma linhagem e a mudança na morfologia e impedimento da divisão celular observada no teste de cicatrização apontam o potencial uso do biomaterial no tratamento de cânceres superficiais, como os epidermóides.

Camargo (2017) ao avaliar a citotoxicidade e ação da membrana de quitosana como carreadora do fármaco antitumoral imiquimode determinou a redução da viabilidade celular em células tumorais epiteliais humanas (FaDu) e em uma linhagem de câncer de mama murinho (4T1). O mesmo foi observado por Furtado (2014) ao associar a curcumina à membrana de quitosana, esta funcionou como carreador de fármaco ao realizar a incubação em células tumorais MCF-7, a viabilidade observada caiu para menos de 20%, enquanto a

viabilidade após a incubação da membrana de quitosana sem a associação esteve em 80%. Em contraste à Souza-Neto *et al.* (2019) que ao estudar a citotoxicidade de membranas de quitosana sem adição de nenhum fármaco determinou a viabilidade no uso das mesmas em 70%.

Contudo, os mesmos biomateriais testados neste estudo também apresentaram, ainda que baixa, uma redução na densidade celular e atividade mitocondrial em células de linhagem não tumoral L929, mantendo-se bem acima do valor ideal de 50%. Os biomateriais também diminuíram o tempo de fechamento da ferida quando comparado ao observado pelas frações do extrato, não havendo o fechamento da injúria em até 48 horas de incubação. De maneira positiva, não houve aumento na frequência de micronúcleos após a incubação com as membranas, quando comparados ao grupo controle, assim como afirmado por Santos (2015) em que determinou a baixa geração de micronúcleos de membrana de quitosana. O mesmo foi observado em estudo de membrana de quitosana, sem a adição de extrato, onde o biomaterial não demonstrou um aumento da atividade mitocondrial como o esperado, mas ainda assim não apresentou redução abaixo de 50% de atividade (GRANATO *et al.*, 2011).

Yamane (2016) determinou também a eficiência de um biomaterial contendo o extrato de jambu, o adesivo aumentou significativamente a produção de colágeno e fechamento de ferida em úlceras epidérmicas. O que difere estes resultados ao encontrado neste trabalho é a adição de glicerina e Transcutol<sup>®</sup>, um solubilizante de compostos que normalmente não solubilizam em solventes orgânicos.

A mudança na resposta citotóxica observada entre as frações do extrato e membranas associadas a estas frações podem estar relacionadas a degradação e solubilização do biomaterial, interferindo na entrega dos compostos responsáveis pelas atividades terapêuticas às células, variando entre testes de citotoxicidade direta e indireta.

Quando não há atividade citotóxica relevante para células não tumorais e atividade tóxica para células tumorais o biomaterial necessita apresentar atividade tóxica para as cepas bacterianas em teste para comprovação de sua atividade antibacteriana. Somente a membrana contendo extrato bruto apresentou toxicidade para ambas as cepas *E. coli* e *S. aureus* com redução significativa da densidade celular além de não apresentar unidades formadoras de colônias quando analisadas visualmente em placas de Petri. Resultado semelhante foi observado por Bueno (2019) onde as membranas formadas a partir de alginato de sódio e quitosana associadas ao extrato bruto de *A. oleracea* apresentou 100% de eficiência contra *E. coli* e *S. aureus* não apresentando colônias formadas após os testes.

A mudança na resposta citotóxica observada entre as frações do extrato e membranas associadas a estas frações podem estar relacionadas a degradação e solubilização do biomaterial, interferindo na entrega dos compostos responsáveis pelas atividades terapêuticas às células, variando entre testes de citotoxicidade direta e indireta.

Sabe-se que membranas biodegradáveis, de característica reabsorvível quando em contato direto com um ambiente aquoso acabam por iniciar quatro estágios de degradação de seus polímeros, sendo elas a hidratação, perda de força, perda de massa e assim também sua integridade e pôr fim a lise quando absorvidas por células em um sistema biológico (BRUNEL et al, 1998; NOWZARI et al, 1996). Estas três primeiras etapas foram observadas neste trabalho, visto que quando em solução salina as membranas absorveram a solução, passando por uma intumescência e atingindo uma massa superior a 100% da massa inicial, para em seguida perder massa até sua completa dissolução. Isto ocorreu em menos de 48h para a membrana contendo apenas quitosana e para a membrana contendo a fração butanol de *A. oleracea*, porém não se pode observar o mesmo no biomaterial associado ao extrato bruto, que também apresentou maior rugosidade e grânulos quando analisados sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), devido à baixa solubilidade do extrato bruto em solução de preparação da membrana.

O tempo para conclusão de cada uma das etapas de degradação da membrana depende de diversos fatores como o pH do ambiente aquoso, da natureza do polímero utilizado no biomaterial, da temperatura, volume e massa da membrana e de possíveis aditivos ao biomaterial, como por exemplo compostos derivados de extratos vegetais. Isto torna amplo o conceito dos biomateriais biodegradáveis associados a extratos vegetais, visto que esta diversidade cria membranas únicas com características variadas, demonstrando diferenças em rugosidade quando avaliadas em MEV, diferentes taxas de absorção e tempo de degradação (BRUNEL et al, 1998; NOWZARI et al, 1996; SOUZA NETO et al, 2019; GERZSON et al, 2016; NASCIMENTO et al, 2016).

Assim, é importante salientar que mesmo não apresentando 100% de atividade sob determinada cepa bacteriana ou em células L929 para cicatrização os biomateriais como membranas de quitosana possuem um referencial permitido de 50% de biocompatibilidade como viabilidade mínima aceitável (Souza-Neto *et al*, 2019). Ainda que não observada sua ação cicatrizante nos períodos estudados a ação antimicrobiana e antitumoral se fez presente a tal ponto de poder ser indicadas em diferentes formulações, com extrato bruto e fração butanol de *Acmella oleracea*, para ações diferentes de acordo com sua melhor resposta observada. Por exemplo com maior atividade cicatrizante e antitumoral a membrana contendo

fração butanol é de melhor indicação, enquanto para uma determinada ação antibacteriana e até mesmo antitumoral teremos a membrana contendo o extrato bruto como melhor indicação. Estas respostas foram obtidas em 24 e no máximo 48 horas de incubação com as células o que corrobora com o tempo de degradação e assim liberação dos extratos e gelificação do biomaterial, apontando sua ação em pouco tempo e conseqüentemente seu uso contínuo necessário.

## **7 CONCLUSÃO**

Dado o exposto, a Fração Butanol promoveu um melhor aumento da densidade celular e atividade mitocondrial em 24 h, além de melhor fechamento de injúria em 1000 µg/mL sobre L929. Não apresentando atividade genotóxica em 48h. Todas as frações, em 1000 µg/mL apresentaram ação tóxica sobre HEP-2, diminuindo a densidade celular, com redução da

atividade mitocondrial somente no extrato bruto, além de impedir o fechamento da injúria. Sobre sua ação antibacteriana todas as frações apresentaram ação citotóxica sobre a cepa *Staphylococcus aureus*, reduzindo a densidade celular sem interferência na formação do biofilme.

Após os testes com o biomaterial, a membrana contendo a fração butanol apresentou redução da densidade celular, porém gerando um aumento na atividade mitocondrial em linhagem L929 retardando o fechamento da injúria até 48h sem atividade genotóxica, e somente baixa significativa na atividade mitocondrial de HEP-2 apesar de visualmente interferir na morfologia celular impedindo o fechamento da injúria. Entretanto, a membrana contendo o extrato bruto não apresentou atividade sob linhagem L929, reduzindo somente o tempo de fechamento de injúria sem atividade genotóxica, porém demonstrou atividade citotóxica com redução da atividade mitocondrial e densidade celular em HEP-2 impedindo o fechamento da injúria e induzindo a perda de morfologia e aderência celular. A membrana contendo extrato bruto também se apresentou como a mais eficiente na diminuição da densidade celular bacteriana em 24h de incubação com *E. coli* e *S. aureus*, além de inibir completamente a formação de colônias em placas, além de ter uma degradação mais lenta permitindo a liberação contínua do extrato.

Mais estudos devem ser realizados para identificar o melhor tempo de ação cicatrizante do biomaterial, superior a 48 h, visto que ambas as formulações do biomaterial apresentaram ação antibacteriana e antitumoral com degradação rápida entre de 24 e 48 horas.

## REFERÊNCIAS

- ACHAT, S. *et al.* Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 777–786, 2012.
- ALBURQUERQUE, J. M. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília, DF: ABEAS; MEC, 1989, 96p.

ALCANTARA, B.N. *et al* Pharmacognostic analyses and evaluation of the in vitro antimicrobial activity of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (Jambu) floral extract and fractions. **J. Medicinal Plants Res.** V.9. pp. 91 – 96, 2014.

ANDRADE, T. A. M. *et al.* The Inflammatory Stimulus of a Natural Latex Biomembrane Improves Healing in Mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 10, p. 1036-47, 2011.

ANDRADE, C. G. **Analgesia e antissepsia do extrato de *Acmella oleracea* na pele: ensaio clínico aleatório.** 2016. 53f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde). Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre – MG. 2016.

ANDREO, D; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ARORA, S; VIJAY, S; KUMAR, D. Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 145-50. 2011.

BALDUINO, T. Y. **O uso da quitosana como biomaterial no tratamento da periodontite.** 26p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Odontologia). Centro universitário Unifacvest. 26p. 2019.

BARBAS, L. A. L. *et al.* Jambu, *Spilanthes acmella* como um novo anestésico para juvenis de tabaqui, *Colossoma macropomum* : respostas ao estresse secundário durante a recuperação. **Aquicultura**, v.456, pp. 70 – 75. 2016.

BISCAIA, D. **Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas.** Florianópolis: UFSC, 2007. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BECKER, M. M. **Métodos de quantificação de espécies metálicas por espectrometria atômica e avaliação nutricional em tecidos de jambú (*Acmella oleracea*).** 2012. 80p. Dissertação de Mestrado (Química). Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-RR. 2012.

BEUTLER J. A. *et al.* Structure-Activity Requirements for Flavone Cytotoxicity and Binding to Tubulin. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 41, p 2333-2338. 1998.

BORATE P. P; DISALE S. D. Studies on antibacterial activity of *Acmella oleracea* (L.) Murr. **International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care**, v.3, n.5, p.36-42. 2013.

BORGES, L. S. **Biomassa, teores de nutrientes, espilantol e atividade antioxidante em plantas de Jambu (*Acmella ciliata* Kunth) sob adubação mineral e orgânica.** 2009. 108p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura). Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP, 2009.

BORGES, M. S; PICH, C. T; AMARAL, P. A. **Fracionamento e análise microbiológica da *Cunila microcephala* Benth. (LAMIACEAE).** UNESC, 2012. 14 p. Monografia (TCC). Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC. 2012.

BORGES, L. S. *et al* Produtividade e acúmulo de nutrientes em plantas de jambu, sob adubação orgânica e mineral Productivity and accumulation of nutrients in plants of jambu, under mineral and organic fertilization. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 83-94. 2013.

BRIÃO, M. M. M. **Desenvolvimento de um substituto ósseo a partir da associação de biomateriais com células-tronco**. 71p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2020.

BRINGEL JR, J. B. A. **A tribo Heliantheae Cassini (Asteraceae) na bacia do rio Paranã (GO, TO)**. 152p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Botânica), Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

BROETTO, J; *et al* . Tratamento cirúrgico dos carcinomas basocelular e espinocelular: experiência dos Serviços de Cirurgia Plástica do Hospital Ipiranga. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, São Paulo , v. 27, n. 4, p. 527-530, 2012.

BRUNEL G. *et al*. Guided bone regeneration for immediate non-submerged implant placement using bioabsorbable materials in Beagle dogs. **Clin Oral Implants Res**. Oct; v.9, n.5, p 303-12. 1998.

BRUM, A. A. S; DE ARRUDA, L. F; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009.

BUENO, R. S. **Desenvolvimento de filmes funcionais incorporando extrato de *Acmella oleracea* para fins cosméticos e antimicrobiano**. 66p. Dissertação de Mestrado (Inovação tecnológica), Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. 2019.

CALGARO, C. O. *et al*. Supercritical extraction of polymers from printed circuit boards using CO<sub>2</sub> and ethanol. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, v. 22, n. October, p. 307–316, 2017.

CAMARGO, L. G. **Desenvolvimento de membranas mucoadesivas compostas por diferentes proporções de quitosana e alginato para a liberação controlada do fármaco antineoplásico imiquimode**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Faculdade de Engenharia Química, Universidade estadual de Campinas. 2017.

CAO, Y; WANG, B. Biodegradation of Silk Biomaterials. **Int. J. Mol. Sci.**, v.10, p.1514-1524, 2009.

CARVALHO, A. *et al*. Papilomavírus humano como fator etiológico do carcinoma epidermoide bucal. **Cadernos UniFOA**, e.43, 2020.

CASAZZA, A. *et al*. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. **Journal of Food Engineering**, v.100, p.50-55, 2010.

CASTRO, M. D. L; CAPOTE, F. P. Analytical applications of ultrasound. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 413, 2007.

CAVALCANTI, V. M. S. **Extração de epilantol de *Spilanthes acmella* var. *oleracea* com dióxido de carbono supercrítico**. 165f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CHAKRABORTY, A. *et al.* Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. **Indian Journal of Pharmacology**, v.36, p.148-150. 2004.

CHAKRABORTY, A. *et al.* Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animals models. **Indian Journal Pharmacology**, n.42, p. 277-279, 2010.

CHEMAT, F; HUMA, Z; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 18 p. 813–835, 2011.

DAI, J; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v.15, p.7313-7352, 2010.

DELIBERADOR, M. T. *et al.* Regeneração tecidual guiada no tratamento dos defeitos de furca classe II. **RSBO**, v.5, n.3, p. 57-65. 2008.

DRURY, J. L; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351. 2003.

EKANEM, A. P. *et al.* Antiobesity properties of two African plants (*Afromomum melegueta* and *Spilanthes acmella*) by pancreatic lipase inhibition. **Phytoterapy Research**, v. 21, p. 1253 – 1255, 2007.

ESCRIVÁ, C. *et al.* Comparison of four methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates. **Journal of Chromatography A**, v.676, p.375,1994.

FERNÁNDEZ, M. de los Á. *et al.* Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. **Food Chemistry**, v. 239, p. 671–678, 2018.

FERREIRA, D. M. **Avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen em ratas.** 2013. Dissertação (mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba; 2013.

FERREIRA, F. A. **Avaliação da toxicidade e do potencial angiogênico do látex de pinhão manso.** 2015. 46f. Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal pela Universidade Estadual de Goiás, GO. 2015.

FRANZEN, F.L. *et al.* Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. **Acta Iguazu**, v.7, n.1, p. 9-21, 2018.

FURTADO, G. T. F. S. **Quitosana/curcumina: membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma.** 2014. 88f. Dissertação de Mestrado Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande- PB. 2014

GARCIA-SALAS, P. *et al.* Phenolic Compound Extraction Systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, Basel, v. 15, p. 8813-8826, 2010.

GERZSON, A. S. *et al.* Membranas para barreira utilizadas em ROG: características e indicações. **J Clin Dent Res**, v.13, n.4, p.120-5. 2016.

GIESBRECHT, P. C. P. **Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato**. 2011. 61f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciência Animal). Centro Universitário de Vila Velha. 2011.

GRANATO, A. E. C. *et al.* Avaliação da citotoxicidade de membranas de quitosana em cultura de células. **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba**, São José dos Campos-SP, 2011.

GREGER, H. Alcamidas: uma reconsideração crítica de uma classe multifuncional de amidas de ácidos graxos insaturados. **Fitoquímica Comentários**, pp. 729 – 77015, V. 5. 2016.

HENCH, L. Biomateriais: uma introdução. In: ORÉFICE, R.L., MAGALHÃES, M.M., MANSUR, H.S., eds. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro:Cultura Médica, p.1-7, 2006.

HERCULANO, R. D. *et al.* Natural Rubber Látex Used as Drug Delivery System in Guided Bone Regeneration (GBR). **Mat Res**.12(2):253-6. 2009.

JANEGITZ, B. C. *et al.* . Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 30, n. 4, p. 879-884, Aug. 2007 .

KLEJDUSA, B. *et al.* Solid- phase/supercritical- fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in fresh water microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, p. 763-771, 2009.

KLEMM, D. *et al.* Bacterial synthesized cellulose artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603. 2001.

KOSTER, J; PHILIPSON, W. R. Nomenclatural changes in *Spilanthes* and *Blainvillea* with remarks and a key to the species of *Spilanthes* in the Malay Archipelago. **Blumea**, v.6, p.349-354. 1950.

KUSUMA, H. S; ALTWAY, A; MAHFUD, M. Solvent-free microwave extraction of essential oil from dried patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) leaves. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 58, p. 343–348, 2018.

LANGER, R; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926. 1993.

LEY, J. P; KRAMMER, G; BERTRAM, H. J. Structure activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkamides related to spilanthol. **In Proceedings of the 11th Weurmann Flavour Research Symposium**, Roskilde, Denmark. 2005.

LIDIA, D. A. *et al.* Microwave-Assisted Extraction of Phytochemicals and Other Bioactive Compounds. **Reference Module in Food Science**, n. 2016, p. 1–10, 2017.

LIMA, G. C; ALMEIDA, M. B. Avaliação anatomo-patológica de feridas cutâneas cicatrizadas sob influência de spilanthol em ratos wistar. 2014, **XXV Seminário de Iniciação Científica da UFPA**, Belém-PA, 2014.

LUQUE-GARCÍA, J. L; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.1, p.41-47. 2003.

MACTHEI, E. E. *et al.* Clinical, microbiological, and histological factors which influence the success of regenerative periodontal therapy. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 65, n. 2, p. 154-161. 1994.

MAIA, M. *et al.* Reconstrução da estrutura facial por biomateriais:revisão de literatura, **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.25, n.3, p.566-572, 2010.

MARTINS, C. M. **Avaliação da avid vegetal de jambú (*Spilanthes acmella*) em isolados de Staphylococcus spp. provenientes de amostras de leite de bovinos.** 2020. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

MARTINS, C. P. S. *et al.* O Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de jambu (*Spilanthes oleracea* L.) nas condições do Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.2, p.410-413, 2012.

MBEUNKUI, F. *et al.* Isolation and identification of antiplasmodial N-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1886-1892, 2011.

MEDEIROS, L. A. D. *et al.* Esferas de quitosana/*D. ambrosioides* (mastruz) para aplicação como biomaterial. **Revista brasileira de odontologia**, v. 73, n. 2, p. 124-9. 2016.

MILITÃO, G. C. G. **Potencial antitumoral de flavonoides isolados de plantas do nordeste brasileiro: estudos preliminares da relação estrutura-atividade citotóxica.** 2005. Dissertação (Mestrado em farmacologia) UFC, Fortaleza-Ce. 2005.

MOORE, A. H. Revision of the Genus *Spilanthes*. **Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences**, v.42, n.20, p.521-569, 1907.

MORAES, A. V. **Avaliação genotóxica do extrato fracionado da raiz de *Acmella oleracea* em linhagem tumoral de cancer de laringe humano.** 2018. 64f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia biomédica). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2018.

MORAES, G. F. **Regeneração tecidual guiada.** 2002. 53f. Monografia (Curso de Especialização em Periodontia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2002.

MORAES, A. V. **Avaliação genotóxica do extrato fracionado da raiz de *Acmella oleracea* em linhagem tumoral de câncer de laringe humana.** 2018. 64p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia Biomédica). Universidade do Vale do Paraíba (Univap). 2018.

MORENO, M. S. M. S. **Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo.** 2014. 75p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. 2014.

MOURE, A. *et al.* Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

NAKATANI, N; NAGASHIMA, M. Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.56, n.5, p.759-762, 1992.

NASCIMENTO, A. M. **Polissacarídeos e metabólitos secundários de *Spilanthes Oleracea* L. (Jambu)**. 2012. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica), UFPR. Curitiba, 2012.

NASCIMENTO, D. L. *et al.* Preparo e caracterização de membrana de colágeno e gelatina com adição de resina de jatobá. **Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, 2016, Foz do Iguaçu**. Preparo e caracterização de membrana de colágeno e gelatina com adição de resina de jatobá, 2016.

NOMURA, E. C. O. **Avaliação do potencial terapêutico do extrato etanólico e da fração rica em alquilamidas obtidos das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.k. jansen, em modelos de nocicepção em camundongos**. 2013. 84f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná, 2013.

NOWZARI, H. *et al.* The dynamics of microbial colonization of barrier membranes for guided tissue regeneration. **J Periodontol**. V.67 n.7, p.694-702. 1996.

OLIVEIRAA, A. P. R. **Desenvolvimento de membranas de gelatina/quitosana e o estudo do processo de reticulação**. 2013. 70f. Dissertação de mestrado em Ciências ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, USP. 2013

OLIVEIRAB, D. G. S. **Toxicidade em peixes submetidos a fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado**. 2013. 81f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Lavras, 2013.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.18, n.1, supl. I, p.230-239, 2016.

PARK, S.W. *et al.* Reconstruction of defects after excision of facial skin cancer using a venous free flap. **Ann Plast Surg**. V.67, n.6, p.608-11. 2011.

PEDRON, I. G. *et al.* Carcinoma epidermóide: diagnóstico e condutas imediatas. **Rev Inst Ciênc Saúde**. v.24, n.3, p.237-41. 2006.

PIAIA, L. **Incorporação de *Aloe vera* em membranas de celulose bacteriana afeta a proliferação de fibroblastos e queratinócitos**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 71p, 2014.

PIOVESAN, N. **Influência de diferentes parâmetros em métodos de extração de compostos bioativos de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) e atividade antioxidante e antimicrobiana**. 2016.120p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

PIRES, A. L. R; BIERHALZ, A. C. K; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PRACHAYASITTIKUL, S. *et al.* Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v.14, p.850-67. 2009.

PRIANTE-SILVA, C. A. **Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Spilanthes oleracea* e seu potencial uso no tratamento do câncer**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade do Vale do Paraíba (Univap), 2012.

PRIANTE-SILVA, C. A. **Fracionamento biomonitorado pela atividade citotóxica do extrato hidroalcoólico de *Acmella oleracea***. 2015. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia Biomédica). Universidade do Vale do Paraíba (Univap), 2015.

RATNASOORIYA, W. *et al.* Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, n.2-3, p.317-320, 2004.

RAVINDRANATHAN, S. *et al.* Effect of Chitosan Properties on Immunoreactivity. **Marine Drugs**, 14(5), 91.2016.

RECOUVREUX, D. O. S. *et al.* Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 151-157. 2011.

REIS, E. C. C. *et al.* Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. **Polímeros**, 22(1): 73-79. 2012.

ROCKENBACH, I. I. *et al.* Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannate Ancelota*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.238-244, 2008.

ROGERO, S. O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-20, 2003.

SAWAKI, H. K. **Estudo de sintomas de deficiências de macro e micronutrientes em plantas de jambu (*Spilanthes oleracea* L.) variedade Branco ou Jambuarana**. 2000. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém, 2000.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, R. O. **Biomateriais produzidos a partir de quitina e quitosana e suas aplicações na área médica**. 2012. 51p. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Assis-SP. 2012.

SANTOS, W. J. **Extração de compostos antioxidantes da folha da mangueira (*Mangifera indica* L.) utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, água e etanol**. 2013.112p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SANTOS, J. T. T. **Avaliação do potencial mutagênico de uma membrana regeneradora de tecido através do testes de micronúcleo**. 2015. 21p. Trabalho de conclusão de curso (graduação)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

SETÚBAL, A. M. G. *et al.* Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal, **Rev Odonto Ciência- Fac.Odonto/PUCRS**, v.20, n.28, 2005.

SHERIDAN, R. L. *et al.* Long-term outcome of children surviving massive burns. **JAMA**, v. 283, p. 69–73, 2000.

SHARMA, B. R. Infection in patients with severe burns: causes and prevention thereof. **Infect. Dis. Clin. North Am**, v. 21, p. 745–759, 2007.

SILVA, C. A. P. *et al.* Mitochondrial Activity and Cell Damage after Application of *Acmella oleracea* Leaf Extract. **American Journal of Plant Sciences**, v.7, n.2498-2504, 2016.

SIMÕES C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Quinta ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS cap 23 pp 577-614. 2003.

SONODA, M. *et al.* Cytotoxic Activities from two *Scutellaria* plants in chinese medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 91, n. 65-68. 2004.

SOUZA NETO, A. A. *et al.* Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana / *Cissus Verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis. **Matéria (Rio J.)**, v.24, n. 3, e12393, 2019.

STAYTON, P. S. *et al.* “Smart” delivery systems for biomolecular therapeutics. **Orthod. Craniofacial Res.**, v.8, p.219-225, 2005.

SUDEVAN, S. *et al.* Estudos sobre a atividade antiinflamatória in vitro de compostos metabólicos de *Acmella oleracea*. **J. Chem. Pharmaceutical Sci.** V.8, pp. 227 – 232, .2015.

TIBBITT, M. W; ANSETH, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 655-663. 2009.

TIWARI, P. *et al.* Phytochemical Screening and Extraction : A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, 15 dez. 2011.

THOMPSON, T. S; SUKESH, K; SINGH, D. A study on the antimicrobial effect of *A. oleracea* against dental bacteria. **IJPSR**, Vol. 3, n.4, p. 1194 – 1197. 2012.

TURKMEN, N; SARI, F; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by Ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v.99, p.835–841. 2006.

VALE, E. C. S. Inicial management of burns: approach by dermatologists. **Na Bras Dermatol**, v. 80, n. 1, p. 9-19, 2005.

VIERA, V. B. **Compostos bioativos, atividade antioxidante e antimicrobiana na casca de cebola roxa (*Allium cepa* L.) submetidos a diferentes métodos de extração**. 2016.123p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

VILKHU, K. *et al.* Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 9, p. 161–169, 2008.

VILLACHICA, H. *et al.* **Frutales y hortalizas promissórios de la Amazônia**. Lima: Tratado de Cooperacion Amazônica. Secretaria-Pro-tempore, p. 367. 1996.

WASSERMANN, D. Evaluation et premiers soins d'une brûlure thermique. **Rev. Prat**, v. 52, p. 2228–2233, 2002.

WU, L. *et al.* Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulation LPS-induced inflammatory mediators, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2341-2349, 2008.

YAMANE, L. T. **Avaliação de formulações tópicas contendo extrato etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (jambu), associado a óleo essencial de *Achyrocline satureioides* LAM (macela)**. 2016. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2016.