



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**LIVIA APARECIDA PROCOPIO GOMES**

**AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA *in vitro* DA MATRIZ DE HIDROGEL  
ASSOCIADA AO EXTRATO GLICÓLICO DE *Punica granatum* L.  
(ROMÃ)**

2017

**LIVIA APARECIDA PROCOPIO GOMES**

**AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA *in vitro* DA MATRIZ DE HIDROGEL  
ASSOCIADA AO EXTRATO GLICÓLICO DO *Punica granatum* L.  
(ROMÃ)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Samira Esteves Afonso Camargo

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Gomes, Livia Aparecida Procopio

Avaliação da biocompatibilidade e atividade antimicrobiana in vitro da matriz de Hidrogel associada ao extrato glicólico do Punica granatum L. (romã) / Livia Aparecida Procopio Gomes. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.

43 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientadora: Samira Esteves Afonso Camargo.

1. Hidrogel. 2. Matriz. 3. Punica granatum L. 4. Citotoxicidade. 5. Genotoxicidade. I. Camargo, Samira Esteves Afonso, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup> Adj. Luciane Dias de Oliveira**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luana Marotta Reis de Vasconcelos**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. Jonatas Rafael de Oliveira**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de dezembro de 2017.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Rosângela e Sebastião (in memoriam), que em nenhum momento mediram esforços para realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei, sou extremamente feliz e tenho muito orgulho por chamá-los de pai e mãe.*

*Aos meus irmãos Luciana, Júnior e Patrícia, pelo carinho, pela ajuda, pela compreensão e por estarem sempre do meu lado me dando força e apoio em todos os momentos, obrigada pelo amor e amizade.*

*Ao meu marido Fabrício, pelo companheirismo, carinho, compreensão e por estar sempre ao meu lado me dando apoio e incentivo para me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Sou muito feliz ao seu lado.*

*A minha filhinha Isis, o melhor presente que Deus poderia me dar!*

## AGRADECIMENTOS

*Á Deus, meu refúgio e força, onde sempre encontrei respostas para os meus problemas.*

*Á minha orientadora, Profa. Samira Esteves Afonso Camargo, pelo carinho, atenção, paciência e disposição sem medida para ajudar, pelas valiosas sugestões para a elaboração e enriquecimento desse trabalho.*

*A todos os professores do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, pela colaboração e conhecimentos transmitidos, em especial a professora Luciane pelo apoio e por toda ajuda para que eu conseguísse concluir o mestrado. Por estarem sempre dispostos a atender, ensinar e ajudar os alunos sempre com muita dedicação, paciência e amizade.*

*Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, pelos bons momentos, conversas e aprendizados.*

*Enfim a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa história. Meu carinho e muito obrigado!*

*"De tudo ficam três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando  
A certeza de que é preciso continuar  
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de  
terminarmos.  
Devemos fazer da interrupção um novo caminho,  
Da queda uma dança  
Do medo uma escada  
Do sonho uma ponte  
Da procura um encontro."*

(Fernando Sabino)

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1 INTRODUÇÃO .....	10
2 PROPOSIÇÃO .....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Confeccões dos grupos experimentais .....	16
3.2 Preparo e plaqueamento do <i>HydroMatrix Peptide Cell Culture Matriz</i> ..	16
3.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	17
3.3.1 Determinação da CIM e CBM do extrato de romã.....	18
3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em biofilme de <i>E. faecalis</i> .....	20
3.4 Análises de Biocompatibilidade .....	21
3.4.1 Cultura celular de macrófagos (RAW 264.7) .....	22
3.4.2 Citotoxicidade - Ensaio de MTT .....	23
3.4.3 Genotoxicidade - Ensaio de Micronúcleo.....	25
4 RESULTADOS .....	26
4.1 CIM e CBM do extrato de romã.....	26
4.2 Atividade antimicrobiana em biofilme de <i>E. faecalis</i> .....	28
4.3 Ensaio de Citotoxicidade .....	29
4.4 Ensaio de Genotoxicidade.....	31
5 DISCUSSÃO .....	32
6 CONCLUSÃO .....	39
REFERÊNCIAS .....	40



Gomes LAP. Avaliação da biocompatibilidade e atividade antimicrobiana *in vitro* da matriz de Hidrogel associada ao extrato glicólico do *Punica granatum* L. (romã) [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

## RESUMO

A matriz de hidrogel é um biomaterial de nanofibra peptídica tridimensional que induz o crescimento, migração e proliferação celular, assim favorecendo a regeneração tecidual. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade e a atividade antimicrobiana da matriz de hidrogel associado ao extrato romã e ao antimicrobiano ciprofloxacino. Para isso, foram realizadas análises microbiológicas sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) em cultura planctônica, por meio d ensaio de microdiluição em caldo e em biofilme pelo teste de MTT. Para os ensaios da biocompatibilidade, foi utilizada cultura de macrófagos (RAW 264.7). A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT e a genotoxicidade foi realizado pelo teste de micronúcleo. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e Tukey, adotando o nível de significância 5%. Os resultados demonstraram que a matriz de hidrogel associado ao extrato de romã não apresentou atividade antimicrobiana para a cultura planctônica como para o biofilme de *E. faecalis*. Porém, não foi citotóxico e genotóxico para RAW 264.7. Por outro lado, o antimicrobiano ciprofloxacino apresentou atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, além de ter apresentado efeitos citotóxico e genotóxico para os macrófagos. Com isso, foi possível concluir que o extrato de romã associado ou não a matriz de hidrogel apresenta ausência de citotóxico, genotóxico e efeito antimicrobiano.

Palavras-chave: Hidrogel. Matriz. Células. *Punica granatum*. *Enterococcus faecalis*. Citotoxicidade. Genotoxicidade.

Gomes LAP. *Evaluation of biocompatibility and antimicrobial action in vitro of a hydrogel scaffolds Hydromatrix associated to glycolic extract of Punica granatum (pomegranate) [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.*

### **ABSTRACT**

*The hydrogel matrix is a three-dimensional peptide nanofiber biomaterial that induces cell growth, migration and proliferation, thus favoring tissue regeneration. The objective of this work was to evaluate the biocompatibility and antimicrobial activity of the hydrogel matrix associated with the pomegranate extract and the antimicrobial ciprofloxacin. For this, microbiological analyzes on *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) were carried out in planktonic culture, by means of the microdilution test in broth and in biofilm by the MTT test. For the biocompatibility assays, macrophage culture (RAW 264.7) was used. Cytotoxicity was assessed by the MTT assay and genotoxicity was performed by the micronucleus test. Statistical analysis was performed by the ANOVA and Tukey tests, adopting the significance level 5%. The results showed that the hydrogel matrix associated with the pomegranate extract did not show antimicrobial activity for the planktonic culture as for the *E. faecalis* biofilm. However, it was not cytotoxic and genotoxic for RAW 264.7. On the other hand, the antimicrobial ciprofloxacin showed antimicrobial activity on *E. faecalis*, besides having cytotoxic and genotoxic effects for the macrophages. With this, it was possible to conclude that the pomegranate extract associated or not with the hydrogel matrix shows absence of cytotoxic, genotoxic and antimicrobial effect.*

*Keywords: Hydrogel. Scaffold. Cells. Punica granatum. Enterococcus faecalis. Cytotoxicity. Genotoxicity.*

## 1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos emergiu recentemente como uma estratégia alternativa para reparo e regeneração de defeitos ósseos. Nesta estratégia, um andaime ou matriz biodegradável é frequentemente utilizado juntamente com células osteogênicas e / ou fatores indutores de osso. Uma matriz para regeneração óssea deve satisfazer requisitos básicos, tais como biocompatibilidade, estrutura de poros interligada para crescimento de tecido, e degradação controlada com produtos de degradação fisiologicamente compatíveis. Para satisfazer essas necessidades, vários polímeros biodegradáveis naturais vem sendo estudados e desenvolvidos (Igwe, Mikael, Nukavarapu, 2014).

Estudos recentes tem se esforçado para desenvolver biomateriais com capacidade de interagir com o ambiente biológico, para melhorar a resposta biológica e a interação do tecido/superfície, bem como pelo desenvolvimento de materiais bio-absorvíveis que sofram uma degradação progressiva, enquanto regeneram e tratam os tecidos. Os polímeros biodegradáveis de natureza sintética como poliglicólido (PGA), poliácido (PLA), polidioxanona (PDS), poli (3-caprolactona) (PCL), poli-hidroxi-butirato (PHB), polioctoéster, quitosano, poli (2-hidroxietil-metacrilato) (PHEMA), ácido hialurônico e outros hidrogéis foram estudados e usados extensivamente em muitas aplicações na engenharia tecidual, tais como substituição óssea, reparação de fraturas ósseas, cartilagens, meniscos e disco intervertebral. Em particular, os polímeros sintéticos biodegradáveis estão sendo bastante estudados uma vez que permitem um melhor controle das suas propriedades físico-químicas e também têm sido utilizados com sucesso em aplicações clínicas (Fukushima, 2012).

Na engenharia tecidual, as células e os fatores de crescimento são combinados com um suporte (ou matriz) biodegradável poroso para reparar e regenerar o tecido. Este suporte atua como uma matriz temporária enquanto as células segregam a matriz extracelular que é necessária para a regeneração do tecido. Os suportes podem ser utilizados para induzir a formação do tecido desejado após o crescimento de células a partir de áreas circundantes e como transportadores para células autógenas semeadas que são cultivadas em biorreatores e subsequentemente reimplantadas para o hospedeiro como um material que promove o funcionamento das células (Hayashi et al., 2016).

HydroMatrix<sup>TM</sup> é uma matriz de nanofibra peptídica tridimensional que promove o crescimento e migração celular. O HydroMatrix utiliza peptídeos específicos que formam uma matriz de hidrogel peptídica a partir de fluídos precursores em materiais altamente reticulados em resposta a aumentos da temperatura ou força iônica. A transformação rápida desta solução em gel de peptídeo gera uma matriz de nanofibras peptídicas para cultura de células na engenharia de tecidos (Technical Bulletin, Sigma Aldrich).

Na Odontologia, novos produtos são lançados constantemente no mercado. Tais produtos são utilizados em íntimo contato com tecidos biológicos como polpa, dentina, tecido periodontal e osso alveolar. Dessa forma, os biomateriais devem ser utilizados com cautela e sua indicação nas diversas situações clínicas deve ser sempre bem avaliada, levando em consideração critérios clínicos e éticos quanto aos riscos e benefícios do tratamento. Para isso, existe a necessidade de o cirurgião-dentista conhecer as características e propriedades dos biomateriais.

A alta prevalência de *Enterococcus faecalis* em periodontites apicais secundárias vem sendo amplamente relatado (Stuart et al., 2006; Chávez de Paz et al., 2010). O *E. faecalis* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, não esporulada e altamente resistente à ação de antimicrobianos. Isso pode ser

atribuído à sua habilidade de resistir por longos períodos sem nutrientes, sobreviver em mono espécies e invadir túbulos dentinários (Cheng et al., 2012). Esta bactéria tem capacidade de formar biofilme, que fica aderido em superfícies como a dentina. Além disso, produzem polissacarídeos extracelulares que agem como adesivo natural que imobiliza células, e que o torna altamente resistente, em função da variação fenotípica e genotípica proporcionada pelo biofilme (Garcez et al., 2006; Bergmans et al., 2008; George; Kishen, 2008; Chaves de Paz, 2010; Souza et al., 2010).

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças vem aumentando, sendo que no Brasil, tanto nos grandes centros comerciais quanto no interior, o comércio e a utilização de plantas medicinais são atividades muito difundidas, às quais são atribuídas diversas causas, sejam de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica (Peron et al., 2008). Segundo Veiga Jr. et al. (2005), a Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo qualquer vegetal que possui substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam utilizadas na produção de fármacos semi-sintéticos.

Os fitoterápicos são medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais, sendo utilizados com finalidade no tratamento de doenças. Entretanto, pesquisas com plantas medicinais devem ser realizadas, com o propósito da verificação de sua efetividade, bem como ausência de toxicidade (ANVISA, 2004).

Uma planta medicinal bastante estudada é a *Punica granatum* L. (romã), classificada como um arbusto originário do Irã, atualmente é cultivado pelo Mediterrâneo, China, Índia, África do Sul e América (Abdollahzadeh et al., 2011; Glazer et al., 2012; Janani, Estherlydia, 2013; Dastjerdi et al., 2014; Betanzos-Cabrera et al., 2015; Shaygannia et al., 2016), pertence a família Punicaceae e é composta por flores, cascas, frutos, raízes e sementes (Dastjerdi et al., 2014). O arbusto apresenta de 1,5 a 5 m de altura com ramos espinhosos

(Shaygannia et al., 2015). As folhas são brilhantes e possuem cerca de 7,6 cm de comprimento (Qnais et al., 2007; Janani, Estherlydia, 2013) e as flores podem ser vermelhas, laranjas ou rosas (Zarfeshany, 2014). A fruta madura possui de 5 a 20 cm de diâmetro, uma casca vermelho escuro, o formato de uma granada e o peso varia de menos de 200 g a mais de 800 g (Janani, Estherlydia, 2013; Shaygannia et al., 2016). A fruta contém muitas sementes que armazenam pequenas quantidades de suco vermelho e são separadas por uma região branca conhecida por pericarpo membranoso (Janani, Estherlydia, 2013).

*P. granatum* L. tem um amplo espectro de ação devido a seus fitoconstituintes tais como taninos, polifenóis, alcalóides, flavonóides, antocianinas, ácido ascórbico, ácidos graxos e ácido ursólico. O óleo da semente contém estrogênios que podem atuar no câncer de pele e pulmão, as frutas e brotos podem ser usados no tratamento de disenteria, parasitas intestinais e em casos de diarreia. Já o suco e as sementes podem ser utilizados no tratamento de hemorróidas e sangramentos de nariz e gengiva, bem como tônico para garganta (Shaygannia et al., 2016). Apresenta ainda propriedades anti-aterogênicas, anti-hipertensivas podendo ser utilizado na prevenção e tratamento de diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, osteoartrite e artrite reumatóide, atua na cicatrização de feridas e no sistema reprodutor (Zarfeshany, 2014), além de ter propriedades bactericida, antifúngica, antiviral, apresentar modulação imune, antioxidante, antiinflamatória, antiaterosclerótica, e combater infecções bacterianas inclusive com microrganismos multiresistentes (Abdollahzadeh et al., 2011; Choi et al., 2011; Aníbal, 2012; Fawole, 2012; Bakkiyaraj et al., 2013; de Oliveira et al., 2013; Qabaha, 2013; Dastjerdi et al., 2014; Zarfeshany 2014; Betanzos-Cabrera et al., 2015; Shaygannia et al. 2016).

Diante do exposto, o desenvolvimento e a investigação de novos materiais, associando propriedades de plantas medicinais, como a *P. granatum*, com biomateriais pode originar novos produtos com propriedades físicas,

químicas e biológicas adequadas para aplicações em engenharia tecidual sendo uma alternativa aos tratamentos convencionais. Assim, este estudo *in vitro* avaliou a matriz de hidrogel associada ao extrato romã verificando sua ação sobre a proliferação celular e sua atividade antimicrobiana, objetivando sua utilização na Odontologia.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a biocompatibilidade, proliferação celular e atividade antimicrobiana da associação da matriz de hidrogel com diferentes concentrações do extrato de romã.

Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) para a cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) na forma planctônica;
- b) Avaliar a ação antimicrobiana do biomaterial sobre cultura planctônica e biofilme de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083);
- c) Analisar sua citotoxicidade através do teste de MTT em macrófagos (RAW 264.7);
- d) Avaliar sua genotoxicidade pelo teste de micronúcleo em macrófagos (RAW 264.7);



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Confeccões dos grupos experimentais

Neste trabalho foram confeccionados quatro grupos experimentais, sendo o grupo “1” o de maior interesse composto pela matriz de hidrogel associado ao extrato de romã e pelos grupos controle:

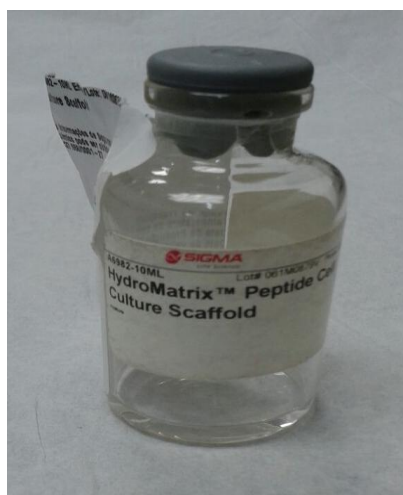
- a) Grupo 1: Matriz de hidrogel associada ao extrato do *Punica granatum* L.
- b) Grupo 2: Matriz de hidrogel associada ao antimicrobiano ciprofloxacino.
- c) Grupo 3: Matriz de hidrogel sem associação.
- d) Grupo 4: Extrato de *Punica granatum* isolado.

### 3.2 Preparo e plaqueamento do *HydroMatrix Peptide Cell Culture Matriz*

A matriz de hidrogel utilizada neste trabalho foi o *HydroMatrix Peptide Cell Culture Scaffold* - A6982, Sigma-Aldrich, Brasil (Figura 1). O laudo técnico fornece informações do produto que é constituído por peptídeos autopolimerizáveis instantâneos que formam um gel composto por uma matriz

rica em nanofibras tridimensionais com aplicações em pesquisas relacionadas a engenharia de tecidos. A matriz de hidrogel foi fornecida em um frasco na forma de pó liofilizado pronta para ser preparada com 10 mL de água estéril formando uma solução estoque na concentração de 1%.

Figura 1 – *HydroMatrix Peptide Cell Culture Scaffold A6982* (Sigma-Aldrich)



Fonte: Elaborada pela autora.

Para o plaqueamento, foi utilizada a concentração recomendada pelo fabricante para cultivo celular de 0,25%, realizando para isso a diluição da solução estoque (1%) e após este procedimento, foi adicionado 75  $\mu\text{L}$  dessa solução para a placa de 96 poços e 250  $\mu\text{L}$  para a placa de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) e em seguida as placas foram incubadas em estufa com 5%  $\text{CO}_2$  a 37° C por 1 hora para que ocorresse a formação do gel inicial da matriz de hidrogel no fundo dos poços. Após este período, seguiu-se com o plaqueamento celular para os testes microbiológicos e de biocompatibilidade.

### **3.3 Análises da Atividade Antimicrobiana**

Para a avaliação da ação antimicrobiana dos grupos 1, 2, 3 e 4, os ensaios foram realizados pela cepa padrão de *E. faecalis* (*American Type Culture Collection* – ATCC 4083), proveniente do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT – UNESP que foram mantidas em congelamento em freezer -70°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI – Himedia, Mumbai, Índia) com 20% de glicerol. Para ativação do microorganismo, a cepa de *E. faecalis* foi descongelada em temperatura ambiente e cultivada em meio de cultura ágar BHI (Brain Heart Infusion - Himedia, Mumbai, Índia) por 48 h a 37°C em estufa bacteriológica.

O extrato glicólico do *Punica granatum* L. (romã) 200 mg/L foi doado pela empresa Mapric (São Paulo, SP, Brasil). O laudo técnico fornecido pela empresa, certifica que a parte da planta utilizada para fabricar o extrato glicólico foi o fruto.

O antimicrobiano ciprofloxacino 200 mg (isento de excipientes) foi obtido pela farmácia de manipulação Nostra Fórmula (São José dos Campos, SP, Brasil). A diluição do ciprofloxacino foi realizada em água destilada estéril nas concentrações 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL para a realização dos ensaios.

### **3.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Para determinação da CIM dos grupos 1, 2, 3 e 4 e posterior constatação da CBM, foi utilizado o método de microdiluição de acordo com a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013) em placas de 96 poços. Para a

preparação do inóculo padronizado, o *E. faecalis* foi semeado por esgotamento em ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia). Após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C, foi realizada a coloração de Gram para avaliar o crescimento uniforme das colônias e isenção de contaminações. As colônias foram transferidas para um tubo contendo solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e a suspensão bacteriana foi padronizada em espectrofotômetro a  $10^6$  células por mL, com os parâmetros de comprimento de onda de 760 nm e densidade óptica de 0,298. Na placa de 96 poços, para o grupo 1 foi plaqueado a matriz de hidrogel 0,25% e após o período de geleificação iniciou-se as diluições do extrato de romã 200 mg/mL em meio Mueller Hinton (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL) e a adição da suspensão bacteriana padronizada. No grupo 2, foi plaqueado a matriz de hidrogel 0,25% e seguiu-se com as diluições do ciprofloxacino em meio Mueller Hinton nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL seguido da adição do micro-organismo. No grupo 3 foi plaqueado somente pela matriz de hidrogel com a suspensão microbiana. No grupo 4, foi realizado as diluições do extrato de romã 200 mg/mL em meio Mueller Hinton (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL) e a adição da suspensão bacteriana. No controle negativo foi plaqueado somente o meio de cultura Mueller Hinton. A placa foi levada para incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, após este período a leitura da placa foi realizada macroscopicamente, determinando a CIM no poço de menor concentração que não apresentou turvação.

Após a leitura das placas, foi realizada a determinação da CBM, para isto inoculou-se por arraste em placas contendo ágar BHI, 10 µL de cada poço da CIM. Após 48 horas de incubação em estufa bacteriológica à 37°C, foi feita a leitura das placas considerando a menor concentração que não foi observado crescimento de colônias para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

### 3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em biofilme de *E. faecalis*

Para a formação de biofilme *in vitro*, foi utilizado a cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), utilizando como corpo de prova o fundo da placa de 96 poços. Para o preparo do inóculo, o micro-organismo *E. faecalis* foi plaqueado em meio sólido BHI que foi incubada por 48 horas em estufa à 37°C. A colônia isolada do *E. faecalis* foi transferida para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI e incubado em agitação por 48 horas a 37°C e foi realizado a troca do meio em 24 horas. Após este período, verificou a turvação do meio, caracterizando o crescimento microbiológico, então o tubo foi centrifugado para a formação do *pellet* e o sobrenadante foi descartado. Para o processo de lavagem foi acrescido 3 mL de solução salina estéril que foi homogeneizado através do vórtex completo em agitador de tubos (Vision Scientific) e em seguida centrifugado, este processo foi realizado duas vezes. Para o preparo da suspensão padrão, o tubo contendo o *pellet* previamente lavado foi ressuspensionado em agitador com 5 mL de solução salina estéril. Esta solução foi padronizada em espectrofotômetro na concentração de  $10^7$  células por mL nos parâmetros de comprimento de onda de 760 nm e densidade óptica de 0,385.

Para os grupos composto pela matriz de hidrogel (1, 2 e 3), primeiramente foi realizado o plaqueamento da matriz, e para isto foi acrescido 75 µL da solução 0,25% em cada poço e após o período de geleificação da matriz seguiu-se com o protocolo de formação do biofilme, portanto foi inoculado 200 µL da suspensão padronizada de células de *E. faecalis* contendo  $10^7$  células por mL em solução salina estéril por poço e a placa foi incubada sob agitação por 1 hora e 30 minutos à 37°C para promover a adesão inicial dos micro-organismos. Após a fase inicial de adesão, a suspensão de células foi aspirada cuidadosamente e cada poço foi lavado com salina estéril para remover

as células frouxamente aderidas. Posteriormente foi acrescido 200  $\mu$ L do meio líquido BHI e a placa foi incubada sob agitação por 24 horas. Passado o período de formação do biofilme, este foi colocado em contato com os grupos de estudo, sendo que no grupo 1, foi adicionado as diluições extrato de romã 200 mg/mL em meio BHI (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL), no grupo 2 o antimicrobiano ciprofloxacino foi acrescido em meio BHI nas diluições 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL e 10  $\mu$ g/mL; no grupo 3 foi acrescido somente o meio de cultura BHI e no grupo 4 foi adicionado as diluições extrato de romã 200 mg/mL em meio BHI (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL). Foram realizados os controles da formação do biofilme sem tratamento, o controle do meio de cultura e o controle negativo com a solução salina estéril. O teste foi realizado em duplicata por um período de ação prolongada de 24 horas. Posteriormente, para a realização da leitura dos resultados por meio do ensaio de MTT, foi acrescentado 100  $\mu$ L da solução de MTT (Sigma-Aldrich, Brasil) a 0,5 mg/mL em cada poço e as placas foram levadas a estufa bacteriológica a 37°C por uma hora sob proteção da luz. Após o período, a solução de MTT foi removida e adicionado 100  $\mu$ L de Dimetil Sulfoxido (DMSO, Sigma Aldrich, Brasil) para solubilização do conteúdo dos poços. As placas retornaram à incubação por 10 minutos. Após este período, a placa foi levada à agitadora orbital (Solab SL180/A) por mais 10 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância dos poços em espectrofotômetro (Biotek, EL808IU) utilizando o comprimento de onda de 570 nm.

### **3.4 Análises de Biocompatibilidade**

Para a determinação da biocompatibilidade, foi avaliado o comportamento dos grupos (1, 2, 3 e 4) em contato com macrófagos de camundongo (RAW 264.7), através do ensaio de citotoxicidade com o teste colorimétrico MTT e a genotoxicidade pelo ensaio de micronúcleo.

### **3.4.1 Cultura celular de macrófagos (RAW 264.7)**

Foram utilizados a cultura de células de macrófagos originados de camundongos da linhagem RAW 264.7. Estas células foram obtidas do Laboratório de Cultura de Células do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (ICT – UNESP), as quais que foram previamente obtidas do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ). Para o cultivo celular, foi utilizado o meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e 1% de antibiótico penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), em garrafas de cultivo celular (TPP, Suíça) e incubadas em estufa à temperatura de 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Em todas as etapas do cultivo as células foram observadas em microscópio com luz invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany) para verificar o crescimento e adesão celular.

Foram realizados subcultivos celulares quando atingido a subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 85% do frasco. Para o subcultivo e plaqueamento, os frascos foram lavados com PBS e o sobrenadante descartado para remover células mortas ou frouxamente aderidas, então foi adicionado o meio de cultura e as células foram removidas com auxílio de um

varredor celular (TPP, Suíça), a suspensão de células foi transferida para um tubo tipo Falcon (TPP, Suíça) e centrifugada durante cinco minutos a 3.000 RPM a 27° C (Centrífuga Labnet, USA). Após a centrifugação, observou-se a formação do *pellet* celular e o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura fresco e transferidas para um novo frasco de cultivo celular no caso de subcultivo ou foi realizado a padronização da suspensão celular para o plaqueamento.

Para a contagem celular foi transferida uma alíquota de 50 µL da suspensão celular em um microtubo e adicionou-se 5 µL de corante azul de Trypan 0,5% (Sigma-Aldrich) agitando com a micropipeta, então foi transferido 10 µL da mistura para a câmara de Neubauer (Optik Labor) e a contagem de células viáveis foi realizada considerando as células não coradas pelo azul de Trypan, pois as células com coloração azul incorporaram o corante em seu citoplasma devido a rupturas em sua membrana, portando não são consideradas viáveis. Foi realizado uma diluição da suspensão celular considerando a proporção de células necessárias para o plaqueamento, sendo  $8 \times 10^3$  células em 200 µL de meio de cultura para a placa de 96 poços e  $2 \times 10^4$  células em 1 mL de meio de cultura para a placa de 24 poços. O restante das células foram ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) - Sigma Aldrich e transferidas para tubos criogênicos e colocadas a -70°C por 24 horas e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido.

### **3.4.2 Citotoxicidade – Ensaio de MTT**

Para o teste de citotoxicidade foi utilizado o método de oxidação metabólica do sal MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-



difeniltetrazólio). Este sal é degradado por enzimas redutases presentes somente em células viáveis que transformam a coloração amarelada do sal de MTT em uma substância de coloração arroxeada denominado formazan, que pode ser quantificado por espectrofotometria. Neste ensaio foi utilizada a placa de 96 poços, que antes do plaqueamento foi adicionado 75 µL da solução líquida da *matriz* de hidrogel a 0,25% em cada poço e levada a estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C por 1 hora para a formação do gel no fundo de cada poço. Para o plaqueamento, uma quantidade de 8×10<sup>3</sup> células foram colocadas em cada poço na placa de 96 poços e incubadas em estufa por 24 horas à 37° C com 5% CO<sub>2</sub> para a aderência celular no fundo do poço. Após este período, o meio foi trocado e as culturas celulares foram expostas aos grupos de estudo (1, 2 e 4) e aos controles negativo (sem células) e positivo (com células) e incubadas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37° C por 24 horas. Após o tratamento, a placa foi lavada três vezes com 200 µL de PBS estéril para descartar células mortas e resíduos. Após a lavagem, foram acrescentados 100 µL da solução de MTT (Sigma-Aldrich, Brasil) a 0,5 mg/mL em cada poço. A placa foi coberta por papel alumínio e levadas a estufa por uma hora, sob temperatura de 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período, a solução de MTT foi removida e adicionado 100 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, Brasil) para solubilização do conteúdo dos poços. As placas envolvidas em papel alumínio retornaram à incubação por 10 minutos. Após este período, a placa foi levada à agitadora orbital (Solab SL180/A) por mais 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância dos poços em espectrofotômetro (Biotek, EL808IU) empregando o comprimento de onda de 570 nm. A citotoxicidade foi expressa como a porcentagem em relação ao grupo controle (=100%), sendo considerado citotóxico quando a viabilidade celular for (<50%). Esse teste foi realizado em duplicata.

### 3.4.3 Genotoxicidade – Ensaio de Micronúcleo

O ensaio de micronúcleo consiste na visualização de um pequeno núcleo acoplado ao núcleo verdadeiro que surge a partir do deslocamento de fragmentos de cromossomo do núcleo principal, estes micronúcleos surgem por alterações genéticas espontâneas ou são induzidos por agentes genotóxicos. Antes do plaqueamento foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  da solução líquida da matriz de hidrogel a 0,25% e levada a estufa contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a 37° C por 1 hora para a formação do gel no fundo da placa. Em seguida, as células foram plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço e mantidas em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a 37° C por 24 horas. Após este período foi trocado o meio de cultura e as células foram expostas aos grupos 1, 2, 3 e 4 e foram mantidas em estufa por mais 24 horas. Após o tratamento, cada poço foi lavado com 1 mL PBS estéril e foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  da solução fixadora de formol 4% (Sigma-Aldrich) por 10 minutos, após a fixação, os poços foram lavados com 1 mL de PBS e foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de PBS e uma gota de *fluoroshield with DAPI* e levados a mesa de agitação orbital (Solab) por 5 minutos sob proteção da luz. Para a realização da leitura foi utilizado o microscópio de fluorescência (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Alemanha) e foi verificada a frequência de micronúcleos em cada 2.000 células contadas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato de romã

Os resultados para determinação da concentração inibitória mínima, conforme a tabela 1, demonstraram que todas as diluições testadas do grupo 1 e 4 (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12.5 mg/mL) associadas ou não a matriz de hidrogel apresentaram turvação, que podem ser decorrentes do crescimento microbiano ou da interação do extrato com o meio, portanto não foi possível determinar a CIM do extrato de romã associado ou não a matriz de hidrogel nas concentrações testadas sobre *E. faecalis* na sua forma planctônica. No grupo 2, não foi observada turvação em todas as diluições testadas do antimicrobiano ciprofloxacino (100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL), determinado a CIM de 10 µg/mL para o ciprofloxacino sobre *E. faecalis*. No grupo 3, ocorreu o crescimento microbiano, determinando que a matriz de hidrogel pura não apresenta ação antimicrobiana. No controle negativo composto somente pelo meio de cultura Mueller Hinton, não houve crescimento bacteriológico, excluindo a possibilidade da contaminação do meio por micro-organismos.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), conforme a tabela 2, todas as diluições do grupo 1 e 4 foram testadas para determinar se a causa da turvação foi decorrente do crescimento bacteriano ou da interação do meio com o extrato, portanto foi realizado o plaqueamento por arraste das quatro concentrações testadas (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL) e após 48 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C, o resultado da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato de romã

associado ou não a matriz hidrogel não foi possível ser determinado, pois ocorreu crescimento em todas as concentrações testadas para *E. faecalis*. No grupo 2, não houve crescimento bacteriano em nenhuma concentração testada da matriz de hidrogel associada com as diluições do ciprofloxacino (100 µg /mL, 50 µg /mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL) determinando a CBM de 10 µg/mL para o ciprofloxacino sobre *E. faecalis*. No grupo 3, matriz de hidrogel isolada, ocorreu o crescimento microbiano, não sendo possível determinar a CBM, comprovando a ausência de efeito bactericida da matriz de hidrogel sobre a cepa testada *E. faecalis*.

Portanto, a determinação da CIM e CBM é maior que a testada de 100 mg/mL neste estudo.

Tabela 1 - Resultados do CIM para os grupos experimentais e controle.

GRUPO	DESCRIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	RESULTADO
<b>Grupo 1</b>	Matriz de hidrogel + Romã	100 mg/mL	Ocorreu turvação em todas as concentrações. CIM não determinada.
		50 mg/mL	
		25 mg/mL	
		12,5 mg/mL	
<b>Grupo 2</b>	Matriz de hidrogel + Ciprofloxacino	100 µg/mL	Não ocorreu turvação em nenhuma concentração CIM = 10 µg/mL
		50 µg/mL	
		25 µg/mL	
		10 µg/mL	
<b>Grupo 3</b>	Matriz de hidrogel	0,25%	Ocorreu turvação
<b>Grupo 4</b>	Romã	100 mg/mL	Ocorreu turvação em todas as concentrações. CIM não determinada.
		50 mg/mL	
		25 mg/mL	
		12,5 mg/mL	

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Resultados da CBM para os grupos experimentais e controle.

GRUPO	DESCRIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	RESULTADO
<b>Grupo 1</b>	Matriz de hidrogel + Romã	100 mg/mL	Ocorreu crescimento em todas as concentrações. CBM não determinada.
		50 mg/mL	
		25 mg/mL	
		12,5 mg/mL	
<b>Grupo 2</b>	Matriz de hidrogel + Ciprofloxacino	100 µg/mL	Não houve crescimento em nenhuma das concentrações. CBM = 10 µg/mL
		50 µg/mL	
		25 µg/mL	
		10 µg/mL	
<b>Grupo 3</b>	Matriz de hidrogel	0,25%	Ocorreu turvação
<b>Grupo 4</b>	Romã	100 mg/mL	Ocorreu crescimento em todas as concentrações. CBM não determinada.
		50 mg/mL	
		25 mg/mL	
		12,5 mg/mL	

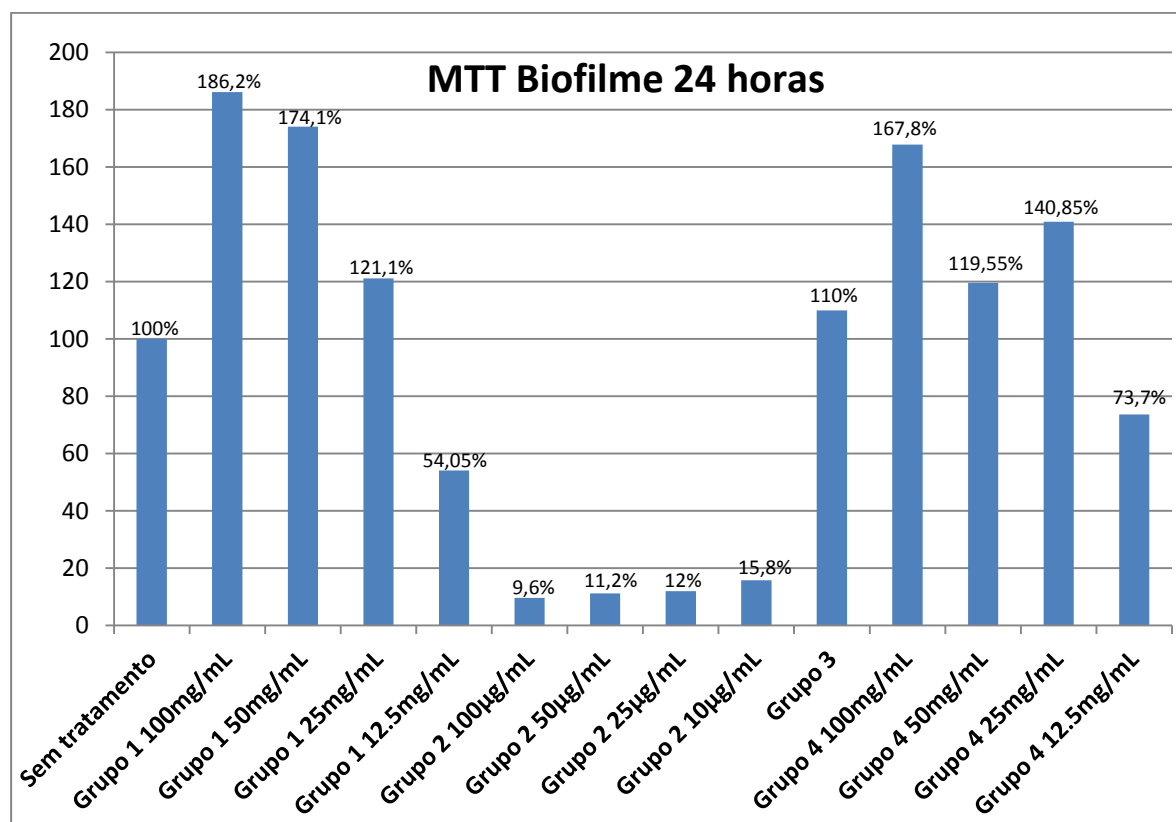
Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2 Atividade antimicrobiana em biofilme de *E. faecalis*

Os resultados demonstram que as diluições do extrato de romã associado ou não a matriz de hidrogel não tiveram atividade antimicrobiana sobre o biofilme de *E. faecalis* e ainda favoreceram o desenvolvimento do biofilme no tratamento realizado por 24 horas do biofilme de *E. faecalis*, como demonstram na Figura 2.

Pode-se observar que houve uma atividade antimicrobiana efetiva com o antibimicrobiano ciprofloxacino (Figura 2).

Figura 2- Gráfico do biofilme do *E. faecalis* tratado por 24 horas.



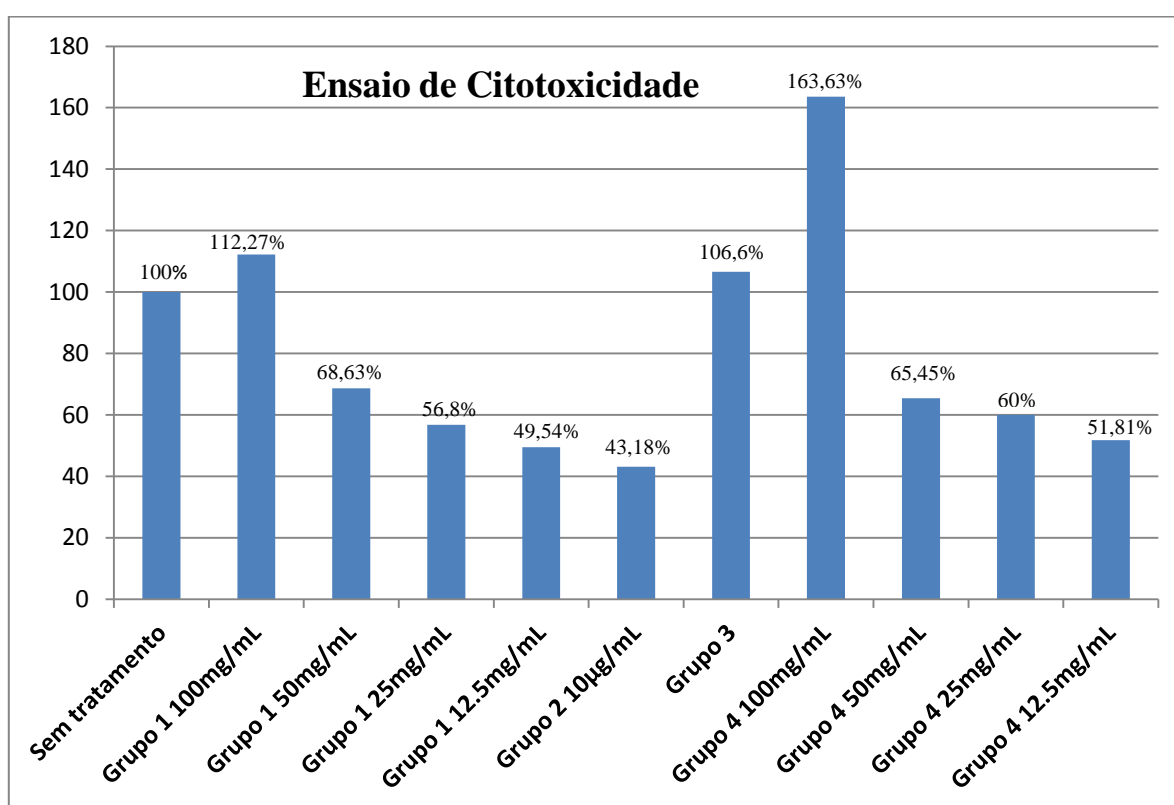
Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.3 Ensaio de Citotoxicidade

A análise dos dados obtidos pelo ensaio de MTT, demonstraram que a viabilidade celular do extrato de romã associado á matriz de hidrogel nas diluições 100, 50 e 25 mg/mL não foram citotóxicos as células, porém na concentração 12,5 mg/mL foi citotóxico, pois apresentou viabilidade celular abaixo de 50% em relação ao grupo controle (=100%). O extrato de romã sem a associação da matriz de hidrogel, em nenhuma das concentrações testadas (100, 50, 25 e 12,5 mg/mL) foi considerado citotóxico as células quando comparado

ao grupo controle. O antimicrobiano ciprofloxacino na concentração 10  $\mu\text{g/mL}$  apresentou baixa viabilidade celular (<50%) quando comparados ao grupo controle, sendo considerado citotóxico (Figura 3).

**Figura 3-** Gráfico do ensaio de Citotoxicidade realizado por ensaio de MTT sobre macrófagos RAW



Fonte: Elaborada pela autora.

O grupo 1 promoveu proliferação celular nas diluições 100, 50 e 25 mg/mL, sendo significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). O grupo 3 exibiu uma alta proliferação celular, sendo considerado significativo em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

No grupo 4 houve aumento da proliferação celular apenas na concentração 100 mg/mL.

#### 4.4 Ensaio de Genotoxicidade

Os resultados da contagem de micronúcleos no ensaio de genotoxicidade indicaram que o ciprofloxacino (10 µg/mL) foi genotóxico para as células, pois apresentou uma quantidade muito elevada de micronúcleos quando comparado ao grupo controle (tabela 3) ( $p < 0,05$ ). Os grupos 1, 3 e 4 foram comparados ao grupo controle e não apresentaram genotoxicidade, pois a formação de micronúcleos se assemelha ao grupo controle.

Tabela 3 - Média do número de micronúcleos encontrados em 2.000 células

<b>Grupos</b>		<b>Média de Micronúcleos</b>
Grupo 1	Matriz de hidrogel + romã	8
Grupo 2	Ciprofloxacino 10 µg/MI	71
Grupo 3	Matriz de hidrogel	9
Grupo 4	Romã 100 mg/mL	18
Controle positivo	EMS	65
Controle	Somente células	4

Fonte: Elaborado pela autora.



## 5 DISCUSSÃO

Na engenharia dos tecidos, os hidrogéis se tornaram uma classe promissora de materiais para a cultura de células. Em uma matriz de hidrogel, uma rede de poros interconectados permite a retenção nutrientes e um ambiente adequado para a proliferação e crescimento celular. Podem ser utilizados hidrogéis tanto de fontes sintéticas como naturais para a cultura de células. Os componentes bioativos dos hidrogéis podem ser definidos (por exemplo, materiais à base de péptidos tais como HydroMatrix™, PuraMatrix™ ou outros peptídicos) ou indefinidos (extratos de origem animal ou humana, como Matrigel™ ou MaxGel™) (Bhattacharya et al., 2012).

Matrizes sintéticas com vários biopolímeros foram desenvolvidas para aplicações biomédicas e farmacêuticas, tais como liberação de fármacos e engenharia de tecidos. Os hidrogéis de polímeros biodegradáveis injetáveis são ideais para engenharia de tecidos *in situ*, porque as células podem ser facilmente incorporadas no polímero e converter rapidamente em um gel sob condições fisiológicas, compreendendo redes poliméricas hidrofílicas tridimensionais. No entanto, estes biomateriais são muitas vezes compostos de microfibras que após gelificação se tornam muito maiores do que a matriz extracelular ativa. Hidrogéis têm sido utilizados como o material de escolha em muitas aplicações em medicina regenerativa e têm sido utilizados como fármacos e portadores de células no campo da engenharia de tecidos (Akiyama et al., 2013).

No presente estudo, foi analisada uma matriz de hidrogel associada a um fitoterápico (extrato de romã) e a um antimicrobiano de uso comercial, o ciprofloxacino. Dentre os hidrogéis, o escolhido foi o *HydroMatrix*™ (Sigma - Aldrich). Porém ainda, existem poucos trabalhos na literatura avaliando o seu comportamento na engenharia de tecidos.

A atividade antimicrobiana sobre o microrganismo *Enterococcus faecalis* foi analisada pelos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), para avaliar qual concentração do extrato de romã e ciprofloxacino teria capacidade de eliminar 100% *E. faecalis*, no intuito de determinar qual a CBM mais efetiva, e também se teria alguma diluição citotóxica.

Os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) para os grupos contendo extrato de romã associado ou não a matriz de hidrogel não foram possíveis de determinar devido ao crescimento microbiano em todas as concentrações testadas. Assim, a inibição do crescimento bacteriano proporcionada pelas diferentes concentrações foi avaliada pela concentração bactericida mínima (CBM), indicada pela presença ou ausência de crescimento bacteriano. No entanto, a CBM para *E. faecalis* também não foi possível de ser determinada, pois ocorreu crescimento microbiano em todas as concentrações. Para o antibiótico ciprofloxacino observou-se uma alta atividade antimicrobiana, sendo determinado a CIM e CMM de 10 µg/mL.

Oliveira *et al.* (2011), realizou um estudo para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *P. grantum* L. (romã) em cepas-padrão (ATCC) e em cepas clínicas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Para determinação da CIM realizou o teste de microdiluição em caldo e testou dez concentrações distintas 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39 e 0,19 mg/mL. E os resultados demonstraram que das dez concentrações testadas, seis foram efetivas para as cepas avaliadas (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 mg/mL). Contudo, conseguiu verificar com este estudo que o extrato de romã apresenta atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas e que as cepas de *S. epidermidis* e *S. mutans* apresentaram maior sensibilidade ao extrato de romã (6,25 mg/mL).

A análise da atividade antimicrobiana no biofilme de *E. faecalis* tratado

por 24 horas com o extrato de romã associado a matriz de hidrogel, nas concentrações 100, 50, 25 e 12,5 mg/ml verificou uma proliferação celular superior ao grupo controle (=100%), sendo de 186,2%, 174,1%, 121,1% e 54,05% respectivamente e o extrato de romã sem associação da matriz de hidrogel nas concentrações 100, 50, 25 e 12,5 mg/ml também ocorreu um aumento da proliferação celular quando comparado ao grupo controle de 167,8, 119,55, 140,85 e 73,5 respectivamente, constatando que o extrato de romã com ou sem a associação da matriz de hidrogel não apresenta atividade antimicrobiana e citotoxicidade contra *E. faecalis* e quando comparados com o antimicrobiano convencional ciprofloxacino associado a matriz de hidrogel no biofilme por 24 horas, todas as concentrações testadas (100, 50, 25 e 10 µg/mL) foram mais citotóxicas, pois quando comparados ao grupo controle (=100%) ocorreu diminuição da proliferação celular, sendo de 9,6%, 11,2%, 12% e 15,8%. Contudo, foi possível verificar que o biofilme de *E. faecalis* foi resistente a ação do extrato de romã associado ou não a matriz de hidrogel, pois causou um aumento significativo do biofilme, concluindo que o romã associado ou não a matriz não possui atividade antimicrobiana em todas as concentrações testadas neste trabalho. Em relação ao antimicrobiano ciprofloxacino, este foi mais efetivo, pois conseguiu diminuir significativamente a formação do biofilme de *E. faecalis* quando comparada a atividade antimicrobiana da associação da matriz de hidrogel com o extrato de romã.

O teste de biocompatibilidade deste trabalho verificou que a matriz de hidrogel associado ao extrato de romã não apresenta citotoxicidade, podendo ser considerada biocompatível de acordo com o presente estudo, já o antimicrobiano ciprofloxacino foi considerado citotóxico.

A viabilidade celular é um parâmetro importante para determinar a biocompatibilidade e danos nas células indutoras da regeneração dos tecidos. Neste estudo, foi utilizado para avaliar a citotoxicidade, o ensaio de MTT, que

mensurou a proliferação e viabilidade celular do extrato de romã e do antimicrobiano ciprofloxacino com associação e sem associação a matriz de hidrogel *HydroMatrix*. O teste de MTT é baseado na avaliação quantitativa de células vivas após a exposição ao tratamento pela incubação com o corante MTT [(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) (Mosmann, 1983). O MTT é um sal, que é reduzido por proteínas mitocondriais ativas presentes em células viáveis, produzindo um pó marcador da viabilidade celular incorporada às células, é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

Para a avaliação da citotoxicidade celular em macrófagos (RAW 264.7), os dados obtidos através do tratamento das células com o extrato de romã nas diluições 100, 50, 25 e 12,5 mg/mL associados a matriz de hidrogel por 24 horas, verificou-se proliferação celular de 112,27%, 68,63%, 56,8% e 49,54% (respectivamente) e o extrato de romã sem a associação da matriz de hidrogel foi de 163,63%, 65,45%, 60% e 51,81%, sendo que comparados ao controle não foram considerados citotóxicos nas concentrações 100, 50, 25 e 12,5 mg/mL, exceto concentração 12,5 mg/mL da matriz de hidrogel associada ao romã onde verificou-se diminuição da proliferação celular para 49,54% sendo considerada nesta concentração citotóxica quando comparada ao grupo controle (=100%). A associação da matriz de hidrogel ao antimicrobiano ciprofloxacino na concentração 105µg/mL, ocorreu diminuição da proliferação celular (43,18%) quando comparada ao controle, constatando maior efeito antimicrobiano e citotóxico. Essa avaliação foi realizada de acordo com o protocolo da ISO 10993-12 (*International Organization for Standardization*), que determina dose tóxica para 50% das células quando comparadas ao grupo controle. A comparação dos grupos indicou que ocorreu maior índice de viabilidade celular do extrato de romã associado a matriz de hidrogel do que em relação ao ciprofloxacino.

Em um estudo realizado por Akiyama et al (2013), com uma matriz de hidrogel denominada PuraMatrix (hidrogel de péptido sintético) que apresenta propriedades semelhantes ao HydroMatrix, avaliou a PuraMatrix como matriz para a engenharia de tecidos *in situ* da mucosa da orelha média, onde testou um modelo de rato de orelha média cirurgicamente danificada transplantada com células epiteliais de ouvido médio cultivadas encapsuladas dentro de PuraMatrix. As células doadoras foram células epiteliais de orelha média de ratos e confirmou que as células transplantadas tinham características de células epiteliais normais, tanto morfológicamente como funcionalmente. Após o transplante de células dentro de PuraMatrix, estas células foram encontradas na superfície da lesão subepitelial no ouvido médio receptor, mantiveram sua morfologia e função normais e formaram novas camadas epiteliais e subepiteliais, separadas por uma membrana basal. Em contraste, as células doadoras transplantadas sem PuraMatrix não foram estabelecidas no nosso modelo, estes resultados sugeriram que as matrizes de hidrogel podem ser indispensáveis para o transplante de células e que a PuraMatrix forma matrizes de nanofibras eficazes na engenharia de tecidos *in situ* do tecido da mucosa da orelha média neste modelo animal. Este estudo também relatou que o ambiente biológico proporcionado por essa matriz era adequado para a interação célula-célula e que as características estruturais tais como a formação de nanofibras numa escala semelhante a matriz extracelular e que está possui capacidade para reter água (teor de água até 99,5% p / v ).

No presente estudo, a análise da genotoxicidade foi realizada através do teste de micronúcleo, em que as células são quantificadas *in vitro*, podendo se analisar os danos cromossômicos através do aparecimento de micronúcleos entre as células da cultura.

A matriz de hidrogel associada ao extrato de romã e o extrato de romã sem associação da matriz de hidrogel quando testados com a cultura de

macrófagos (RAW 264.7), não foram capazes de aumentar o número de micronúcleos, o número de micronúcleos destes dois grupos foram semelhantes ao grupo controle, indicando que a matriz de hidrogel associada ao extrato de romã, assim como o extrato de romã puro não são genotóxicos. Já o antimicrobiano ciprofloxacino, foi considerado genotóxico para as células.

De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições realizadas desta pesquisa, foi possível evidenciar que a efetividade da matriz de hidrogel com associação do extrato de romã, apresenta melhor atividade celular (em cultura de macrófagos) quando comparada ao grupo da matriz de hidrogel associado ao antimicrobiano convencional ciprofloxacino. Essa comparação entre esses dois grupos revela que o desempenho foi melhor da associação da matriz de hidrogel com o extrato de romã do que com o ciprofloxacino, que foi tóxico para as células, indicando que a associação com o extrato de romã foi positiva, bioestimuladora sobre a proliferação celular independente da concentração testada neste estudo, pois aumentaram a resposta celular *in vitro*. Já os resultados da atividade antimicrobiana sobre o microrganismo *E. faecalis*, não foi constatada atividade antimicrobiana, quando a matriz estava associada ao extrato de romã, pois ocorreu uma proliferação exacerbada de microrganismo, a associação da matriz ao ciprofloxacino, diminuiu a proliferação celular, portanto teve melhor atividade antimicrobiana. Contudo, foi possível averiguar que a matriz apresentou resultados mais expressivos nos experimentos em células do que em microrganismos.

Embora o uso da matriz de hidrogel tenha ainda poucos estudos revelando suas vantagens e desvantagens em relação a sua utilização, principalmente em associação com os extratos naturais, que é considerado uma nova alternativa ao uso dos antimicrobianos comerciais, devido ao aumento de cepas bacterianas resistentes, a associação dessa matriz é interessante por serem materiais biodegradáveis e de grande potencial ainda a ser descoberto e

estudado.

Dentre as vantagens do uso do *HydroMatrix* destacam-se o fácil manuseio, a interação mediada por células, a biodegradabilidade e biocompatibilidade. A incorporação da matriz de hidrogel ao extrato neste estudo revelou a melhora da bioatividade celular, com baixa citotoxicidade e induziram melhor resposta celular *in vitro* quando comparada ao antimicrobiano ciprofloxacino.

Desta forma, apesar de serem necessárias novas pesquisas, este estudo abre novas possibilidades para novas pesquisas da matriz de hidrogel, assim como, novos testes da incorporação da matriz com novas concentrações do extrato de romã e com outros extratos naturais, visando analisar a atividade antimicrobiana, proliferação celular, citotoxicidade e genotoxicidade e assim, uma aplicação futura em engenharia dos tecidos e na Odontologia.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que nas condições deste estudo, a associação da matriz hidrogel ao extrato de romã foi biocompatível para macrófagos, uma vez que não apresentou citotoxicidade e genotoxicidade. No entanto, esta associação não apresentou atividade antimicrobiana para *E. faecalis*.



## REFERÊNCIAS\*

Abdollahzadeh S, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. J Dent (Tehran). 2011;8(1):1-6.

Akiyama N, Fukuda TY, Takahashi H, Koji T. In situ tissue engineering with synthetic self-assembling peptide nanofiber scaffolds, PuraMatrix, for mucosal regeneration in the rat middle-ear. Int J Nanomed. 2013;8:2629-40.

Anibal PC, Peixoto IT, Foglio MA, Hofling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. Braz J Microbiol. 2013;44(3):839-48.

Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. Biofouling. 2013;29(8):929-37.

Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. Int Endod J. 2008;41(3):227-39.

Betanzos-Cabrera G, Montes-Rubio PY, Fabela-Illescas HE, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Antibacterial activity of fresh pomegranate juice against clinical strains of *Staphylococcus epidermidis*. Food Nutr Res. 2015;59:27620.

Bhattacharya M, Malinen MM, Lauren P, Lou YH, Kuisma SW, Kanninen L, Lille , Corlu A, Guillouzo CG, Ikkala O, Laukkanen A, Urtti A, Yliperttula M. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. J Control Release. 2012;164(3):291-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC n.48 - Registro de Medicamentos Fitoterápicos. 16 de março de 2004.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. J Endod. 2010;36(1):70-7.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, Bai Q, Tian Y, Yu Q. Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med.* 2012;44(10):824-31.

Choi JG, Kang OH, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Brice OO, et al. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peel Ethanol Extract against *Salmonella*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:690518.

Dastjerdi EV, Abdolazimi Z, Ghazanfarian M, Amdjadi P, Kamalinejad M, Mahboubi A. Effect of *Punica granatum* L. Flower water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Iran J Public Health.* 2014;43(12):1688-94.

de Oliveira JR, de Castro VC, das Gracas Figueiredo Vilela P, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:208.

de Oliveira JR, de Castro VC, das Gracas Figueiredo Vilela P, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, et al. Atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Punica granatum* L. (romã) sobre *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e *Candida* spp. XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Universidade do Vale do Paraíba, 2011.

Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:200.

Fukushima K, Wu Meng-Hsiu, Bocchini S, Rasyda A, Yang MC. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. *Materials Science and Engineering.* 2012;136(6):1331-51.

Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(4):93-8.

George S, Kishen A. Augmenting the antibiofilm efficacy of advanced noninvasive light activated disinfection with emulsified oxidizer and oxygen carrier. *J Endod.* 2008;34(9):1119-23.

Glazer I, Masaphy S, Marciano P, Bar-Ilan I, Holland D, Kerem Z, et al. Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts. *J Agric Food Chem*. 2012;60(19):4841-8.

Hayashi K, Shino HO, Shiga T, Onodera S, Saito A, Shibahara T, Azuma T. Transplantation of human-induced pluripotent stem cells carried by self-assembling peptide nanofiber hydrogel improves bone regeneration in rat calvarial bone defects. *BDJOpen* [Internet] 2016.[acesso em 2016 Dez 02]; Disponível em: [www.nature.com/articles/bdjopen20157.pdf](http://www.nature.com/articles/bdjopen20157.pdf)

Igwe JC, Mikael PE, Nukavarapu SP. Design, fabrication and in vitro evaluation of a novel polymer-hydrogel hybrid scaffold for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014;8(2):131-42.

Janani J, Estherlydia D. Antimicrobial activities of *Punica granatum* extracts against oral microorganisms. *International Journal of PharmTech Research*. 2013;5(3):973–977.

Peron AP, Marcos MC, Cardoso SC, Vicentini VEP. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Caellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia* Vahl em sistema teste vegetal. *Arq Ciênc Saúde Unipar, Umuarama*. 2008;12(1):51-4.

Qabaha KI. Antimicrobial and free radical scavenging activities of five Palestinian medicinal plants. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2013;10(4):101-8.

Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M, A review study on *Punica granatum* L. *J Evid-Based Complementary Altern Med*. 2016; 21(3):221–7.

Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010; 36(2):292-6.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32(2):93-8.

Veiga Jr VF, Pinto AC, Maciel MAM. Medicinal plants; safe cure? *Quím Nov*.

2005;28(3):519-28.

Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. *Advanced biomedical research*. 2014; 25(3):100.

