

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM**  
**MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

**Benedito Domingos Neto**

**CURATIVO BIOATIVO: CELULOSE BACTERIANA CONTENDO**  
**EXTRATO ETANÓLICO DE *Baccharis dracunculifolia***

Araraquara, SP

2024

**Benedito Domingos Neto**

**CURATIVO BIOATIVO: CELULOSE BACTERIANA CONTENDO  
EXTRATO ETANÓLICO DE *Baccharis dracunculifolia***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa lemma

Araraquara, SP

2024

## FICHA CATALOGRÁFICA

D715c Domingos Neto, Benedito

Curativo bioativo: celulose bacteriana contendo extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*/Benedito Domingos Neto. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2024.

58f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Mônica |Rosas da Costa Lemma

1. *Baccharis dracunculifolia*. 2. Celulose bacteriana. 3. Biomaterial. 4. Engenharia de tecidos. I. Título.

CDU 577.4

## BENEDITO DOMINGOS NETO

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 27 de fevereiro de 2024.


### BANCA EXAMINADORA

*Mônica R. da Costa Iemma*

Profª Drª MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA (Orientadora)  
Universidade de Araraquara - UNIARA

*Flávia Aparecida Resende Nogueira*

Profª Drª FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA  
Universidade de Araraquara - UNIARA

 Documento assinado digitalmente  
RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI  
Data: 27/02/2024 16:11:55-0300  
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Profª Drª RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI  
Universidade Nove de Julho – UNINOVE

## RESUMO

A *Baccharis dracunculifolia* (BD), além de ser a fonte botânica para a produção da própolis verde brasileira, apresenta diversas atividades biológicas, como atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. No Brasil, esta planta é comumente utilizada na medicina popular para o tratamento de úlceras estomacais. A biocompatibilidade, bem como a estrutura nano e microfibrilar 3D, da celulose bacteriana tem despertado grande interesse para aplicações biomédicas, incluindo o uso como biomaterial para curativos de feridas. A combinação de extratos vegetais com matrizes de diferentes origens pode possibilitar a obtenção de biomateriais com atividades biológicas com grande potencial para o reparo tecidual. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de um possível biocurativo contendo extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* para aplicações no reparo tecidual. Inicialmente, foram analisadas as atividades biológicas do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (EEBD). Para isso, o ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT, utilizando fibroblastos de origem animal (L929), o ensaio mutagenicidade pelo teste de Ames, utilizando as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella Typhimurium*, o ensaio antibacteriano de biofilme, utilizando as cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente e *Escherichia coli*, e o ensaio de cicatrização de feridas, utilizando as células L929I, foram aplicados. Posteriormente, membranas de celulose bacteriana contendo ou não o EEBD, foram submetidas ao FTIR-ATR e à espectrofotometria UV-Vis para análise da impregnação do EEBD à celulose bacteriana, e ao ensaio de MTT para avaliação de citotoxicidade, utilizando fibroblastos dérmicos humanos de adultos (HDFa). O EEBD apresentou boa viabilidade celular, não sendo citotóxico, além de ter uma ótima ação antimicrobiana e permitir a migração celular para cicatrização. A impregnação foi eficaz e as membranas de celulose bacteriana contendo o EEBD não demonstraram citotoxicidade. O estudo apresentou resultados que podem ser benéficas para o desenvolvimento de um curativo para o reparo de feridas.

Palavras-chaves: cicatrização, *Baccharis dracunculifolia*, celulose bacteriana, biomaterial, engenharia de tecidos

## ABSTRACT

*Baccharis dracunculifolia* (BD), in addition to being the botanical source for the production of Brazilian green propolis, has several biological activities, such as antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities. In Brazil, this plant is commonly used in folk medicine to treat stomach ulcers. The biocompatibility, as well as the 3D nano- and microfibrillar structure, of bacterial cellulose has aroused great interest for biomedical applications, including use as a biomaterial for wound dressings. The combination of plant extracts with matrices of different origins can make it possible to obtain biomaterials with biological activities with great potential for tissue repair. In this sense, this work aimed to develop and characterize a possible biocurative containing ethanolic extract of *Baccharis dracunculifolia* for applications in tissue repair. Initially, the biological activities of the ethanolic extract of *Baccharis dracunculifolia* (EEBD) were analyzed. For this, the cytotoxicity assay by the MTT method, using fibroblasts of animal origin (L929), the mutagenicity assay by the Ames test, using the TA98, TA100, TA102 and TA97a strains of *Salmonella Typhimurium*, the biofilm antibacterial assay, using the strains *Staphylococcus aureus*, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and the wound healing assay, using L929I cells, were applied. Subsequently, bacterial cellulose membranes containing or not EEBD were subjected to FTIR-ATR and UV-Vis spectrophotometry to analyze the impregnation of EEBD to bacterial cellulose, and to the MTT assay to evaluate cytotoxicity, using adult human dermal fibroblasts. (HDFa). EEBD showed good cell viability, being non-cytotoxic, in addition to having excellent antimicrobial action and allowing cell migration for healing. The impregnation was effective and the bacterial cellulose membranes containing the EEBD did not demonstrate cytotoxicity. The study presented results that could be beneficial for the development of a dressing for wound repair.

Keywords: wound healing, *Baccharis dracunculifolia*, bacterial cellulose, biomaterial, tissue engineering

## LISTA DE ABREVIações

BC - Celulose bacteriana

BD - *Baccharis dracunculifolia*

CGAs - Ácidos clorogênicos;

DP - Desvio padrão;

EEBD - Extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*

EEBD12 - Extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* de 12 µg/mL

EEBD12m - Extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* de 12 mg/mL

EGF - Fator de crescimento epidérmico;

FBS - Soro fetal bovino;

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

FGF-2 - Fator de crescimento de fibroblastos 2

FTIR-ATR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada;

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

IM - Índice mutagênico;

L929 - Fibroblastos de camundongo;

M - Número médio de revertentes/placa;

MEC - Matriz extracelular

MMPs - Metaloproteinases da matriz;

MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium];

MRSA - *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente;

NIH/3T3 - Fibroblastos embrionários de camundongos;

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

TGA/DTG - Análise Termogravimétrica e Termogravimetria Derivada;

TGF-  $\alpha$  - Fator de transformação alfa;

TGF-  $\beta$  - Fator de transformação beta

VEGF - Fator de crescimento de células endoteliais

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1.	Cicatrização de feridas.....	12
2.1.1.	Fase Inflamatória.....	13
2.1.2.	Fase proliferativa.....	13
2.1.3.	Remodelagem.....	15
2.1.4.	Tipos de cicatrização de feridas.....	16
2.2.	Ferida aguda e crônica.....	16
2.2.1.	Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas.....	17
2.2.2.	Tratamento.....	18
2.3.	Engenharia de tecidos e biomateriais.....	19
2.4.	Celulose bacteriana.....	21
2.5.	<i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	22
3.	OBJETIVOS.....	23
3.1.	Geral.....	23
3.2.	Específicos.....	23
4.	METODOLOGIA.....	24
4.1.	Preparo do extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	24
4.2.	Análise termogravimétrica.....	24
4.3.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	25
4.4.	Cultura celular.....	25
4.5.	Ensaio de citotoxicidade.....	25
4.6.	Teste de Ames.....	26
4.7.	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	27
4.7.1.	Cepas bacterianas.....	28
4.7.2.	Formação do biofilme.....	28



4.7.3.	Tratamentos aplicados nos biofilmes.....	28
4.7.4.	Determinação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) .....	29
4.7.5.	Análise estatística .....	30
4.8.	Ensaio de cicatrização de feridas.....	30
4.9.	Preparo da celulose bacteriana e tratamento com o extrato de <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	31
4.10.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	31
4.11.	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).....	31
5.	RESULTADOS .....	32
5.1.	Análise termogravimétrica .....	32
5.2.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	33
5.3.	Ensaio de citotoxicidade do extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e do etanol.....	33
5.4.	Teste de Ames .....	37
5.5.	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	38
5.6.	Ensaio de cicatrização de feridas.....	40
5.7.	FTIR-ATR .....	42
5.8.	UV-Vis .....	43
5.9.	Ensaio de citotoxicidade de membranas de celulose bacteriana contendo ou não extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	44
6.	DISCUSSÃO .....	46
7.	CONCLUSÕES .....	49
8.	REFERÊNCIAS .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

Uma ferida se caracteriza por um dano causado ao tecido por diferentes fatores, que se cura como resultado de uma sequência altamente organizada de processos fisiológicos (Stojko; Wolny; Włodarczyk, 2021). O reparo de feridas envolve um conjunto de eventos celulares e bioquímicos orquestrados, que apresenta eventos integrados de migração e proliferação celular, e de deposição e remodelação da matriz extracelular (Holl *et al.*, 2021; Wu; Marston; Armstrong, 2010). Qualquer falha ou interferência no curso normal desses eventos pode prejudicar ou retardar o fechamento da lesão, resultando em uma ferida crônica (Wu; Marston; Armstrong, 2010).

Alguns autores indicam que toda ferida com mais de seis semanas é considerada lesão crônica (Oliveira *et al.*, 2019a; Ribeiro *et al.*, 2019a), outros consideram um tempo superior a três meses (Goldberg; Diegelmann, 2020). Geralmente, estão associadas a doenças pré-existentes, como diabetes e insuficiência venosa. De acordo com sua localização, etiologia e profundidade, as feridas crônicas podem ser classificadas como: úlceras vasculares (venosa e arterial), úlceras diabéticas e úlceras de pressão (Firlar *et al.*, 2022). As feridas crônicas atingem a população brasileira de forma geral, sendo a razão pelo alto índice de casos de alteração da integridade cutânea (Albuquerque; Alves, 2011). Tais lesões crônicas geram constrangimentos para o paciente, interferem em suas relações sociais e afetam a qualidade de vida (Ribeiro *et al.*, 2019b). No entanto, com o advento da engenharia de tecidos, o paradigma do tratamento de feridas está mudando e novos produtos com fatores e substâncias que podem ajudar no processo de cicatrização estão sendo desenvolvidos (Murphy; Evans, 2012).

O âmago da engenharia de tecidos é mimetizar um ambiente adequado para proliferação de células, como a matriz extracelular que é responsável não só pelo suporte estrutural mas também pelo transporte de sinais bioquímicos (Lynch; Kondiah; Choonara, 2021). Os biomateriais desempenham um papel fundamental para criação desse ambiente (Tabata, 2009). Durante a regeneração tecidual, um biomaterial sozinho ou com fatores de crescimento pode ser implantado na região de reparo para fornecer um microambiente favorável para desencadear uma cascata de eventos que promova diferenciação e proliferação celular (Abdulghani; Mitchell, 2019). O desenvolvimento de biomateriais que possam otimizar o processo de reparo tecidual pode ser muito importante na vida do paciente, uma vez que o longo tempo de cicatrização pode trazer prejuízos, como a

proliferação de bactérias (Lupaşcu *et al.*, 2022). Entre os diversos tipos de biomateriais disponíveis atualmente, destaca-se a celulose bacteriana (BC).

A celulose bacteriana é um polissacarídeo natural que apresenta excelentes propriedades físico-químicas e biológicas e pode ter múltiplas aplicações (Popa *et al.*, 2022). Sua estrutura nano e microfibrilar 3D tem despertado um especial interesse para as aplicações biomédicas, como o seu uso para curativo de feridas (Barud *et al.*, 2013b, 2011; De Oliveira Barud *et al.*, 2016). Existem muitos estudos que relatam os benefícios de biomateriais a base de BC, como o estudo de Amorim *et al.* (2009), que avaliou a resposta tecidual à presença da celulose bacteriana no dorso nasal de coelhos e concluiu que a BC mostrou boa biocompatibilidade, além de se manter estável no decorrer de todo o estudo. Um estudo com camundongos de Fu *et al.* (2013) demonstrou que houve melhora na cicatrização dos animais tratados com celulose bacteriana, bem como melhorou a adesão e proliferação de fibroblastos embrionários de camundongos (NIH/3T3). Silveira *et al.* (2016) investigaram, em um estudo clínico randomizado, o efeito da aplicação direta de enxerto de celulose bacteriana na cicatrização da membrana timpânica e relataram que houve boa regeneração da perfuração da membrana timpânica. O estudo de Cavalcanti *et al.* (2017), envolvendo 25 pacientes, avaliou a eficácia de curativos com membranas de celulose bacteriana no tratamento de úlceras venosas de membros inferiores e observaram que a BC tem propriedades ideais como curativo por manter a umidade no leito da ferida, absorver exsudatos e proteger contra traumas mecânicos. Em parte do estudo de Orlando *et al.* (2020) foi observado que a celulose bacteriana pode fornecer um alto nível de umidade para as feridas e grande biocompatibilidade. A BC pode ser considerado como uma matriz de grande potencial para o reparo tecidual, que funciona auxiliando para um ambiente ideal de cicatrização, no entanto, a implementação de substâncias bioativas pode ter suas atividades biológicas melhoradas e promover um microambiente ainda mais favorável para o reparo tecidual. A combinação de extratos vegetais com matrizes de diferentes origens pode possibilitar a obtenção de biomateriais com funções biológicas que elevem o potencial de reparo tecidual (Iurckevicz *et al.*, 2019a), como os extratos de plantas comumente utilizadas na medicina popular.

A planta *Baccharis dracunculifolia* (BD) popularmente conhecida por alecrim-do-campo ou vassourinha, é um arbusto nativo muito encontrado nas regiões sul do Brasil (De Sousa *et al.*, 2020; Soares *et al.*, 2013; Tomazzoli *et al.*, 2021). A *Baccharis dracunculifolia* é conhecida na medicina popular brasileira por possuir diversas

propriedades biológicas e medicinais, que incluem atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, imunomoduladora e antioxidante (Hocayen *et al.*, 2012; Iurckevicz *et al.*, 2019a; Moise; Bobiș, 2020; Soares *et al.*, 2013; Tomazzoli *et al.*, 2021). No Brasil, a planta serve como fonte botânica para produção da própolis verde brasileira, também muito utilizada na medicina popular, principalmente para o tratamento de inflamações, distúrbios hepáticos e úlceras estomacais (Moise; Bobiș, 2020). Os extratos de BD também apresentam atividades biológicas importantes, como ação antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (Hocayen *et al.*, 2012).

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de um possível biocurativo de celulose bacteriana contendo extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (EEBD) para aplicações no reparo tecidual.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Cicatrização de feridas**

A pele é nossa primeira barreira de proteção contra agentes do ambiente externo (Oliveira; Dias, 2012). A exposição ao ambiente externo pode resultar em lesões e, portanto, é de se esperar que nossa pele possua processos sofisticados de reparo (Wilkinson; Hardman, 2020). Em animais vertebrados, após o rompimento tissular, rapidamente se inicia o processo de reparo (Mendonça; Coutinho-Netto, 2009) que pode ser pela regeneração, com reposição das células e atividade funcional do tecido, ou pela cicatrização, com substituição do tecido rompido por tecido conjuntivo (Balbino; Pereira; Curi, 2005; Robbins *et al.*, 2000).

Se a lesão do tecido é grave ou crônica, o reparo não pode acontecer apenas por regeneração, ocorre por uma combinação entre regeneração de algumas células e cicatrização ou apenas pela substituição das células não regeneráveis por tecido conjuntivo (Kumar *et al.*, 2018). A cicatrização de feridas é um evento dinâmico e coordenado de uma série de interações celulares, moleculares e bioquímicas para que aconteça a reconstituição do tecido (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007). Existem diferentes classificações para facilitar o entendimento de um processo tão dinâmico e com fases que se sobrepõem de forma contínua no tempo (Mandelbaum; Di Santis; Mandelbaum, 2003). Assim, didaticamente, o processo de cicatrização é transcorrido em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (Mendonça; Coutinho-Netto, 2009).

### **2.1.1. Fase Inflamatória**

O principal objetivo desta fase é conter o dano, eliminar detritos celulares, corpos estranhos e patógenos, um passo primordial para que ocorra o reparo (Franco *et al.*, 2015; Han; Ceilley, 2017). Imediatamente após a lesão, os vasos sanguíneos danificados se contraem e um coágulo sanguíneo se forma, estabelecendo uma barreira impermeabilizante que protege contra contaminações (Tazima; Vicente; Moriya, 2008). Com a lesão tecidual, há liberação subsequente de mediadores químicos pró-inflamatórias que atraem os leucócitos circulantes para o local (Wilkinson; Hardman, 2020).

As plaquetas ativadas liberam mediadores químicos, como o fator de transformação beta (TGF-  $\beta$ ), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e os tromboxanos que orienta a migração de neutrófilos para o leito da lesão (Balbino; Pereira; Curi, 2005). Os neutrófilos atuam principalmente fagocitando partículas antigênicas e corpos estranhos (Tazima; Vicente; Moriya, 2008), enquanto são gradativamente substituídos por macrófagos (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007). Nessa fase, os macrófagos ativados são as células mais importantes, pois, além de trabalharem fagocitando bactérias e removendo fragmentos celulares (Mandelbaum; Di Santis; Mandelbaum, 2003), essas células também sintetizam diversos fatores de crescimento, tais como PDGF, TGF-  $\beta$ , fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento de células endoteliais (VEGF) (Mendonça; Coutinho-Netto, 2009). Estes fatores de crescimento são fundamentais para ativação de fibroblastos e células endoteliais, direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação (Oliveira; Dias, 2012).

### **2.1.2. Fase proliferativa**

Esta é a fase mais característica da cicatrização em que ocorre a formação do tecido granuloso, responsável por preencher a lesão (Franco *et al.*, 2015). O tecido granuloso é constituído por macrófagos, mas principalmente por fibroblastos, produtos de fibroblastos, incluindo o colágeno fibrilar, elastina e fibronectina e novos vasos sanguíneos sustentados por uma matriz frouxa (Paganela *et al.*, 2009; Balbino; Pereira; Curi, 2005). A fase proliferativa é dividida em três subfases: angiogênese, fibroplasia e reepitelização (Paganela *et al.*, 2009).

#### **2.1.2.1. Angiogênese**

A angiogênese é o evento no qual as células endoteliais proliferam e se organizam para formar novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Franco *et al.*, 2015). A neovascularização é essencial para a cicatrização de feridas, do início ao final; contribui para a hemostasia, reduz a perda sanguínea e estabelece uma matriz provisória da ferida (Sorg *et al.*, 2017). Nessa fase verifica-se a formação de uma rede capilar essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes necessários para cicatrização (Han; Ceilley, 2017). Muitos fatores de crescimento apresentam função angiogênica, no entanto o VEGF, TGF- $\beta$  e as angiopoetinas são os mais relevantes na manutenção de novos vasos sanguíneos (Kumar *et al.*, 2018; Mendonça; Coutinho-Netto, 2009)

A partir do intenso processo de angiogênese, diversos novos vasos sanguíneos são formados e conferem uma aparência granular para o tecido formado, que recebe o nome de tecido granuloso (Oliveira; Dias, 2012).

#### **2.1.2.2. Fibroplasia**

A fibroplasia ocorre a partir dos fibroblastos que proliferam e sintetizam colágeno e outros produtos da matriz extracelular (MEC) (França, 2015). Após o trauma causado pela lesão, os fibroblastos são direcionados para o local da inflamação, onde são induzidos a sintetizarem componentes da MEC, sobretudo colágeno (Tazima; Vicente; Moriya, 2008). O recrutamento e a ativação dos fibroblastos são induzidos pela ação de alguns fatores de crescimento, como PDGF, FGF e o TGF- $\beta$ , potencializando a síntese de colágeno por essas células (Kumar *et al.*, 2018). As células endoteliais e os macrófagos, em particular, são importantes sintetizadores desses fatores de crescimento (Wilkinson; Hardman, 2020).

À medida que o reparo da ferida avança, os fibroblastos passam por mudanças fenotípicas acentuadas e secretam grandes quantidades de colágeno, que passa a ser o principal componente da cicatrização (Balbino; Pereira; Curi, 2005). O tecido de granulação é composto principalmente por colágeno tipo III (Wilkinson; Hardman, 2020).

#### **2.1.2.3. Matrix Extracelular**

A matriz extracelular está presente nos espaços entre as células, sendo uma porção significativa do volume dos tecidos (Franco *et al.*, 2015). Três grupos de macromoléculas são citados constantemente como constituintes da MEC: (1) proteínas estruturais fibrosas, como colágeno e elastina, (2) glicoproteínas adesivas, como fibronectina e laminina, e (3) proteoglicanas e ácido hialurônico. (Kumar *et al.*, 2018).

Muito além de ser apenas uma matriz que preenche os espaços entre as células, a MEC apresenta diversas funções que incluem controle de crescimento celular, suporte para migração celular, manutenção da diferenciação celular e arcabouço para renovação tecidual (Kumar *et al.*, 2018; Tazima; Vicente; Moriya, 2008). Os fibroblastos são as células mais importantes para deposição das proteínas constituintes da MEC, principalmente colágeno (Tazima; Vicente; Moriya, 2008).

#### **2.1.2.4. Reepitelização**

A reepitelização se faz precocemente com as células epiteliais fazendo mitose (Franco *et al.*, 2015) e migrando para o fechamento da superfície da lesão (Oliveira; Dias, 2012). Esta fase é caracterizada pela migração das células epiteliais das margens da ferida e dos apêndices epidérmicos (França, 2015). Quando a membrana basal permanece íntegra, os queratinócitos dos anexos epiteliais migram em direção superior para recobrir a ferida (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007; Mandelbaum; Di Santis; Mandelbaum, 2003). Se a membrana basal estiver danificada, os queratinócitos migram das bordas da ferida, promovendo neopitelização e, conseqüentemente, redução da superfície da lesão (Tazima; Vicente; Moriya, 2008). A proliferação dos queratinócitos é estimulada pelo fator de transformação alfa (TGF-  $\alpha$ ) e pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) (Balbino; Pereira; Curi, 2005; Kumar *et al.*, 2018).

#### **2.1.3. Remodelagem**

Esta é a última das fases que envolve modificações no colágeno e na MEC; permanece por muitos meses e é responsável pela resistência da ferida e diminuição da cicatriz (Mandelbaum; Di Santis; Mandelbaum, 2003). A transição do tecido de granulação para uma cicatriz circunda mudanças na composição da MEC (Kumar *et al.*, 2018).

À medida que o processo de cicatrização progride, os fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local por meio de apoptose ou outros mecanismos (Mendonça; Coutinho-Netto, 2009). Apesar do número de células diminuído, a síntese de colágeno tipo I aumenta (Oliveira; Dias, 2012). Isto se deve a presença de alguns fatores de crescimento que estimulam a produção de colágeno, mas também a ativação das metaloproteinases da matriz (MMPs), que são enzimas capazes de degradar componentes da MEC (Robbins *et al.*, 2000). O efeito final do processo de reparo é, em parte, o resultado do equilíbrio entre síntese e a degradação da MEC (Kumar *et al.*, 2018). O

desequilíbrio desta relação de síntese e degradação de colágeno pode causar cicatrizes hipertróficas e queloides (Tazima; Vicente; Moriya, 2008), assim como a persistência de células no local (Mendonça; Coutinho-Netto, 2009).

No decorrer deste processo, o colágeno tipo III é substituído por colágeno tipo I, que se dispõem em grandes feixes paralelos (Wilkinson; Hardman, 2020), que tornam-se mais espessos e estão diretamente ligados a resistência da ferida (Oliveira; Dias, 2012). Este processo perpetua por muitos meses ou anos, e possui aproximadamente 70% da resistência de uma pele normal (Balbino; Pereira; Curi, 2005).

#### **2.1.4. Tipos de cicatrização de feridas**

Existem três formas pelas quais as feridas podem cicatrizar: (1) Primeira intenção: este tipo de cicatrização ocorre quando as margens da ferida estão próximas e há menor perda de tecido; quanto mais próximas, mais rápido é o reparo. Tem ausência de infecção e é indicado após incisões cirúrgicas por meio de suturas; (2) Segunda intenção: ocorre quando há uma perda extensa de tecido e aproximação das bordas não é possível. O reparo da perda tecidual apresenta formação abundante de tecido de granulação e depende da contração da ferida para reduzir o tamanho, (3) Terceira intenção: refere-se a feridas que são deixadas temporariamente abertas e são fechadas depois da regularização de uma situação específica, como uma infecção (Sorg *et al.*, 2017; Tazima; Vicente; Moriya, 2008).

#### **2.2. Ferida aguda e crônica**

Uma ferida é um dano à continuidade anatômica de um tecido causado por diversos fatores, mas que se cura como resultado de uma cascata altamente organizada de processos fisiológicos (Stojko; Wolny; Włodarczyk, 2021).

O reparo de feridas envolve um conjunto de eventos celulares e bioquímicos muito bem orquestrados, que apresenta mecanismos altamente integrados de migração e proliferação celular, bem como de deposição e remodelação da matriz extracelular (Holl *et al.*, 2021; Wu; Marston; Armstrong, 2010). Qualquer falha ou interferência no curso normal desses processos pode prejudicar ou retardar o fechamento da lesão, resultando em uma ferida crônica (Wu *et al.*, 2010).

Diversos fatores extrínsecos e intrínsecos ao paciente podem interferir no processo de cicatrização (Oliveira; Castro; Granjeiro, 2013; Ribeiro *et al.*, 2019b). Os fatores extrínsecos estão associados às condições da ferida e ao tratamento, enquanto que os



fatores intrínsecos estão relacionados à condição clínica do paciente, como diabetes, doenças cardiovasculares e imunossupressoras (Oliveira; Castro; Granjeiro, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2019b).

Uma ferida simples evolui facilmente para seu fechamento, cumprindo os três principais estágios da cicatrização: inflamação, proliferação e remodelagem tecidual (Smaniotto *et al.*, 2012). Quando a ferida ultrapassa um tempo de seis semanas para cicatrizar, esta ferida é considerada como uma ferida crônica (Oliveira *et al.*, 2019a; RIBEIRO *et al.*, 2019a). De acordo com sua localização, etiologia e profundidade, as feridas crônicas podem ser classificadas como: úlceras vasculares (venosa e arterial), úlceras diabéticas e úlceras de decúbito (também conhecidas por úlceras de pressão e escaras) (Firlar *et al.*, 2022).

Apesar das diferentes causas de uma ferida crônica, todas não progredem para além da fase de inflamação, com níveis excessivos de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas (Bowers; Franco, 2020; Rogers; Bevilacqua; Armstrong, 2008). Todo o estresse causado pela inflamação crônica contribui para inibição e proliferação dos fibroblastos, resultando num fenótipo de senescência dessas células, que não respondem a estímulos reparadores (Rogers; Bevilacqua; Armstrong, 2008). Esta indução de células senescentes, decorrente dos altos níveis de inflamação e estresse oxidativo, contribui para a patologia da ferida (Wilkinson; Hardman, 2020). Frequentemente, a inflamação aumentada das feridas crônicas pode ocorrer pela presença de infecção e formação de biofilmes resistentes as drogas (Bowers; Franco, 2020; Goldberg; Diegelmann, 2020), mantendo a ferida em um ciclo contínuo de infecção e inflamação (Wilkinson; Hardman, 2020).

### **2.2.1. Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas**

As feridas crônicas atingem a população brasileira de forma geral, sendo a razão pelo alto índice de casos de alteração da integridade cutânea (Albuquerque; Alves, 2011). O aumento dos anos de vida da população brasileira somados aos seus hábitos inadequados, repercute em altos índices de doenças crônicas, como diabetes mellitus e doenças cardiovasculares, que, por sua vez, aumentam a incidência de lesões crônicas (Brito *et al.*, 2013). Em 2017, estimava-se que 3% da população brasileira e cerca de 0,5% a 2% da população mundial apresentava algum tipo de ferida crônica, sendo as pessoas que vivem com diabetes mellitus as pessoas com maiores tendências de desenvolver lesões crônicas (Leal *et al.*, 2017). Além disso, segundo a SBACV (Sociedade Brasileira

de Angiologia e de Cirurgia Vascular), no período de 2012 a 2021, aproximadamente 245 mil brasileiros tiveram a amputação de membros inferiores, sendo a metade das amputações em pacientes com diabetes.

As feridas crônicas acometem 5% da população ocidental adulta e são consideradas um problema de saúde pública (Oliveira *et al.*, 2019b). Essas lesões contribuem para o aumento do número de aposentadorias precoces e, conseqüentemente, para a perda de mão-de-obra ativa (Brito *et al.*, 2013). Além de, quanto maior o número de pessoas que vivem com feridas crônicas, maior são os gastos públicos (Albuquerque; Alves, 2011).

Ter uma ferida crônica provoca diversas mudanças na vida do paciente, tais como isolamento social, sessões diárias de curativos, incapacidade para o autocuidado, prejuízos na mobilidade, incapacidade de realizar atividades físicas, inaptidão para o trabalho e dor (Bedin *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2019b; Ribeiro *et al.*, 2019b). As pessoas que vivem com feridas crônicas também podem sofrer com alterações na imagem corporal, como, por exemplo, a amputação, que tem grande impacto no cotidiano do pessoa (Leal *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2019b). Tais lesões não curadas geram constrangimentos para o paciente, interferem nas suas relações sociais e afetando, assim, a qualidade de vida (Ribeiro *et al.*, 2019b). Além disso, as pessoas que vivem com feridas crônicas estão inclinadas a desenvolverem transtornos psicológicos, como a depressão (Leal *et al.*, 2017).

### **2.2.2. Tratamento**

Nos casos de feridas crônicas, os curativos têm fundamental importância na contribuição da melhora da lesão. Antecedente ao curativo, por muitas vezes ocorre o desbridamento, lavagem com soro fisiológico ou solução antimicrobiana, depois um curativo sob medida (Wilkinson; Hardman, 2020). O curativo consiste em um meio terapêutico de proteção, limpeza, absorção e drenagem, que pode ser, em algumas situações, o próprio tratamento definitivo (Smaniotto *et al.*, 2012).

Os curativos ideais devem promover a cicatrização e trazer o mínimo de desconforto ao paciente; devem ter propriedades de barreira, biodegradabilidade, flexibilidade, estabilidade, viscosidade e serem de fácil remoção, para acelerar a cicatrização e reduzir as chances de infecção (Zheng *et al.*, 2020). Os curativos para feridas crônicas são utilizados para cobrir a ferida e proporcionar um ambiente ideal para a cicatrização. Deseja-se que para um desempenho clínico satisfatório, os curativos

devam apresentar as seguintes características: (1) manter a umidade no ambiente da ferida enquanto absorve ou elimina o excesso de fluídos e exsudatos, (2) permitir a transmissão de gases, (3) proteger contra infecção microbiana, (4) fornecer uma barreira física contra traumas externos, (5) ter fácil remoção ou ser biodegradável, (6) manter células viáveis e diminuir a necrose superficial, (7) aliviar a dor da ferida e (8) ser rentável (Firlar *et al.*, 2022).

Encontram-se no mercado mundial diferentes curativos que podem ser utilizados nas etapas de tratamento da ferida (Smaniotto *et al.*, 2012). Com o advento da engenharia de tecidos, o paradigma do tratamento de feridas está mudando, produzindo novos produtos com fatores e substâncias que podem ajudar a aumentar ou modular o processo de cicatrização (Murphy; Evans, 2012).

### **2.3. Engenharia de tecidos e biomateriais**

Muitas doenças, lesões e traumas podem gerar danos e degeneração de tecidos, necessitando de recursos terapêuticos e tratamentos que visem o reparo, substituição ou regeneração do local acometido (O'brien, 2011). O tratamento mais comumente utilizado se concentra no transplante dos órgãos e tecidos danificados ou comprometidos (Santos Júnior; Wada, 2007). Embora o transplante seja revolucionário e salve vidas, apresenta desvantagens por torna-se necessário o uso de drogas imunossupressoras e antimicrobianos para evitar a rejeição e a possibilidade de infecções (O'brien, 2011; Santos Júnior; Wada, 2007). Alternativamente, a engenharia de tecidos é um campo de pesquisa que permite o reparo e reconstrução de tecidos danificados sem as desvantagens do transplante (Lynch; Kondiah; Choonara, 2021).

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que compreende as relações de estrutura-função de tecidos normais e patológicos para o desenvolvimento de sistemas que auxiliem no reparo tecidual (O'brien, 2011; Sachlos; Czernuszka, 2003). É necessário que esses sistemas interajam com os tecidos receptores (O'brien, 2011; Santos Júnior; Wada, 2007), sejam capazes de imitar o ambiente tecidual natural, promovam sinalização biológica e sirvam de suporte para a proliferação de novas células (Lynch; Kondiah; Choonara, 2021). Desta forma, a engenharia de tecidos é um campo de pesquisa sustentado por uma tríade composta por células, biomateriais e fatores de crescimento (Berthiaume; Maguire; Yarmush, 2011; O'brien, 2011).

A engenharia de tecidos nem sempre pode substituir a cirurgia reconstrutiva ou o transplante de órgão, mas pode trazer grandes benefícios terapêuticos para os pacientes

que não obtiveram sucesso em outras terapias (Tabata, 2009). Uma das partes fundamentais da engenharia de tecidos é o desenvolvimento de produtos que mimetizem um ambiente adequado para a adesão e proliferação de células, como a matriz extracelular, que é responsável não só pelo suporte estrutural mas também pelo transporte de sinais bioquímicos (Lynch; Kondiah; Choonara, 2021). Os biomateriais desempenham um papel fundamental para criação desse ambiente (Tabata, 2009). Durante a regeneração tecidual, um biomaterial sozinho ou com fatores de crescimento pode ser implantado na região de reparo para fornecer um microambiente favorável para desencadear uma cascata de eventos que promova a diferenciação e proliferação celular (Abdulghani; Mitchell, 2019).

Independentemente do tipo de tecido, muitos são os aspectos que devem se levar em consideração para a produção de um biomaterial adequado para o uso na engenharia de tecidos (O'Brien, 2011). Há diversos fatores importantes que devem ser identificados para a produção de um biomaterial para fins de engenharia de tecidos, destacando-se: (1) biocompatibilidade, (2) biodegradabilidade e (3) propriedades mecânicas adequadas para corresponder ao local de reparo (Berthiaume; Maguire; Yarmush, 2011; Courtenay *et al.*, 2017; Lynch; Kondiah; Choonara, 2021; O'Brien, 2011; Sachlos; Czernuszka, 2003).

Os tecidos e órgãos danificados geram altos custos para a saúde e, em muitos casos, o tratamento médico convencional não é suficiente. A engenharia de tecidos traz novas abordagens que estão provando ser uma alternativa viável para transplantes e próteses cirurgias (Courtenay *et al.*, 2017). Os biomateriais são um elemento fundamental para regeneração de tecidos e pode ser usado de diversas maneiras para tratar a pele danificada, por exemplo (Anton-Sales *et al.*, 2019). Existe uma extensa paleta de biomateriais disponíveis, sendo metais, cerâmicas, compósitos e polímeros as principais categorias (Anton-Sales *et al.*, 2019; Popa *et al.*, 2022). Os biomateriais poliméricos utilizados são geralmente classificados em polímeros sintéticos e naturais de acordo com sua origem (Rey *et al.*, 2020). Em particular, o uso de polímeros naturais aumentou recentemente devido às suas propriedades específicas (Orlando *et al.*, 2020).

Os polímeros naturais se destacam pela sua abundância na natureza e biodegradabilidade, além de apresentarem propriedades que mimetizam a MEC e permitem a proliferação celular (Abdulghani; Mitchell, 2019; Lynch; Kondiah; Choonara, 2021; Orlando *et al.*, 2020; Rey *et al.*, 2020). Os polímeros naturais são obtidos a partir de recursos vivos ou de origem biológica, incluindo plantas ou microrganismos, por exemplo a celulose bacteriana (Aslam Khan *et al.*, 2021). Devido à sua

biocompatibilidade e bioatividade, os polímeros naturais, como a celulose bacteriana, são frequentemente usados para o reparo de tecido epitelial (Anton-Sales *et al.*, 2019). A celulose bacteriana é um polissacarídeo natural que tem múltiplas aplicações por apresentar excelentes propriedades físico-químicas e biológicas (Popa *et al.*, 2022).

#### 2.4. Celulose bacteriana

A celulose é o polímero natural mais abundante no mundo, normalmente encontrado em plantas (Hur *et al.*, 2020). É a molécula mais essencial de uma planta, sendo o principal constituinte da parede celular (Naomi; Bt Hj Idrus; Fauzi, 2020). A principal fonte de celulose explorada vem da madeira, pois se trata de uma fonte confiável que pode atender a demanda industrial (Swingler *et al.*, 2021). Além da madeira, a celulose pode ser encontrada em uma variedade de plantas, como no algodão, linho e cânhamo (Moniri *et al.*, 2017; Portela *et al.*, 2019; Swingler *et al.*, 2021). Além dessas fontes, a celulose também é sintetizada por algas marinhas, fungos e algumas bactérias (Moniri *et al.*, 2017; Portela *et al.*, 2019).

O primeiro relatório sobre a produção de celulose por bactérias, especialmente por *Acetobacter xylinus*, foi descrito em 1986 por Adrian J. Brown (Anton-Sales *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021; Lupaşcu *et al.*, 2022). Estudos recentes mostram que a celulose pode ser produzida por diversas bactérias, incluindo *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Alcaligenes* (Anton-Sales *et al.*, 2019; Barud *et al.*, 2011; Brasil, 2018; Liu *et al.*, 2021; Lupaşcu *et al.*, 2022). Entre as diferentes bactérias mencionadas acima, a bactéria gram-negativa, estritamente aeróbica, *Komagataeibacter xylinus* (anteriormente conhecida por *Gluconacetobacter xylinus* ou *Acetobacter xylinus*) é fonte mais eficaz para produção de celulose bacteriana (Hur *et al.*, 2020; Portela *et al.*, 2019; Swingler *et al.*, 2021) devido ao seu alto rendimento em meio de cultura contendo fontes de carbono e nitrogênio (Barud *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2021; Orlando *et al.*, 2020). As bactérias usam a celulose bacteriana para se proteger da luz ultravioleta e de outros microrganismos, manter o ambiente úmido e prevenir a desidratação, além de permitir que as bactérias permaneçam em uma interface entre o meio e o ar, aumentando o suprimento de oxigênio (Anton-Sales *et al.*, 2019; Brasil, 2018).

A celulose bacteriana é formada por uma rede de nano e microfibrilas dispostas em bandas de celulose (Anton-Sales *et al.*, 2019; Barud *et al.*, 2011), formando uma estrutura tridimensional (3D) estabilizada por ligações de hidrogênio (Naomi; Bt Hj

Idrus; Fauzi, 2020; Zheng *et al.*, 2020). Apesar da celulose de origem vegetal e a BC apresentarem mesma estrutura química de cadeias lineares de  $\beta$ -1,4-glucana, existem muitas diferenças em suas propriedades físicas (Zheng *et al.*, 2020). Ao contrário do seu equivalente vegetal, a BC é caracterizada por apresentar alta pureza por não precisar de tratamentos químicos agressivos para remover subprodutos, como a hemicelulose e a lignina (De Oliveira Barud *et al.*, 2016; Jankau *et al.*, 2022; Orlando *et al.*, 2020; Portela *et al.*, 2019). Entretanto, a variação da cepa bacteriana, do meio de cultura, do valor de pH e da temperatura podem interferir na estrutura da rede da celulose bacteriana (Anton-Sales *et al.*, 2019).

As fitas de microfibrilas de celulose dispostas em estrutura 3D conferem a celulose bacteriana alta porosidade e área de superfície, resultando em melhor capacidade de retenção de água em relação a celulose vegetal (Orlando *et al.*, 2020; Popa *et al.*, 2022). Além de maior cristalinidade e excelentes propriedades mecânicas, como melhor resistência à tração e módulo de Young (Brasil, 2018; Lupaşcu *et al.*, 2022; Moniri *et al.*, 2017; Orlando *et al.*, 2020; Popa *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2020). Outras propriedades são atribuídas a celulose bacteriana, como a biocompatibilidade, a bioatividade, ser biodegradável e não ser tóxica (Anton-Sales *et al.*, 2019; Moniri *et al.*, 2017; Naomi; Bt Hj Idrus; Fauzi, 2020; Portela *et al.*, 2019). Desta forma, a celulose bacteriana tem se tornado atraente para diversas aplicações, com destaque para as aplicações biomédicas (Liu *et al.*, 2021; Popa *et al.*, 2022). Sua estrutura nano e microfibrilar 3D desperta grande interesse para o uso como um biomaterial para curativos de feridas (Barud *et al.*, 2013b, 2011; De Oliveira Barud *et al.*, 2016).

## **2.5. *Baccharis dracunculifolia***

O uso de plantas medicinais para tratamento de doenças é uma prática muito antiga difundida pelas populações mundiais e faz parte da evolução humana (Hocayen *et al.*, 2012; Iurckevicz *et al.*, 2019a). As plantas medicinais chamam a atenção da indústria farmacêutica para formulação de medicamentos (Dahmer, 2018). A utilização dessas plantas na medicina popular é responsável pelo uso de diversos medicamentos na medicina tradicional (Hocayen *et al.*, 2012). Mais de 50% de todos os medicamentos utilizadas na medicina atualmente são produzidos a partir de produtos naturais e seus derivados (Iurckevicz *et al.*, 2019a).

A planta *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida por alecrim-do-campo ou vassourinha, é um arbusto nativo muito encontrado nas regiões sul do Brasil

(De Sousa *et al.*, 2020; Soares *et al.*, 2013; Tomazzoli *et al.*, 2021). O gênero *Baccharis*, pertencente à família *Asteraceae*, está representado por mais de 500 espécies distribuídas pela América Latina, principalmente em países como o Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, se concentrando em regiões elevadas (Lima, 2018; Soares *et al.*, 2013; Verdi; Brighente; Pizzolatti, 2005). As espécies deste gênero são no geral arbustos que medem de 0,5 a 4,0 metros (Verdi; Brighente; Pizzolatti, 2005). Com ampla dispersão nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, as espécies de *Baccharis* apresentam elevado valor socioeconômico para essas regiões por grande parte destas espécies serem utilizadas na medicina popular (Sforcin, 2012). Suas folhas ou ramos são administradas e consumidas sobretudo na forma de chá, com indicações para combater diversos males, dentre eles: distúrbios gástricos, febre, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata e desintoxicação do corpo (De Sousa *et al.*, 2020; Hocayen *et al.*, 2012; Leite, 2009; Lima, 2018; Verdi; Brighente; Pizzolatti, 2005). Além de também serem utilizadas no tratamento de feridas e processos inflamatórios (Hocayen *et al.*, 2012).

A *Baccharis dracunculifolia* é amplamente conhecida na medicina popular brasileira por possuir diversas propriedades biológicas e medicinais, incluindo anti-inflamatória, antimicrobiana, imunomoduladora e antioxidante (Hocayen *et al.*, 2012; Iurckevicz *et al.*, 2019a; Moise; Bobiş, 2020; Soares *et al.*, 2013; Tomazzoli *et al.*, 2021). No Brasil, a planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte botânica para produção da própolis verde brasileira, muito utilizada na medicina caseira para o tratamento de inflamações, distúrbios hepáticos e úlceras estomacais (Moise; BOBİŞ, 2020).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Desenvolvimento e caracterização de um possível biocurativo de celulose bacteriana contendo extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* para aplicações no reparo tecidual.

#### **3.2. Específicos**

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (EEBD12) para quantificação dos seguintes marcadores químicos: ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cinâmico, bacarina e artepelin C;
- Análise termogravimétrica para avaliação da decomposição térmica da massa do EEBD12;
- Analisar a citotoxicidade do EEBD12 pelo método de MTT, utilizando as células L929 (fibroblasto de camundongo);
- Analisar a atividade mutagênica do EEBD12 pelo teste de Ames, utilizando as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella Typhimurium*;
- Analisar a atividade antimicrobiana do EEBD pelo ensaio de biofilme, utilizando as cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente e *Escherichia coli*;
- Avaliar a migração celular das células L929 frente ao EEBD12 pelo ensaio de cicatrização de feridas;
- Avaliar se houve impregnação do EEBD12 à membrana de celulose bacteriana pelas técnicas de FTIR-ATR e UV-Vis;
- Analisar a citotoxicidade das membranas de celulose contendo ou não o EEBD12 pelo método de MTT, utilizando fibroblastos dérmicos humanos de adultos (HDFa);

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Preparo do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*

Todo o processo de produção e obtenção do extrato vegetal da *Baccharis dracunculifolia* foi realizado pela empresa Ciclo Farma Indústria Química Eireli, seguindo protocolos internos. Em colaboração, a empresa disponibilizou uma amostra do extrato vegetal da planta (lote número 0062017) para o desenvolvimento das análises deste estudo.

Inicialmente, o extrato da *Baccharis dracunculifolia* cedido pela empresa foi submetido à um processo de concentração sob vácuo em rotaevaporador. Em seguida, o extrato bruto foi solubilizado em álcool etílico, obtendo-se uma solução mãe de extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* de 12 mg/mL (EEBD12m).

### 4.2. Análise termogravimétrica



As propriedades térmicas do EEED12 foram determinadas por Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG). As curvas TGA/DTG foram obtidas em um TA Instruments SDT Q600 nas seguintes condições: atmosfera de ar sintético com fluxo contínuo de 100 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C/min na faixa de temperatura de 30–600 °C usando uma massa de amostra de cerca de 5 mg. Panela de alumina foi usada como referência.

#### **4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

O extrato de BD, lote número 0062017, foi submetido à análise por HPLC para obtenção da concentração de alguns flavonoides presentes na amostra, como ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cinâmico, bacarina e artepelin C. Os dados foram obtidos pela empresa Ciclo Farma Indústria Química Eireli e cedidos para colaboração deste trabalho.

As análises foram realizadas em triplicata, a partir de uma mistura preparada em balão volumétrico de 10 mL contendo 1 mL do extrato de BD (lote 0062017), tendo seu volume completado com uma solução de água deionizada (Milli-Q Plus, Millipore) e metanol (grau HPLC Mallinckrodt) em partes iguais. Os parâmetros estabelecidos na análise, bem como a metodologia utilizada para a leitura das amostras.

#### **4.4. Cultura celular**

Neste trabalho, foram utilizadas as células L929 (fibroblastos de camundongo) e HDFa (fibroblastos dérmicos humanos de adultos), que foram cultivadas em Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (FBS) (10% v/v), antibióticos (penicilina 100 IU/mL; estreptomicina 100 lg/mL) e antifúngico (anfotericina B 1,25 mg/mL), depois mantidas em estufa a 37° C, com 5% de saturação de CO<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados somente quando as células apresentaram 90% de confluência.

#### **4.5. Ensaio de citotoxicidade**

O método escolhido para o ensaio de citotoxicidade foi o de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). Para avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*, as células L929 foram cultivadas em placas de 96 poços (1x10<sup>4</sup>/poço), em triplicata, na presença de diferentes concentrações

diluídas em meio DMEM suplementado (12, 6, 3, 1,5, 0,75, 0,37, 0,18, 0,09, 0,046, 0,023, 0, 012 mg/mL) por 24 h em estufa a 37° C, com 5% de saturação de CO<sub>2</sub>.

Para avaliação da citotoxicidade do etanol, solvente presente no EEED12, as células L929 foram cultivadas em placas de 96 poços (1x10<sup>4</sup>/poço), em triplicata, na presença de diferentes concentrações do solvente diluídas em meio DMEM suplementado (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,10 %) por 24 h em estufa a 37° C, com 5% de saturação de CO<sub>2</sub>.

Para avaliar a citotoxicidade do meio condicionado das membranas contento ou não o EEED12, as células HDFa foram cultivadas em placas de 96 poços (1x10<sup>4</sup>/poço), em triplicata, na presença de três diferentes concentrações do meio condicionado diluídas em meio DMEM suplementado (100, 50 e 25%) por 24 h em estufa a 37° C, com 5% de saturação de CO<sub>2</sub>.

Em todas as avaliações, após o tempo de 24 horas, foi adicionado 50 µL/poço da solução de MTT de 5 mg/mL e a placa incubada por 4 h a 37° C. Após a redução do MTT e a solubilização dos cristais de formazan por DMSO, a absorbância foi medida em 570 nm. Os resultados foram plotados e tratados no *software* GraphPad Prism 9.0 e representados como porcentagem de viabilidade celular.

#### **4.6. Teste de Ames**

O teste foi realizado em parceria com a Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende, coordenadora do laboratório de Mutagênese e Toxicidade da UNIARA. A atividade mutagênica foi avaliada de acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983).

Para o teste de Ames foram utilizadas as cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella* Typhimurium. Estas cepas carregam uma mutação que inativa a biossíntese de histidina e as tornam incapaz de sintetizar o próprio aminoácido. As colônias destas cepas não conseguem crescer em meios com ausência de aminoácido, ao menos que o meio apresente algum agente que reestabeleça a capacidade das cepas de produzir novamente o aminoácido, ou seja, que induza uma mutação reversa. As colônias com mutações reversas são chamadas de revertentes. As mutações reversas acontecem comumente na presença de agentes mutagênicos. Portanto a presença de revertentes indica a presença de agentes mutagênicos (Guido *et al.*, 2001).

Definido por meio de testes preliminares usando a linhagem TA100, o volume máximo de extrato etanólico usado foi de 10 µL/placa, o que corresponde a 120 µg/ placa

de extrato, devido ao limite de toxicidade. Volumes maiores de extrato induziram uma redução acentuada no número de colônias revertentes, inviabilizando a análise mutagênica. Dessa maneira, as concentrações avaliadas variaram de 15 a 120 µg/placa. O controle negativo corresponde a taxa de reversão espontânea das linhagens de *S. Typhimurium*.

A amostra é considerada mutagênica quando há uma relação dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ou quando o IM for maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (Mortelmans; Zeiger, 2000).

As diferentes concentrações do extrato (15, 30, 60, 90 e 120 µg/placa) foram misturadas a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2M, pH 7,4 e 0,1 mL de cultura de bactérias, e incubadas por 30 minutos a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “*top agar*” (ágar de superfície), suplementado com traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados nos tubos. O conteúdo de cada tubo foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “*top ágar*”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Ao término desse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa foram 4- nitro-*o*-fenilenodiamina (10 µg / placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg / placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg / placa) para TA102. Além disso, o etanol (10 µL/ placa) também foi testado separadamente, a fim de verificar sua influência nas linhagens bacterianas.

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA*), adotando o modelo de (BERNSTEIN et al., 1982). Os dados (revertentes/ placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) foi calculado para cada concentração testada, sendo este a média do número de revertentes/placa com o composto-teste (revertentes induzidas) dividida pela média do número de revertentes/placa com o controle negativo (espontâneo).

#### **4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana**

O teste foi realizado em parceria com a Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de

Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). A atividade antimicrobiana do EEBD12 foi avaliada de acordo com a metodologia descrita em Oliveira *et al.* (2023).

#### **4.7.1. Cepas bacterianas**

As cepas utilizadas neste estudo são cepas de referência (ATCC – American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA – ATCC 33591), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29923), provenientes da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Armazenadas em freezer a -80°C, as cepas foram reativas em caldo Infusão cérebro coração (BHI - Brain hearth infusion, Kasvi) e incubado em estufa a 37°C, por 24 h. As suspensões foram semeadas em ágar seletivo para os micro-organismos de interesse para verificação das mesmas, sendo utilizado Ágar Triptona de Soja (TSA) (Kasvi, Itália) acrescido 0,75% de NaCl.

#### **4.7.2. Formação do biofilme**

Após o processo de reativação dos micro-organismos foi iniciado o processo de formação do biofilme, para isto, colônias dos micro-organismos foram diluídas em solução salina estéril 0,9%, formando suspensões microbianas. As suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal, São Paulo, Brasil) em  $10^7$  UFC/mL.

As suspensões padronizadas foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços (TPP, Zollstrasse, Suíça), respeitando os grupos experimentais expressos no quadro 1. Para cada micro-organismo foi realizado um grupo controle de crescimento e controle do veículo utilizado para diluição do extrato. Em seguida, as placas de 96 poços foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 h, com troca de meio em 24 h.

#### **4.7.3. Tratamentos aplicados nos biofilmes**

Após o processo de formação do biofilme por 48 h foram realizados os tratamentos nos respectivos grupos (Quadro 1). O EEBD12m foi diluído em solução salina estéril a 0,9% para obtenção da concentração desejada de 12 µg/mL e o tratamento realizado com a aplicação de 200 µL do extrato. Como controle positivo padrão ouro, foi usado Digluconato de Clorexidina 0,12%. Foram realizados tratamentos com 5, 15 e 30 minutos, depois foram acrescidos 200 µL de solução salina estéril 0,9% nos poços do biofilme dos grupos controles.

**Quadro 1.** Distribuição dos grupos experimentais

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Descrição</b>
Controle negativo (controle de crescimento)	Esse grupo não recebeu nenhum tratamento, sendo mantido apenas nos meios de cultura líquido
Controle de veículo	Esse grupo avaliou se a concentração de álcool presente no extrato possui atividade antimicrobiana.
Exposição por 5 min da solução de Digluconato de Clorexidina 0,12%	Esse grupo avaliou a atividade antimicrobiana da solução de Digluconato de clorexidina por 5 min
Exposição por 15 min da solução de Digluconato de Clorexidina 0,12%	Esse grupo avaliou a atividade antimicrobiana da solução de Digluconato de clorexidina por 15 min
Exposição por 30 min da solução de Digluconato de Clorexidina 0,12%	Esse grupo avaliou a atividade antimicrobiana da solução de Digluconato de clorexidina por 30 min
Exposição por 5 min da solução contendo o EEED12	Esse grupo avaliou a atividade antimicrobiana da solução do extrato EEED por 5 min
Exposição por 15 min da solução contendo o EEED12	Esse grupo avaliou a atividade antimicrobiana da solução do extrato EEED por 15 min
Exposição por 30 min da solução contendo o EEED12	Esse grupo avaliou a atividade antimicrobiana da solução do extrato EEED por 30 min

Fonte: Autor

#### **4.7.4. Determinação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)**

Após o período de exposição aos tratamentos (no tempo de 5, 15 e 30 min), os poços contendo biofilme foram lavados três vezes com solução salina estéril 0,9%, para remoção total das amostras e das células dos micro-organismos que foram afetadas pelos

tratamentos. Em seguida, o biofilme de cada poço foi desagregado com auxílio do homogeneizador ultrassônico (VCX 130 - Sonics Vibra Cell, Connecticut, EUA) e ponteiras esterilizadas. A partir da solução obtida foram realizadas diluições seriadas das suspensões dos biofilmes, as quais foram semeadas em placas de ágar TSA. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 h. Após incubação, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

#### **4.7.5. Análise estatística**

Foi realizada a análise descritiva dos dados seguido da verificação da curva Gaussiana para cada grupo. A presença de outliers foi também verificada. Como os dados não apresentavam curva Gaussiana, foi realizado teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 9.0. Para todas as análises foi considerado  $\alpha=0,05$ .

#### **4.8. Ensaio de cicatrização de feridas**

As células L929 foram cultivadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$ /poço), em triplicata, e estas foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h para permitir a adesão celular e a formação de uma monocamada de 90% de confluência. Posteriormente, com o auxílio de uma ponteira estéril de 100 µL, uma risca/arranhão foi realizada na linha mediana das monocamadas confluentes de cada poço, ocasionando uma lesão mecânica na confluência celular. O meio de cultura foi imediatamente removido e as células desaderidas foram removidas por lavagem com PBS. Em seguida, o meio removido foi substituído por 1 mL/poço de (I) meio de cultura DMEM suplementado com 10% FBS ou (II) meio de cultura DMEM suplementado com 10% FBS, contendo 12 µg/mL do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*.

O fechamento da ferida foi monitorado pela coleta de imagens digitalizadas em intervalos de tempo de 0, 4, 8 e 24 horas, após o arranhão ser realizado até o fechamento estar completo ou não progredir mais. As imagens digitalizadas foram capturadas com um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100). As imagens digitalizadas foram então analisadas usando o *software* Image-J para medir o tamanho da área do arranhão. Os dados foram apresentados como extensão do fechamento da ferida, ou seja, a porcentagem pela qual a largura original do arranhão diminuiu para cada ponto de tempo determinado.

#### **4.9. Preparo da celulose bacteriana e tratamento com o extrato de *Baccharis dracunculifolia***

As membranas de celulose bacteriana foram produzidas em parceria com o Prof. Dr. Hernane Barud, coordenador do Laboratório BioPolMat da UNIARA. Estas foram obtidas a partir do cultivo de *Komagataeibacter rhaeticus*, conforme descrito no trabalho de (BARUD et al., 2013b), em uma placa de cultivo celular de 24 poços. As membranas foram lavadas várias vezes em água destilada, depois deixadas em solução aquosa de NaOH 2% por 40 minutos a 80° C para esterilização do material e, posteriormente, lavadas novamente com água destilada até o pH neutralizar. Em seguida, as membranas de BC foram imersas em etanol por 24 horas, com trocas contínuas realizadas para garantir a substituição da água pelo etanol. A membrana de BC inchada com etanol foi utilizada para preparar as amostras de BC contendo EEBD.

Para o tratamento da celulose bacteriana com o EEBD, primeiro foi preparada uma solução do EEBD em uma concentração de 12 µg/mL, em temperatura ambiente. Em seguida, membranas de BC intumescidas com etanol foram imersas por 1 hora na solução do EEBD preparada, em temperatura ambiente, para impregnação passiva do extrato às membranas de celulose bacteriana. Após este tempo, as membranas de celulose bacteriana contendo o EEBD foram secas a 40° C por 12 horas.

#### **4.10. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier**

O extrato etanólico seco de *Baccharis dracunculifolia* e as membranas de celulose contendo e não contendo o extrato de BD foram caracterizados estruturalmente por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros infravermelhos foram obtidos em um espectrômetro Thermo Scientific NICOLET IS5 com módulo de transmissão iD3 ATR com cristal de germânio nas seguintes condições: 32 varreduras de fundo, 32 varreduras de análise de amostras, resolução de 2 cm<sup>-1</sup> e faixa de absorção entre 4000 e 650 cm<sup>-1</sup>. Os resultados foram plotados e tratados no *software* OriginPro 8.5.

#### **4.11. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)**

Para avaliar a presença do EEBD nas membranas de celulose bacteriana, um volume de 500 µL de etanol foi adicionado em membranas contendo ou não o EEBD, que

ficaram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os espectros de absorção na região UV foram adquiridos de alíquotas de 500 uL do etanol que ficou em contato com cada membrana. Foram utilizados o espectrofotômetro Bel Engineering UV-M51 e cubetas de quartzo de volume de 600 uL e caminho óptico de 1 cm. As absorbâncias foram registradas na faixa de 190 e 800 nm, com leituras realizadas de 2 em 2 nm. Os resultados foram plotados e tratados no *software* GraphPad Prism 9.0.

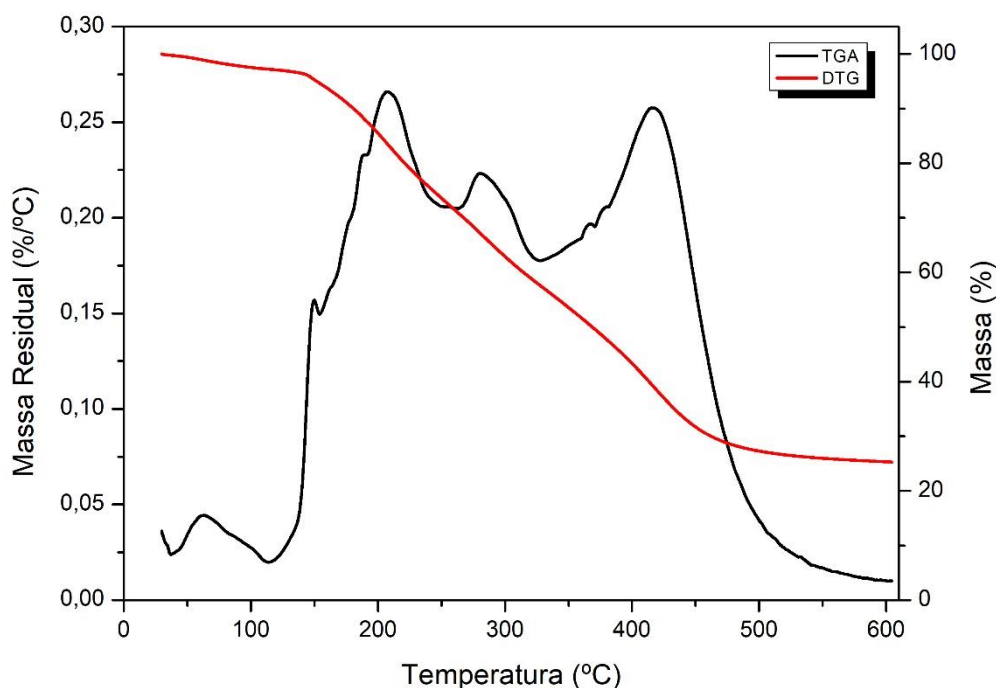
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise termogravimétrica

O comportamento térmico do extrato seco de *Baccharis dracunculifolia* foi avaliado por termogravimetria (Figura 1). A amostra de extrato seco apresentou três estágios distintos de perda de massa. Na faixa de 36 a 112 °C ocorre o primeiro estágio de perda de massa, que pode ser atribuído à perda de etanol e água (4%). Entre 137 e 190 °C há um pico na curva TG e uma pequena perda de massa detectada (9%), que pode estar associada à perda de outros compostos voláteis. A maior degradação e perda dos componentes do extrato ocorre entre 191 e 476 °C, com decomposição térmica de aproximadamente 59%, confirmada pela curva DTG. Acima de 476 °C, a curva TG é plana e não há perda de massa detectada, deixando cerca de 28% dos componentes que não foram degradados.

**Figura 1.** Análise termogravimétrica do extrato seco de *Baccharis dracunculifolia*





Fonte: Autor

## 5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O extrato de *Baccharis dracunculifolia* fornecido pela empresa Ciclo Farma Indústria Química Eireli, oriundo do lote número 0062017, foi submetido à análise por HPLC para quantificação de determinados flavonoides presentes na amostra, a saber: ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cinâmico, bacarina e artepelin C. Como fruto da colaboração para este trabalho, os resultados foram fornecidos pela empresa e estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores médios das concentrações de flavonoides analisados para o extrato vegetal de *Baccharis dracunculifolia*, expressos em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Ácido Ferúlico	Ácido Cumárico	Ácido Cinâmico	Bacarina	Artepelin C
36,72	165,89	54,18	411,08	750,06

Fonte: Ciclo Farma Indústria Química Eireli

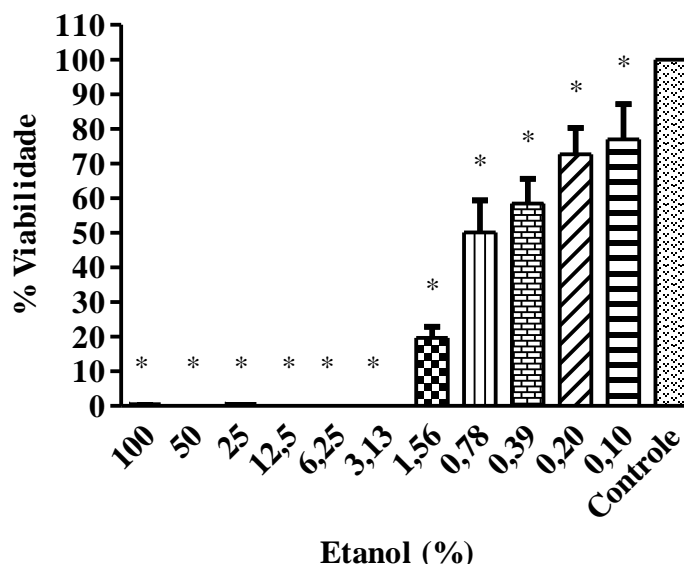
## 5.3. Ensaio de citotoxicidade do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* e do etanol

O EEED12 foi avaliado em relação à sua capacidade de citotoxicidade pelo teste de MTT em células L929, no qual a viabilidade celular é caracterizada de acordo com o

potencial de redução do MTT para cristais de formazan. Este é um método colorimétrico que detecta o crescimento celular por meio da função mitocondrial. O MTT é carregado positivamente e entra com facilidade nas células. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória. A coloração azul ou roxa é, portanto, um quantificador da viabilidade das células.

Inicialmente, o EEBD12m foi submetido a uma diluição seriada de 1:2 em meio de cultura DMEM suplementado para determinação de outras concentrações, somando um total de 11 concentrações a serem avaliadas. Além disso, o etanol também foi submetido a uma diluição seriada de 1:2 em meio de cultura DMEM suplementado, gerando 11 concentrações diferentes do solvente, a fim de verificar sua influência na citotoxicidade do extrato, como mostra a Figura 2. Conforme a norma ISO 10993-5, as taxas de viabilidade celular inferiores a 70% caracterizam toxicidade do extrato.

**Figura 2.** Porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos (L929) na presença de etanol. Os grupos que apresentaram valores estatisticamente significativos,  $p < 0,05$  (t-test), em relação ao grupo Controle foram representando com um asterisco “\*”.



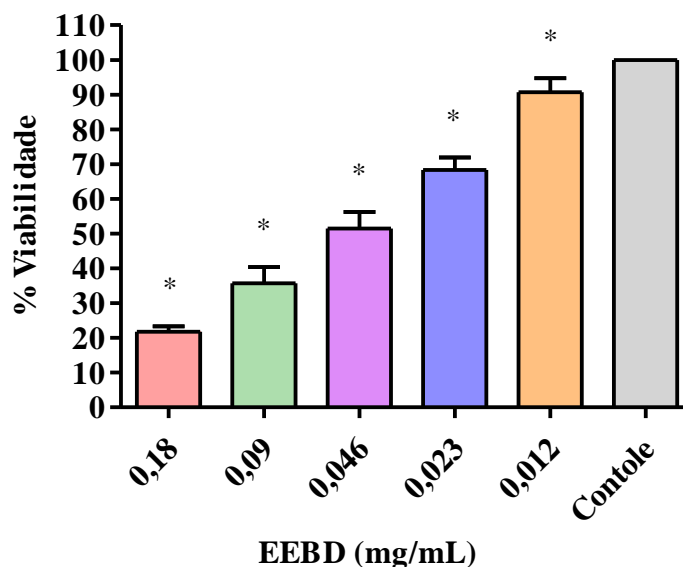
Fonte: Autor

Os dados do gráfico acima mostram a toxicidade do etanol para as células L929 em 11 concentrações diferentes. Essas informações devem ser consideradas, uma vez que

que para diluição feita com o EEBD12m, cada uma das 11 concentrações testadas o etanol presente também teve sua concentração diminuída pela metade em cada ponto de concentração.

O etanol começa se mostrar menos citotóxico a partir do sétimo ponto de concentração testado (1,56%), no entanto apresenta boa viabilidade celular apenas em suas duas menores concentrações (0,20 e 0,10%). A partir da relação direta de concentrações extrato-etanol, ou seja, diminuição da concentração do etanol conforme a diluição e diminuição da concentração do extrato (por exemplo, o extrato 12mg/mL apresenta uma concentração de 100% etanol; o extrato 6 mg/mL – 50% etanol; o extrato 3 mg/mL – 25% etanol, e assim por diante), foram consideradas apenas as porcentagens de viabilidade celular das concentrações do extrato que tiveram menor interferência do etanol para a citotoxicidade. Sendo o etanol menos tóxico a partir do sétimo ponto de concentração testado, foram consideradas as porcentagens de viabilidade celular do extrato também a partir do sétimo ponto de concentração (Figura 3).

**Figura 3.** Porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos (L929) na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (EEBD). Os grupos que apresentaram valores estatisticamente significativos,  $p < 0,05$  (t-test), em relação ao grupo Controle foram representando com um asterisco “\*”.

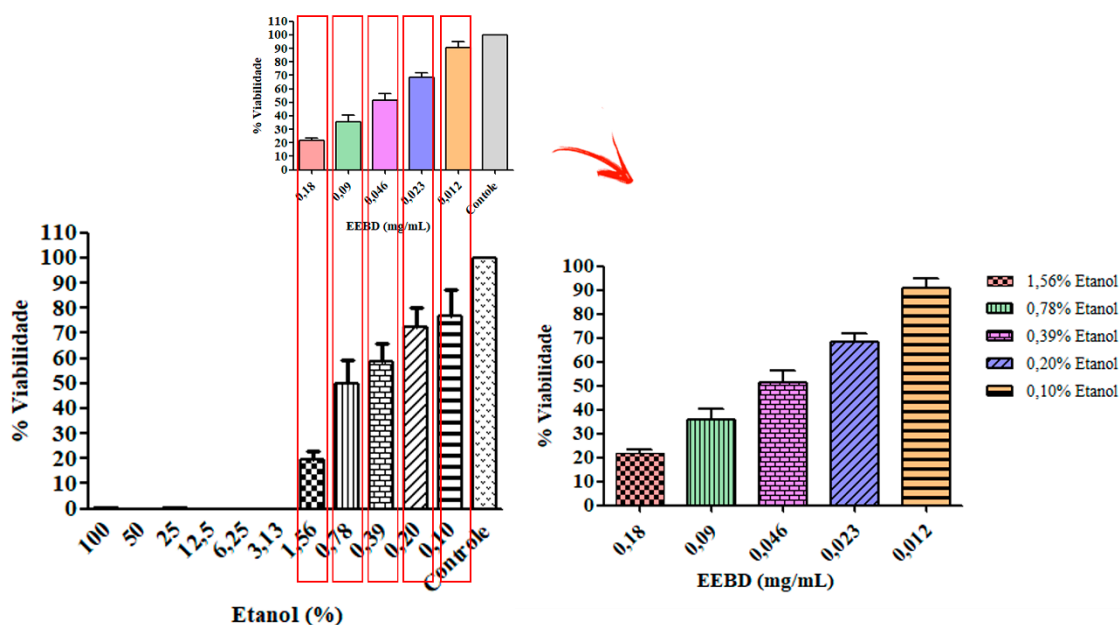


Fonte: Autor

Sobrepondo os resultados de viabilidade celular do etanol e do EEBD, é possível observar que o extrato apresentou boa viabilidade celular apenas em suas duas menores

concentrações (0,023 e 0,012 mg/mL), assim como o etanol. Esses dados nos informam sobre a relevância do solvente para a citotoxicidade do extrato. Desta forma, a Figura 4 mostra essa relação direta de concentrações extrato-etanol.

**Figura 4.** Viabilidade celular de fibroblastos (L929) na presença do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (EEBD) com influência do etanol



Fonte: Autor

Levando em consideração a influência do etanol para citotoxicidade, a menor concentração testada, 0,012 mg/mL ou 12  $\mu$ g/mL, foi a concentração de trabalho escolhida para os demais testes desse estudo, recebendo o nome de Extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* de 12  $\mu$ g/mL (EEBD12). Apesar da influência do solvente para citotoxicidade do extrato, os resultados obtidos corroboram com dados da literatura, como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2.** Estudos de ensaio de viabilidade celular com *Baccharis dracunculifolia*

Referências	Solventes	Concentrações testadas ( $\mu$ g/mL)	Ensaio	Linhagem celular	Concentrações citotóxicas ( $\mu$ g/mL)
Costa <i>et al.</i> (2019b)	Etanol/Água	0,1, 1, 10 e 100	MTT	L929*	Nenhuma

<b>Figueiredo-Rinhel et al. (2013)</b>	Etanol	50	Teste de exclusão Trypan Blue	Neutrófilo	Nenhuma
<b>Munari et al. (2010)</b>	Acetato de etila	12.5, 25, 50, 100, 200 e 400	Teste de exclusão Trypan Blue	V79**	200 e 400
<b>Da Silva et al. (2019)</b>	DMSO	2.18, 54.68 e 218.75	MTT	LX-2***	218.75

\*Fibroblasto de rato

\*\*Fibroblasto de pulmão de rato

\*\*\*Célula hepática humana

**Fonte:** Autor

Os diferentes tipos de extratos de *Baccharis dracunculifolia* listados na tabela acima se comportaram de maneira semelhante em relação a citotoxicidade e se mostraram dose dependente, sendo citotóxico em doses mais elevadas.

#### 5.4. Teste de Ames

Nenhuma das cepas de *S. Typhimurium*, expostas às diferentes concentrações do EEED, apresentaram aumento de duas vezes ou mais no número médio de revertentes em comparação ao grupo controle negativo, conforme apresentado na Tabela 3, que lista o número médio de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice mutagênico (IM) após os tratamentos com as diferentes concentrações de EEED.

**Tabela 3.** Revertentes/placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade (entre parênteses) nas cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella Typhimurium* após tratamento com diferentes concentrações de EEED.

Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM				
	TA98	TA100	TA102	TA97a
<b>ESP</b>	26 ± 6	118 ± 17	279 ± 41	127 ± 10
<b>C +</b>	970 ± 83 <sup>*,a</sup>	1348 ± 96 <sup>*,b</sup>	1832 ± 158 <sup>*,c</sup>	1561 ± 185 <sup>*,a</sup>
<b>ET</b>	28 ± 4 (1,08)	134 ± 8 (1,14)	292 ± 28 (1,05)	135 ± 20 (1,06)

---

**Extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia***

**µg/placa**

<b>15</b>	28 ± 7 (1,06)	118 ± 6 (1,00)	318 ± 25 (1,14)	151 ± 27 (1,19)
<b>30</b>	30 ± 4 (1,13)	119 ± 8 (1,00)	323 ± 36 (1,16)	149 ± 12 (1,17)
<b>60</b>	29 ± 4 (1,12)	124 ± 12 (1,05)	296 ± 15 (1,06)	144 ± 10 (1,13)
<b>90</b>	27 ± 8 (1,04)	116 ± 23 (0,98)	292 ± 18 (1,05)	136 ± 33 (1,07)
<b>120</b>	29 ± 3 (1,12)	130 ± 14 (1,10)	311 ± 30 (1,11)	139 ± 16 (1,09)

ESP: taxa espontânea de reversão das linhagens de *Salmonella* Typhimurium; ET = etanol (10 µL/ placa); \* $p < 0,05$  (ANOVA);

M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade;

C + = Controle positivo: <sup>a</sup>4-nitro-o-fenilenodiamino (TA98 e TA97a, 10,0 µg/ placa); <sup>b</sup>Azida sódica (TA100, 1,25 µg/ placa) e <sup>c</sup>Mitomicina (TA102, 0,5 µg/ placa).

Valores entre parênteses (IM)  $\geq 2$  indica mutagenicidade.

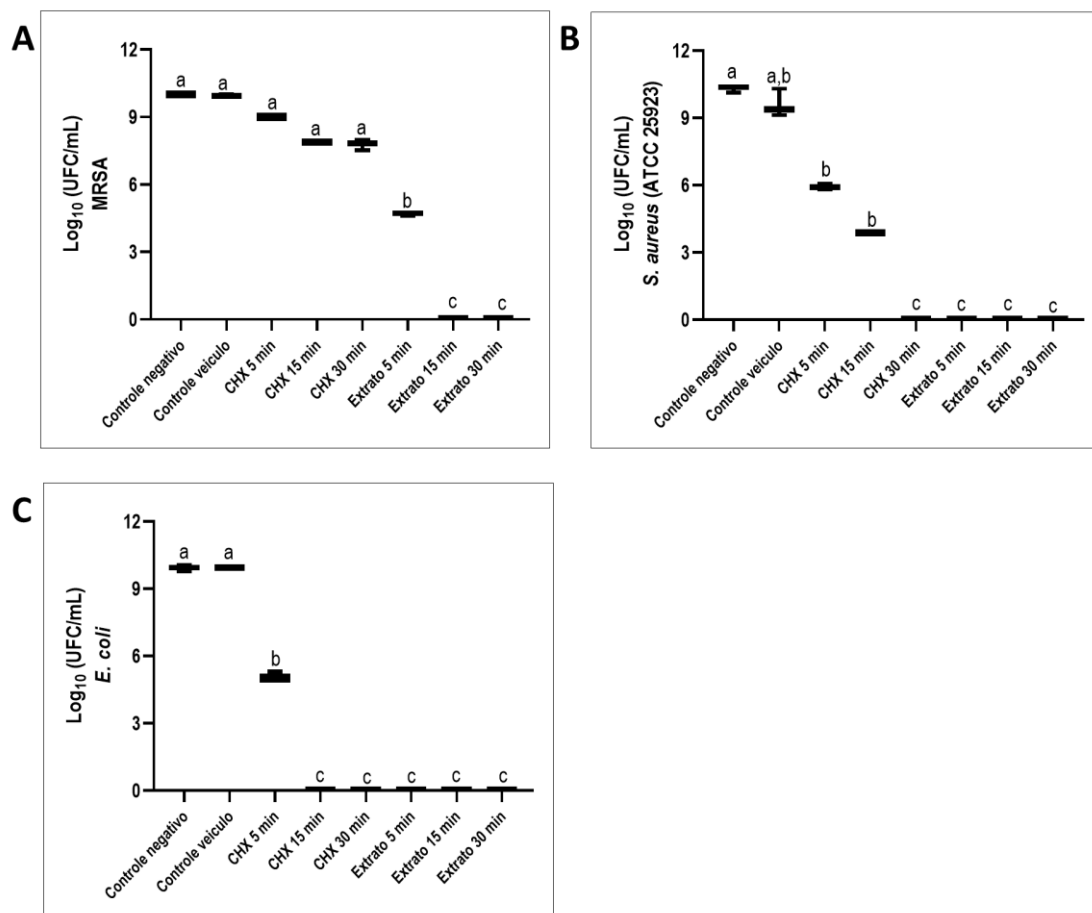
**Fonte:** Autor

De acordo com os resultados obtidos, o extrato etanólico não provocou um aumento estatisticamente significativo no número de revertentes em relação ao controle negativo, em nenhuma das concentrações e cepas de *S. Typhimurium* analisadas, demonstrando ausência de atividade mutagênica nas condições experimentais utilizadas. O IM foi abaixo de 2 nas análises de dados realizadas. O etanol, na concentração testada, também não induziu qualquer efeito bactericida ou mutagênico.

### 5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os resultados do ensaio com biofilme para avaliar o espectro antimicrobiano do EEBD contra diferentes microrganismos é mostrado na Figura 4. O EEBD revelou atividade antibacteriana contra todas as cepas testadas, tanto para as gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente) como para a gram-negativa (*Escherichia coli*).

**Figura 5.** Tratamento com EEBD contra biofilme de bactérias gram-positivas e gram-negativa. (A) *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente, (B) *Staphylococcus aureus* e (C) *Escherichia coli*. Controle negativo (meio de cultura mais bactérias sem extrato) e controle de veículo (álcool)



Fonte: Autor

Os resultados para MRSA (Fig. 4A) demonstraram que o EEBD12 em contato com o biofilme por 15 min e 30 min foi capaz de reduzir totalmente os valores de viabilidade celular ( $\log_{10}$ CFU/mL). Os biofilmes de MRSA tratados com EEBD12 de 5 min também demonstraram redução significativa da viabilidade celular, inclusive essa redução foi significativamente maior quando comparado a todos os grupos com tempos distintos da clorexidina. O controle negativo, assim como o controle de veículo, apresentou resultados estáveis.

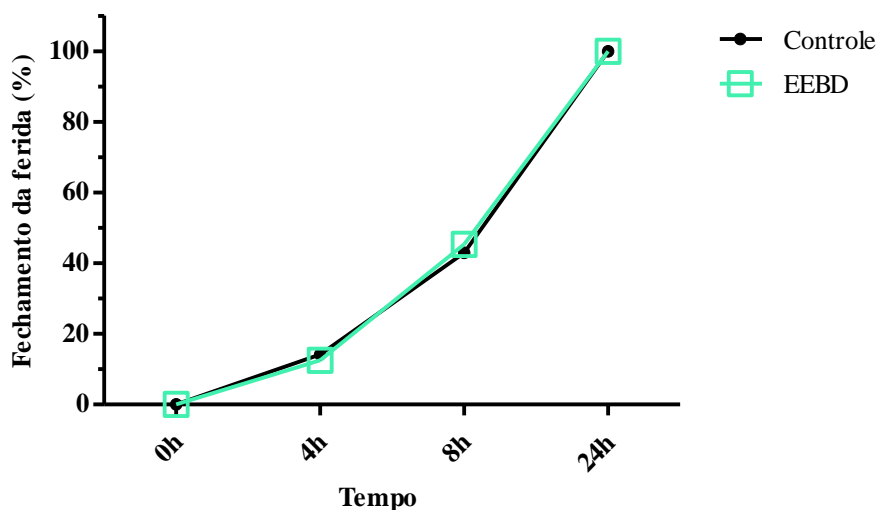
Os resultados de *S. aureus* (Fig. 4B) demonstraram que o contato com o biofilme por 5, 10 e 30 min para o EEBD12 e de 30 min para clorexidina foram capazes de reduzir totalmente os valores de viabilidade celular ( $\log_{10}$ CFU/mL). Adicionalmente, os grupos de biofilmes tratados com clorexidina por 5 min e 15 min, apesar de uma certa redução da viabilidade celular, não demonstraram ser significativamente diferentes do grupo controle de veículo. O controle negativo, assim como o controle de veículo, apresentou resultados estáveis.

Os resultados de *E. coli* (Fig. 4C) demonstraram que o contato com o biofilme por 5, 10 e 30 min para o EEBD12 e de 15 e 30 min para a clorexidina foram capazes de reduzir totalmente os valores de viabilidade celular ( $\log_{10}$ CFU/mL). Biofilmes tratados com clorexidina por 5 min também demonstraram redução significativa dos valores de viabilidade celular quando comparado aos grupos controle negativo e controle de veículo. O controle negativo, assim como o controle de veículo, apresentou resultados estáveis.

### 5.6. Ensaio de cicatrização de feridas

O ensaio de cicatrização de feridas foi aplicado para analisar se os fibroblastos (L929) apresentam melhor migração celular para o fechamento da ferida na presença do EEBD12. Na presença do extrato, os fibroblastos tiveram uma porcentagem de fechamento da ferida similar ao controle, como mostra a Figura 6.

**Figura 6.** Taxa de fechamento da ferida na presença do meio com EEBD em comparação ao controle (apenas meio de cultura).



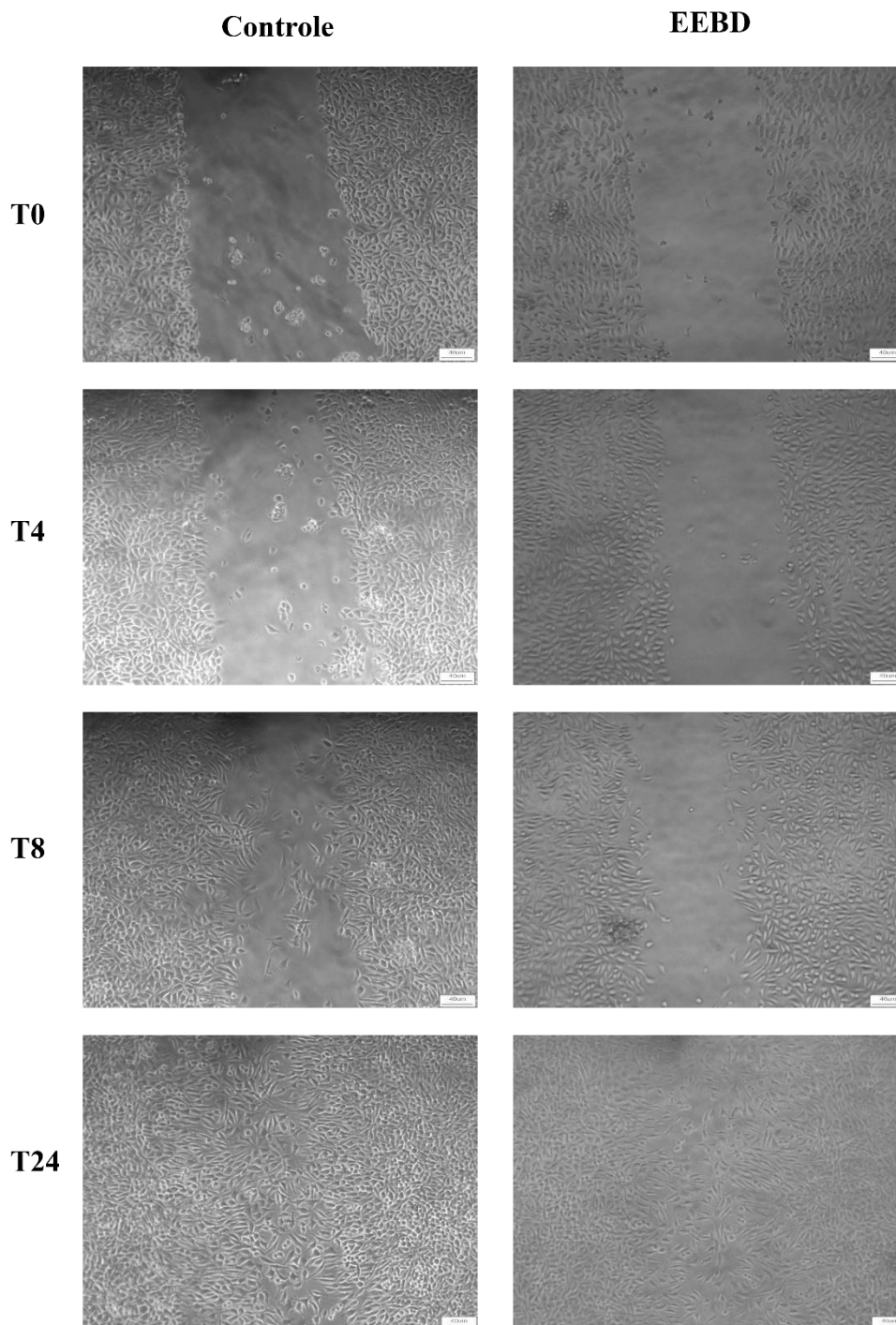
Fonte: Autor

Os resultados mostram que depois de 4h do arranhão ser realizado, a extensão do fechamento era de 12,53% na presença do EEBD12 e de 14,17% no controle. Às 8h, a porcentagem de fechamento era de 42,96% na presença do extrato e de 45,37% no controle. Além disso, em ambos os grupos o fechamento completo da ferida foi visto em 24h. As diferenças nas taxas de cicatrização não apresentam diferença significativa. Em resumo, os dados demonstraram que o EEBD12 teve comportamento semelhante ao



controle, permitindo a migração dos fibroblastos L929 e o fechamento da lesão. A figura 7 ilustra o fechamento da lesão dos dois grupos através de imagens capturas até o fechamento da lesão em 24 horas.

**Figura 7.** Imagens representativas do fechamento da lesão nos intervalos de tempo do ensaio de cicatrização por arranhão. T0: monocamada celular de L929 imediatamente após o arranhão; T4, T8 e T24: 4, 8 e 24 horas após o arranhão, respectivamente.

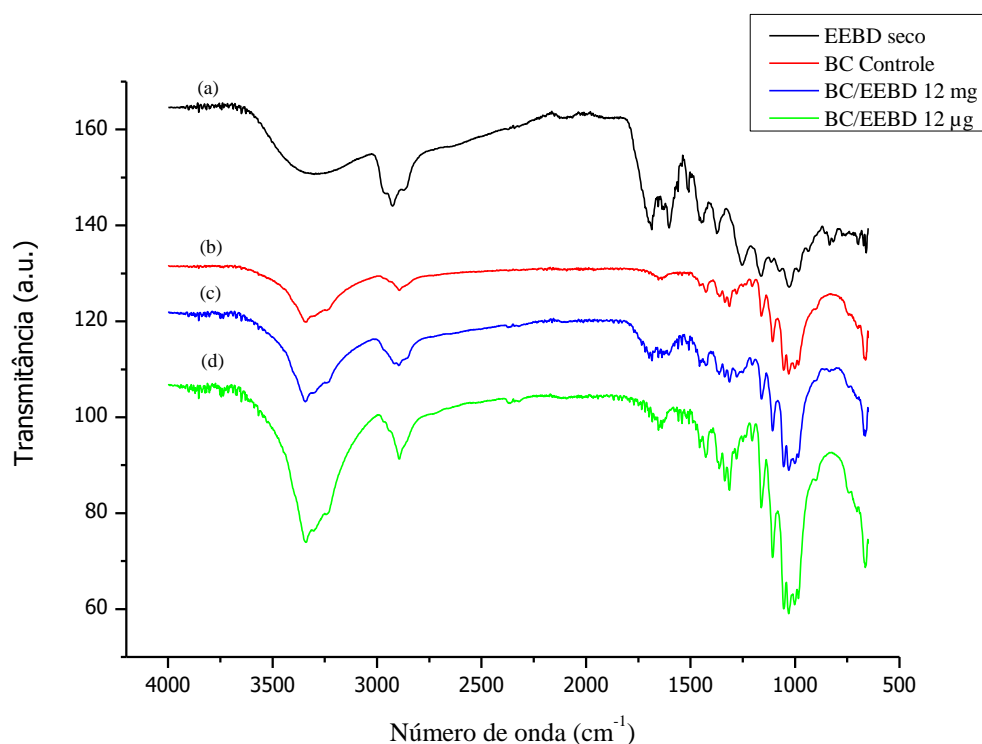


**Fonte:** Autor

### 5.7. FTIR-ATR

Foi determinado o espectro FTIR-ATR de amostra do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* seco, da membrana de celulose bacteriana, da membrana de celulose bacteriana contendo o EEBD 12 mg e da membrana de celulose bacteriana contendo EEBD 12  $\mu\text{g}$ . Os espectros de FTIR relacionados a cada amostra estudada são apresentados na Figura 8. Os dados foram interpretados a partir do padrão espectral infravermelho para análise uma análise qualitativa das amostras, bem como para avaliar a presença do extrato na membrana de celulose bacteriana.

**Figura 8.** Espectros FTIR de: (a) extrato seco de *Baccharis dracunculifolia*; (b) membrana de celulose bacteriana (Controle), (c) membrana de celulose bacteriana contendo EEBD 12 mg (BC/ EEBD 12 mg) e (d) membrana de celulose bacteriana contendo EEBD 12  $\mu\text{g}$  (BC/ EEBD 12  $\mu\text{g}$ )



**Fonte:** Autor

A análise do espectro FTIR-ATR do extrato seco de *Baccharis dracunculifolia* (Figura 8a) mostra bandas posicionadas em  $3291\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao alongamento das ligações OH presentes em álcoois e compostos fenólicos (Jurckevicz *et al.*, 2019b; Oliveira *et al.*, 2016b; Rocha *et al.*, 2012); em  $2924\text{ cm}^{-1}$  referente aos trechos das ligações

C–H de hidrocarbonetos ligados ao oxigênio (Da Silva Monteiro *et al.*, 2022; Iurckevicz *et al.*, 2019b; Zancanela *et al.*, 2019); em  $1600\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída à vibração de estiramento dos grupos C=C em compostos aromáticos (Da Silva Monteiro *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2016b; Zancanela *et al.*, 2019) e, finalmente, a banda em  $1252\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à vibração do grupo C-O (Oliveira *et al.*, 2016b). Como o extrato da planta consiste em uma mistura orgânica de composição variada, vale ressaltar que as diversas bandas atribuídas podem corresponder a vibrações decorrentes de outros compostos não identificados presentes em sua composição.

A membrana de BC (Figura 8b) mostra alongamento simétrico C–O do álcool primário e ponte assimétrica C-O-C estendendo-se em  $1040$  e  $1168\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. A deformação C–H ( $\text{CH}_3$  ou O–H na flexão plana) é vista em  $1340\text{ cm}^{-1}$ , e a banda centrada em  $1400\text{ cm}^{-1}$  está relacionada à flexão  $\text{CH}_2$  e OH na flexão plana. Outras bandas estão relacionadas ao dobramento H-O-H da água adsorvida (em  $1650\text{ cm}^{-1}$ ), alongamento CH dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  (em  $2900\text{ cm}^{-1}$ ) e alongamento OH (banda larga em  $3500\text{ cm}^{-1}$ ) (BARUD *et al.*, 2013a).

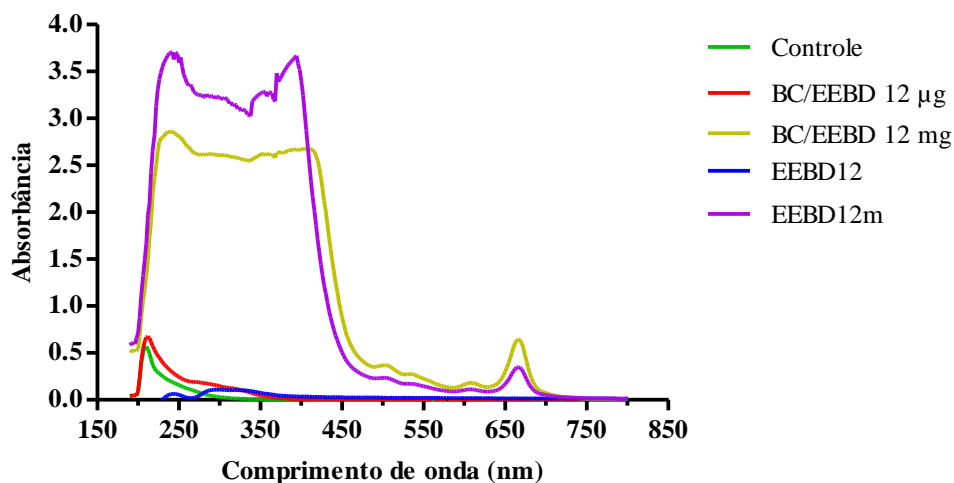
Para enfatizar a incorporação do extrato à membrana de celulose bacteriana, foi realizado o espectro FTIR-ATR da membrana de celulose bacteriana impregnada com o EEBD 12 mg. Os espectros das membranas de BC/EEBD 12 mg e BC/EEBD 12  $\mu\text{g}$  podem ser considerados como a soma das bandas presentes na membrana BC e no extrato seco; em outras palavras, observam-se contribuições relacionadas às vibrações características tanto da membrana de celulose bacteriana quanto do extrato seco da planta. Nos espectros das amostras BC/EEBD 12 mg e BC/EEBD 12  $\mu\text{g}$  (Figuras 8c e 8d, respectivamente) foi possível observar bandas correspondentes ao extrato posicionadas em aproximadamente  $1507$ ,  $1541$ ,  $1559$  e  $1684\text{ cm}^{-1}$ . Para a membrana contendo a maior concentração do extrato, também foi possível observar banda posicionada em  $2857\text{ cm}^{-1}$ . Estas não foram observadas na membrana de celulose bacteriana contendo a concentração de trabalho escolhida, de 12  $\mu\text{g}$ , pela baixa concentração do extrato.

## 5.8. UV-Vis

As amostras foram coletadas para análise qualitativa da presença do EEBD na membrana de celulose bacteriana (Figura 9) utilizando espectrometria UV-VIS. Foi observado que a celulose bacteriana contendo 12  $\mu\text{g}$  do extrato apresentou absorvância em comprimento de onda na região entre 260 e 350 nm, tal como a amostra do EEBD 12  $\mu\text{g/mL}$ . Este dado indica que componentes extraídos desta membrana pelo etanol

correspondem aos componentes do extrato, ou seja, indica a presença do extrato na membrana. Também foi observado que amostra controle apresentou absorvância em comprimento de onda próxima ao comprimento de onda de 190 nm, assim como a amostra de celulose bacteriana contendo 12  $\mu\text{g}$  do extrato. Estes dados, por sua vez, indicam a possibilidade da presença de algum componente advindo do meio de cultura utilizado para a produção da celulose bacteriana, que tenha absorvância nesta região.

**Figura 9.** Espectros de absorção UV-Vis de: membrana de celulose bacteriana (Controle), membrana de celulose bacteriana contendo EEBD 12  $\mu\text{g}$  (BC/ EEBD 12  $\mu\text{g}$ ), membrana de celulose bacteriana contendo EEBD 12 mg (BC/ EEBD 12 mg), EEBD 12  $\mu\text{g/mL}$  (EEBD12) e EEBD 12 mg/mL (EEBD12m).



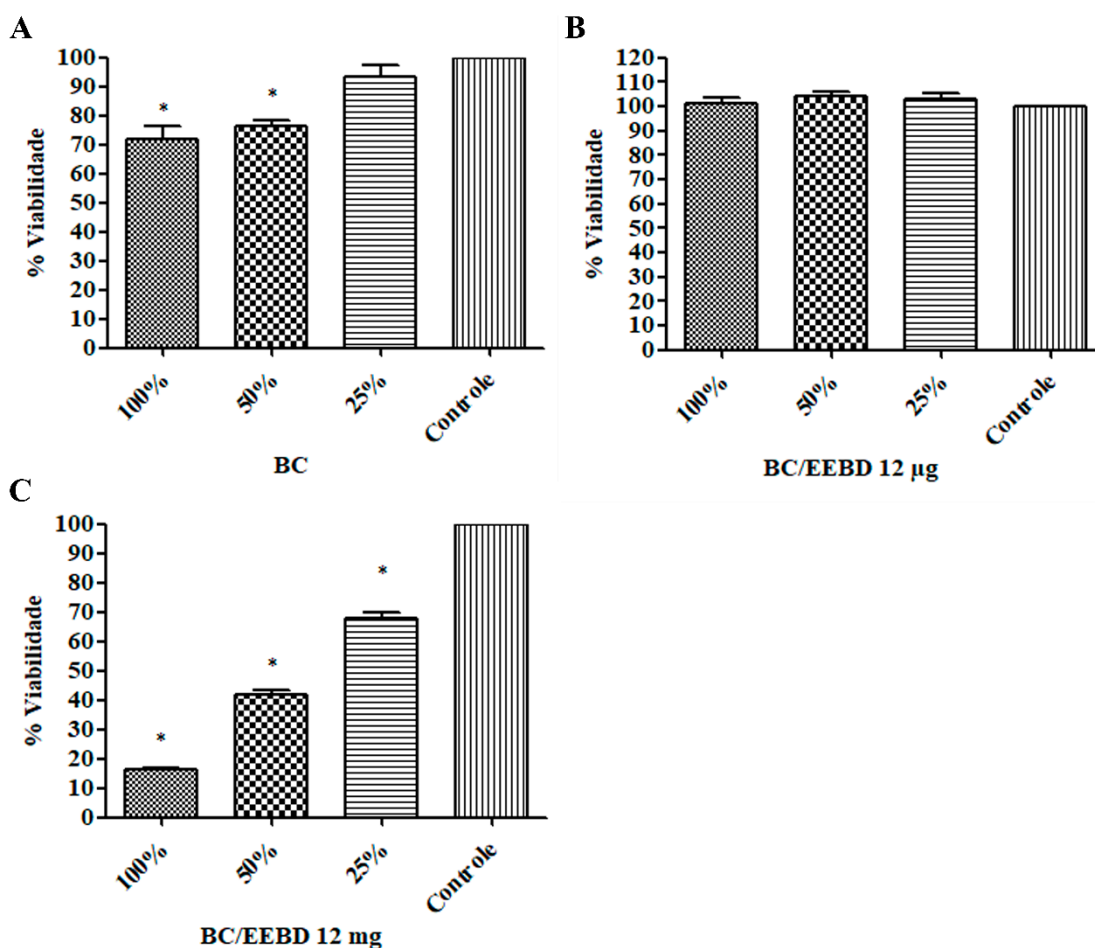
Fonte: Autor

Para enfatizar a incorporação do extrato à membrana de celulose bacteriana, foram coletadas amostras do EEBD12m, e da membrana de celulose bacteriana impregnada com EEBD 12 mg. A celulose bacteriana contendo 12 mg do extrato apresentou absorvância em comprimento de onda na região entre 650 e 675 nm e na região abaixo de 450 nm, apontando a extração de componentes da membrana pelo etanol. Os espectros de absorvância do EEBD 12 mg/mL ocorreram nas mesmas regiões da membrana de celulose bacteriana contendo este extrato, isto é, indica a presença do extrato na membrana.

### 5.9. Ensaio de citotoxicidade de membranas de celulose bacteriana contendo ou não extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*

Os meios condicionados das membranas de celulose bacteriana contendo ou não extrato de *Baccharis dracunculifolia* foram avaliados em relação à sua capacidade de citotoxicidade pelo teste de MTT em três concentrações diferentes (100, 50 e 25%) utilizando fibroblastos dérmicos humanos de adultos (HDFa), como mostra a Figura 10.

**Figura 10.** Porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos (HDFa) na presença de três concentrações diferentes dos meios condicionado de: (A) membrana de celulose bacteriana; (B) membrana de celulose bacteriana contendo o EEBD 12 µg; e (C) membrana de celulose bacteriana contendo EEBD 12 mg. Os grupos que apresentaram valores estatisticamente significativos,  $p < 0,05$  (t-test), em relação ao grupo Controle foram representando com um asterisco “\*”.



Fonte: Autor

A Figura 10A, correspondente ao meio condicionado da membrana de BC, mostra que em nenhuma das concentrações testadas houve citotoxicidade. Em relação ao meio condicionado das membranas de celulose bacteriana contendo o extrato de 12 µg (Figura 10B), foi possível observar que todas as concentrações avaliadas apresentaram

comportamento similar ao do controle, não havendo qualquer diferença estatística entre os grupos avaliados. Por outro lado, nota-se atividade citotóxica de todas as concentrações do meio condicionado da membrana de celulose bacteriana contendo o extrato de 12 mg (Figura 10C), bem como valores significativamente menores em relação ao controle, ou seja, todas as concentrações do meio condicionado apresentaram um número menor de células viáveis em relação ao controle.

Quando comparado a membrana de celulose bacteriana com a membrana contendo o extrato de 12 µg, nota-se diferenças importantes nas porcentagens de viabilidade celular, tendo a membrana com o extrato apresentado maiores porcentagens. Isto é, apesar da BC sem o extrato não ser citotóxica, a celulose bacteriana contendo o extrato de 12 µg apresentou melhores porcentagens de viabilidade celular, se comportamento de forma similar ao controle.

## 6. DISCUSSÃO

As plantas medicinais são largamente utilizadas na medicina popular e continuam a servir para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos (Newman; Cragg, 2007). O conhecimento dos principais compostos químicos e variações do extrato de uma planta medicinal é esse essencial para avaliar suas atividades biológicas. Análises de comparação entre os extratos de *B. dracunculifolia* e própolis verde, como o estudo de Rodrigues *et al.* (2020), mostram que os principais marcadores farmacologicamente ativos de ambas as matrizes são compostos por ácido p-cumárico, bacarina e artepilin C. O extrato de BD produzido pela empresa Ciclo Farma, oriundo do lote número 0062017, foi submetido à análise por HPLC, a fim de se obter a concentração de alguns flavonoides e marcadores químicos presentes na amostra, a saber: ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido cinâmico, bacarina e artepelin C. Sob o ponto de vista qualitativo, foi possível identificar todos os principais compostos marcadores químicos que se deseja encontrar em uma amostra de extrato de *Baccharis dracunculifolia*. Para esses compostos químicos diferentes atividades biológicas são associadas. Os ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico são ácidos transcinâmicos encontrados naturalmente em suas formas livres ou como uma família de mono ou diésteres com ácido (-)-quínico, conhecidos como ácidos clorogênicos (CGAs) (Bastos *et al.*, 2011). Os CGAs são importantes componentes antioxidantes produzidos pelas plantas em resposta a condições de estresse ambiental. A ação antioxidante é uma atividade biológica que pode contribuir em diversos aspectos

para a saúde de um organismo. Estudos demonstram atividades biológicas de *B. dracunculifolia* sendo, pelo menos em parte, atribuídas à capacidade antioxidante de seus componentes ativos. O estudo de Costa et al. (2019a) demonstra que o ácido p-cumárico é um composto bioativo fundamental no processo de cicatrização gástrica. Outros compostos como artepelin C e bacarina são revelados como potenciais agentes antígenotóxicos (De Oliveira et al., 2013; Oliveira et al., 2011). Além disso, o artepelin C também possui ação antitumoral (Kobal et al., 2020), anti-inflamatória (Paulino et al., 2008) e antimicrobiana (Veiga et al., 2017).

O equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto é um parâmetro muito importante para avaliar a utilidade de um composto farmacologicamente ativo (Rodeiro et al., 2006). Portanto, a determinação do potencial efeito citotóxico e mutagênico é um evento obrigatório. Os efeitos citotóxicos do extrato de BD antes e depois do seu preparo foram estudados pelo nosso grupo (Neto et al., 2023) e os dados mostram que todas as concentrações testadas do extrato antes do preparo foram citotóxicas, enquanto o extrato de BD após o preparo foi tóxico apenas em suas maiores concentrações testadas. Isto se deve ao fato do extrato, antes do seu preparo, não estar totalmente solubilizado e ter gerado precipitações que interferissem na leitura de absorbância do teste de citotoxicidade aplicado. Em complemento a esses dados, no presente estudo, diferentes níveis de citotoxicidade observados de acordo com as concentrações testadas. Os resultados mostraram uma relação dose dependente do extrato após o preparo, não apresentando alterações na viabilidade das células L929 nas duas menores concentrações testadas (0,023 e 0,012 mg/mL) e sendo citotóxico em doses mais elevadas. Deve-se em medida, a influência do solvente presente no extrato. Desta forma, optando-se por escolher a concentração de 12 µg/mL (EEBD12) como a concentração de trabalho. Além disso, o teste de Ames mostrou que o extrato não provocou efeitos mutagênicos contra as cepas de *S. Typhimurium*. A ausência de efeito mutagênico corrobora com estudos presentes na literatura, como o estudo de Resende et al., (2012), no qual o extrato de *Baccharis dracunculifolia*, além de não ser mutagênico, também apresentou atividade antimutagênica. Estes resultados são um passo positivo para determinar o uso seguro do extrato.

Um dos desafios mais comuns no tratamento de feridas é que muitas feridas são colonizadas com bactérias formadoras de biofilme (Tomic-Canic et al., 2020), que são frequentemente resistentes ao tratamento (Edwards; Harding, 2004). As infecções que permeiam essas feridas podem causar inflamação grave, afetando negativamente a

cicatrização (Yu *et al.*, 2024). As infecções por biofilme em feridas são comumente causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (Kirkup, 2015). Os resultados desse estudo demonstraram que para MRSA, o EEBD12 em contato com o biofilme por 15 min e 30 min foi capaz de reduzir totalmente os valores de viabilidade celular. Os biofilmes de MRSA tratados com EEBD12 por 5 min também demonstraram redução significativa da viabilidade celular, sendo significativamente maior quando comparado a todos os grupos com tempos distintos da clorexidina. Para *S. aureus* e *E. coli* o EEBD12 foi capaz de reduzir totalmente os valores de viabilidade celular nos três tempos de exposição. O EEBD12 apresentou ação antimicrobiana consistente e superior ao antimicrobiano de referência, a clorexidina, em todos os tempos de exposição contra as cepas bacterianas testadas.

Os ensaios *in vitro* baseados em células podem fornecer dados preliminares sobre a taxa de cicatrização de feridas. Logo, o estudo de fatores que influenciam a migração de fibroblastos e queratinócitos pode ajudar a direcionar terapias para melhorar a cicatrização de feridas (Walter *et al.*, 2010). O ensaio de cicatrização de feridas utilizado no presente estudo demonstrou que o EEBD12 não foi capaz de melhorar o tempo de migração das células L929 e o fechamento da lesão, contudo não desacelerou este processo e apresentou porcentagem de fechamento da ferida similar ao do controle, não havendo diferença significativa entre os dois grupos. Apesar de não otimizar o tempo de fechamento da lesão, este resultado é mais um passo positivo para o uso seguro do extrato.

Para o tratamento das membranas de celulose bacteriana com o EEBD12, ocorre uma etapa de secagem à 40 °C. Com a aplicação da técnica de TGA/DTG sob extrato seco de *Baccharis dracunculifolia* foi possível avaliar se poderia haver alguma perda de massa significativa do extrato durante a etapa de secagem das membranas. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que a maior degradação e perda dos componentes do extrato ocorre entre 191 e 476 °C, confirmando que não há possibilidade de perda significativa da massa do extrato durante o processo de secagem, sendo a massa perdida a 40 °C atribuída a perda de água e do etanol presente no extrato. Descartada a possibilidade de perda de massa significativa do extrato, após o tratamento das membranas de celulose bacteriana com o EEBD12, as técnicas de FTIR-ATR e UV-Vis foram aplicadas para detectar a impregnação do extrato à BC. Nos resultados da técnica de FTIR-ATR observou-se no espectro da membrana de BC/EEBD 12 µg bandas correspondentes à BC posicionadas em aproximadamente 1040 e 1400 cm<sup>-1</sup>, assim como bandas do extrato posicionadas em aproximadamente 1507, 1541, 1559 e 1684 cm<sup>-1</sup>. Ou



seja, houve contribuições relacionadas às vibrações características tanto da membrana de celulose bacteriana quanto do extrato da planta. O espectro da membrana de BC/EEBD 12 µg pode ser considerado como a soma das bandas presentes na membrana BC e no EEBD seco. A técnica de UV-Vis implementada nesse estudo mostrou que a celulose bacteriana contendo 12 µg do extrato apresentou absorvância em comprimento de onda na região entre 260 e 350 nm, tal como a amostra do EEBD 12 µg/mL. Estes dados revelam a presença do extrato na membrana de BC, sugerindo a formação de um material compósito com ligações entre a celulose bacteriana e os componentes do extrato de BD, como os flavonoides.

O efeito citotóxico de membranas contendo ou não o EEBD também foi avaliado nesse estudo através do meio condicionado dessas membranas. A membrana de BC apesar de não ter expressado toxicidade contra as células HDFa, quando comparada com a membrana de BC/EEBD 12 µg teve porcentagens de viabilidade celular menores. Isto é, a membrana de BC teve sua viabilidade celular melhorada quando contendo o extrato. Os resultados desse ensaio devem levar em consideração ao fato de não haver mais a contribuição do etanol para a citotoxicidade do extrato, uma vez que o solvente foi eliminado na etapa de secagem das membranas impregnadas com o extrato a 40°C. Portanto, para fins de estudo, a citotoxicidade de membranas de BC contendo 12 mg foi avaliada. A membrana de BC/EEBD 12 mg apresentou citotoxicidade em todas as concentrações do meio condicionada testadas. Diante desses dados, nota-se que a membrana de BC foi capaz de agir como um sistema de entrega do extrato para o meio, como também o extrato de 12 µg foi capaz de melhorar a atividade biológica da membrana de celulose bacteriana enquanto o extrato de 12 mg foi citotóxico, mostrando haver uma relação dose dependente do extrato.

## 7. CONCLUSÕES

Nas presentes condições experimentais, a atividade citotóxica do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* foi observada em concentrações mais elevadas, mesmo sem a influência do etanol. Por outro lado, o EEBD12, além de não apresentar citotoxicidade, foi capaz de melhorar a viabilidade celular da BC. Nesse estudo, nenhum efeito relevante do EEBD12 foi observado no ensaio de cicatrização de feridas. No entanto, os resultados do ensaio com biofilme revelaram que o EEBD12 é um produto natural promissor com grande potencial antimicrobiano.

Considerando que o extrato também não revelou atividade mutagênica em nenhuma das concentrações testadas, os resultados suportam o uso futuro do extrato de *Baccharis dracunculifolia* em estudos mais avançados com o objetivo de desenvolver materiais bioativos que possam inibir infecções e melhorar a regeneração e a cicatrização de feridas.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDULGHANI, S.; MITCHELL, G. R. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. E750, 19 nov. 2019.

ALBUQUERQUE, E.; ALVES, E. F. Análise da produção bibliográfica sobre qualidade de vida de portadores de feridas crônicas. 1 jan. 2011.

AMORIM, W. L. et al. Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 75, p. 200–207, abr. 2009.

ANTON-SALES, I. et al. Opportunities of Bacterial Cellulose to Treat Epithelial Tissues. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 8, p. 808–822, 2019.

ASLAM KHAN, M. U. et al. Recent Advances in Biopolymeric Composite Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicines: A Review. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 619, jan. 2021.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 27–51, mar. 2005.

BARUD, H. DA S. et al. Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2013, p. 703024, 2013a.

BARUD, H. DA S. et al. Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. e703024, 9 jun. 2013b.

BARUD, H. S. et al. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. e721631, 17 abr. 2011.

BASTOS, E. M. A. F. et al. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira De Biologia**, v. 71, n. 3, p. 727–734, ago. 2011.

BEDIN, L. F. et al. Strategies to promote self-esteem, autonomy and self-care practices for people with chronic wounds. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 35, p. 61–67, set. 2014.

BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v. 97, n. 4, p. 267–281, ago. 1982.

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 403–430, 2011.

BOWERS, S.; FRANCO, E. Chronic Wounds: Evaluation and Management. **American Family Physician**, v. 101, n. 3, p. 159–166, 1 fev. 2020.

BRASIL, M. DA S. Membrana de Biocelulose no tratamento de: lesões cutâneas com perda de pele, úlceras venosas e arteriais, lesões por pressão, queimaduras de segundo grau e áreas doadoras de enxerto. 2018.

BRITO, K. K. G. DE et al. Feridas crônicas: abordagem da enfermagem na produção científica da pós-graduação. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 7, n. 2, p. 414–421, fev. 2013.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 20, p. 51–58, mar. 2007.

CAVALCANTI, L. M. et al. Efficacy of bacterial cellulose membrane for the treatment of lower limbs chronic varicose ulcers: a randomized and controlled trial. **Revista Do Colegio Brasileiro De Cirurgies**, v. 44, n. 1, p. 72–80, fev. 2017.

COSTA, P. et al. Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. **BioFactors**, v. 45, n. 3, p. 479–489, 2019a.

COSTA, P. et al. Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 45, n. 3, p. 479–489, maio 2019b.

COURTENAY, J. C. et al. Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering. **Cellulose (London, England)**, v. 24, n. 1, p. 253–267, 2017.

DA SILVA, C. M. et al. Cellular and molecular effects of *Baccharis dracunculifolia* D.C. and *Plectranthus barbatus* Andrews medicinal plant extracts on retinoid metabolism in the human hepatic stellate cell LX-2. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 222, 22 ago. 2019.

DA SILVA MONTEIRO, E. et al. Chemical and antibacterial properties of *Baccharis dracunculifolia* DC essential oils from different regions of Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 34, n. 6, p. 524–532, 2 nov. 2022.

DAHMER, D. **Obtenção de microcápsulas de extrato de *Baccharis dracunculifolia* e (1 $\rightarrow$ 6) - $\beta$ -D-glucana**. XXIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR. **Anais...**20 out. 2018. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br//sicite/sicite2018/paper/view/4018>>. Acesso em: 22 abr. 2022

DE OLIVEIRA BARUD, H. G. et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 20 nov. 2016.

DE OLIVEIRA, P. F. et al. Evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of artemillin C in V79 cells by the comet and micronucleus assays. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 7, p. 1098–1103, 2013.

DE SOUSA, R. DE S. et al. Estudo Fitoquímico Qualitativo da *Baccharis dracunculifolia* DC. **Revista do Grupo PET e Acadêmicos de Geografia da Ufac**, v. 3, n. 2, 2020.

EDWARDS, R.; HARDING, K. G. Bacteria and wound healing. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 91–96, abr. 2004.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. et al. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 655–664, 25 nov. 2013.

FIRLAR, I. et al. Functional Hydrogels for Treatment of Chronic Wounds. **Gels**, v. 8, n. 2, p. 127, fev. 2022.

FRANÇA, A. J. V. B. DU V. **O papel das cininas e a influencia do faor de necrose tumoral na proliferação in vitro de fibroblastos L929**. [s.l.] Universidade do Vale do Itajaí, 2015.

FRANCO, M. et al. **Patologia: processos gerais**. 6ª edição ed. [s.l.] Editora Atheneu, 2015.

FU, L. et al. Evaluation of bacterial nanocellulose-based uniform wound dressing for large area skin transplantation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 5, p. 2995–3000, 1 jul. 2013.

GOLDBERG, S. R.; DIEGELMANN, R. F. What Makes Wounds Chronic. **Surgical Clinics of North America**, Wound Management. v. 100, n. 4, p. 681–693, 1 ago. 2020.

GUIDO, R. V. C. et al. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofural (nitrofurazona). **Rev. ciênc. farm**, p. 319–333, 2001.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 3, p. 599–610, mar. 2017.

HOCAYEN, P. DE A. S. et al. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **INSULA Revista de Botânica**, n. 41, p. 23–31, 24 dez. 2012.

HOLL, J. et al. Chronic Diabetic Wounds and Their Treatment with Skin Substitutes. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 655, mar. 2021.

HUR, D. H. et al. Enhanced production of cellulose in *Komagataeibacter xylinus* by preventing insertion of IS element into cellulose synthesis gene. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, p. 107527, 15 abr. 2020.

IURCKEVICZ, G. et al. Encapsulated Microparticles of (1→6)-β-d-Glucan Containing Extract of *Baccharis dracunculifolia*: Production and Characterization. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2099, jan. 2019a.

IURCKEVICZ, G. et al. Encapsulated Microparticles of (1→6)-β-d-Glucan Containing Extract of *Baccharis dracunculifolia*: Production and Characterization. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2099, jan. 2019b.

JANKAU, J. et al. Bacterial Cellulose Properties Fulfilling Requirements for a Biomaterial of Choice in Reconstructive Surgery and Wound Healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2022.

KIRKUP, B. C. Bacterial Strain Diversity Within Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 1, p. 12–23, 1 jan. 2015.

KOBAL, M. B. et al. Correlating Artepillin C cytotoxic activity on HEp-2 cells with bioinspired systems of plasma membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 112, p. 110943, 1 jul. 2020.

KUMAR, V. et al. **Robbins Patologia Básica**. 8ª edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

LEAL, T. DE S. et al. Percepção de pessoas com a ferida crônica. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 11, n. 3, p. 1156–1162, mar. 2017.

LEITE, M. F. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxagatário bucal**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 4 set. 2009.

LIMA, J. DE O. [UNESP. Ação do extrato alcoólico de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) em órgãos de *Prochilodus lineatus* (curimbatá). 3 dez. 2018.

LIU, W. et al. Biomedical Applications of Bacterial Cellulose based Composite Hydrogels. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 40, p. 8319–8332, 2021.

LUPAŞCU, R. E. et al. An Overview Regarding Microbial Aspects of Production and Applications of Bacterial Cellulose. **Materials**, v. 15, n. 2, p. 676, jan. 2022.

LYNCH, C. R.; KONDIAH, P. P. D.; CHOONARA, Y. E. Advanced Strategies for Tissue Engineering in Regenerative Medicine: A Biofabrication and Biopolymer Perspective. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2518, jan. 2021.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 393–408, ago. 2003.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3–4, p. 173–215, maio 1983.

MENDONÇA, R. J. DE; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 257–262, jul. 2009.

- MOISE, A. R.; BOBIŞ, O. Baccharis dracunculifolia and Dalbergia ecastophyllum, Main Plant Sources for Bioactive Properties in Green and Red Brazilian Propolis. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1619, nov. 2020.
- MONIRI, M. et al. Production and Status of Bacterial Cellulose in Biomedical Engineering. **Nanomaterials**, v. 7, n. 9, p. 257, set. 2017.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, 20 nov. 2000.
- MUNARI, C. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of Baccharis dracunculifolia extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 22–28, 2010.
- MURPHY, P. S.; EVANS, G. R. D. Advances in wound healing: a review of current wound healing products. **Plastic Surgery International**, v. 2012, p. 190436, 2012.
- NAOMI, R.; BT HJ IDRUS, R.; FAUZI, M. B. Plant- vs. Bacterial-Derived Cellulose for Wound Healing: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 18, p. 6803, jan. 2020.
- NETO, B. D. et al. Baccharis dracunculifolia extract as a promising active for healing chronic wounds. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB**, v. 5, n. 2, p. 2–7, 1 set. 2023.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–477, 1 mar. 2007.
- O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 1 mar. 2011.
- OLIVEIRA, A. B. DE et al. In Vitro Evaluation of Photodynamic Activity of Plant Extracts from Senna Species against Microorganisms of Medical and Dental Interest. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 181, jan. 2023.
- OLIVEIRA, A. C. DE et al. Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 32, p. 194–201, 10 jun. 2019a.
- OLIVEIRA, A. C. DE et al. Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 32, p. 194–201, 10 jun. 2019b.
- OLIVEIRA, B. G. R. B. DE; CASTRO, J. B. DE A.; GRANJEIRO, J. M. Panorama epidemiológico e clínico de pacientes com feridas crônicas tratados em ambulatório. **Rev. enferm. UERJ**, p. 612–617, 2013.
- OLIVEIRA, I. V. P. DE M.; DIAS, R. V. DA C. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: FASES E FATORES DE INFLUÊNCIA. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267–271, 2012.
- OLIVEIRA, P. F. et al. In vivo antigenotoxicity of baccharin, an important constituent of Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, n. 1, p. 35–41, jul. 2011.

OLIVEIRA, R. N. et al. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 21, p. 767–779, set. 2016.

ORLANDO, I. et al. Chemical Modification of Bacterial Cellulose for the Development of an Antibacterial Wound Dressing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

PAGANELA, J. et al. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos./ Clinical approach in equine skin wounds. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v. 104, p. 13–18, 1 dez. 2009.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1, p. 296–301, 10 jun. 2008.

POPA, L. et al. Bacterial Cellulose—A Remarkable Polymer as a Source for Biomaterials Tailoring. **Materials**, v. 15, n. 3, p. 1054, jan. 2022.

PORTELA, R. et al. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 586–610, jul. 2019.

REY, F. et al. Advances in Tissue Engineering and Innovative Fabrication Techniques for 3-D-Structures: Translational Applications in Neurodegenerative Diseases. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1636, jul. 2020.

RIBEIRO, G. S. C. et al. PACIENTES INTERNADOS COM FERIDAS CRÔNICAS: UM ENFOQUE NA QUALIDADE DE VIDA. **Enfermagem em Foco**, v. 10, n. 2, 26 ago. 2019a.

RIBEIRO, G. S. C. et al. PACIENTES INTERNADOS COM FERIDAS CRÔNICAS: UM ENFOQUE NA QUALIDADE DE VIDA. **Enfermagem em Foco**, v. 10, n. 2, 26 ago. 2019b.

ROBBINS, S. L. et al. **Patologia Estrutural e Funcional - Robbins**. 6ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.

ROCHA, B. A. et al. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 87–94, 1 abr. 2012.

RODEIRO, I. et al. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 44, n. 10, p. 1707–1713, out. 2006.

RODRIGUES, D. M. et al. The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 46, n. 2, p. 150–162, 1 fev. 2020.

ROGERS, L. C.; BEVILACQUA, N. J.; ARMSTRONG, D. G. The use of marrow-derived stem cells to accelerate healing in chronic wounds. **International Wound Journal**, v. 5, n. 1, p. 20–25, 3 jan. 2008.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J. T. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells & Materials**, v. 5, p. 29–39; discussion 39–40, 30 jun. 2003.

SANTOS JÚNIOR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros**, v. 17, p. 308–317, dez. 2007.

SFORCIN, J. M. **Baccharis Dracunculifolia: Uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. 1ª edição ed. [s.l.] Editora Unesp, 2012.

SILVEIRA, F. C. A. et al. Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82, n. 2, p. 203–208, 1 mar. 2016.

SMANIOTTO, P. H. DE S. et al. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, p. 623–626, dez. 2012.

SOARES, K. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) sobre bactérias gram negativas e gram positivas. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 4, 2013.

SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Europeennes**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.

STOJKO, M.; WOLNY, D.; WŁODARCZYK, J. Nonwoven Releasing Propolis as a Potential New Wound Healing Method—A Review. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5701, jan. 2021.

SWINGLER, S. et al. Recent Advances and Applications of Bacterial Cellulose in Biomedicine. **Polymers**, v. 13, n. 3, p. 412, jan. 2021.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, n. suppl\_3, p. S311–S324, 6 jun. 2009.

TAZIMA, M. DE F. G. S.; VICENTE, Y. A. DE M. V. A.; MORIYA, T. BIOLOGIA DA FERIDA E CICATRIZAÇÃO. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 41, n. 3, p. 259–264, 30 set. 2008.

TOMAZZOLI, M. M. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Populations of *Baccharis dracunculifolia* DC. in Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, 26 mar. 2021.

TOMIC-CANIC, M. et al. Skin Microbiota and its Interplay with Wound Healing. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 21, n. Suppl 1, p. 36–43, set. 2020.



VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911–920, abr. 2017.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85–94, fev. 2005.

WALTER, M. N. M. et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 7, p. 1271–1281, 15 abr. 2010.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. **Open Biology**, v. 10, n. 9, p. 200223, 2020.

WU, S. C.; MARSTON, W.; ARMSTRONG, D. G. Wound care: the role of advanced wound-healing technologies. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 100, n. 5, p. 385–394, out. 2010.

YU, R. et al. Engineering Antimicrobial Metal–Phenolic Network Nanoparticles with High Biocompatibility for Wound Healing. **Advanced Materials**, v. 36, n. 6, p. 2307680, 2024.

ZANCANELA, D. C. et al. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours. **Materials Science and Engineering: C**, v. 97, p. 576–582, 1 abr. 2019.

ZHENG, L. et al. Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Antibacterial Materials as Wound Dressings. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

## ANEXO

- Artigo publicado

DOMINGOS NETO, B.; MEDALHA COLTURATO, V. M.; SICCI DEL LAMA, D.; DA SILVA BARUD, H.; ROSAS DA COSTA IEMMA, M. *Baccharis dracunculifolia* extract as a promising active for healing chronic wounds. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB*, Araraquara, BR, v. 5, n. 2, p. 2-7, 2023. DOI: 10.52466/ijamb.v5i2.114. Disponível em: <https://www.journalamb.com/index.php/jamb/article/view/114>

ORIGINAL ARTICLE



IJAMB

INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCES IN MEDICAL BIOTECHNOLOGY

### ***Baccharis dracunculifolia* extract as a promising active for healing chronic wounds**

B. Domingos Neto<sup>1\*</sup>; V. M. Medalha Colturato<sup>1</sup>; D. Sicci Del Lama<sup>2</sup>; H.S. Barud<sup>1</sup>; M. R. C. Iemma<sup>1</sup>

\*Corresponding author: E-mail address: [bdneto@uniara.edu.br](mailto:bdneto@uniara.edu.br)

**Abstract:** Chronic wounds are all wounds that have a difficult healing process and a delay in physiological healing repair. Such wounds are considered a public health problem, which generate high costs for health services. The *Baccharis dracunculifolia* (BD) plant, popularly known as "alecrim do campo" or "vassourinha" and widely used in folk medicine, has several biological activities, such as antibacterial and immunomodulatory activities, which may favor the wound repair process. In this context, the objective of this study is to analyze the biological activity of *Baccharis dracunculifolia* extracts regarding cytotoxicity for subsequent production of a dressing with future applications in tissue repair of chronic wounds. FTIR and TG analyzes were performed to identify functional groups and HPLC analysis to quantify certain flavonoids. The cytotoxicity capacity of the extracts was evaluated by the MTT test on fibroblasts of animal origin (L929) and human keratinocytes (Nok-1). Cytotoxicity tests revealed that the ethanolic extract of *Baccharis dracunculifolia* (EEBD) showed lower cytotoxicity for most of the concentrations tested.

**Keywords:** Wound healing. *Baccharis dracunculifolia*. Dosage biologique. Tissue engineering.

#### **Introduction**

Chronic wounds are all wounds that have a difficult healing process and a delay in the physiological repair of healing, lasting longer than six weeks<sup>1,2</sup>. These wounds can last for a long period of time and cause harm to the individual. The disabilities generated by chronic injuries to the subjects go beyond work issues, including physical limitations that are painful and make it difficult to walk<sup>3</sup>.

One should also consider the degree of psychic suffering of people with these injuries, changes in self-image and self-concept are common, leading to chronic processes of low self-esteem, in addition to the development of mood disorders and social isolation<sup>4</sup>. In this way, such wounds create embarrassment for the patient and interfere with social relationships, thus affecting the quality of life<sup>5</sup>.

Chronic wounds are considered a public health problem, which affect 5% of the adult population in the western world and generate high costs for health services, since they involve home care, prolonged hospitalization, complex treatments, and the use of adjuvant therapies, in addition to of being associated with high rates of recurrence<sup>6</sup>.

The dressing is one of the main resources for the treatment of chronic wounds. A good dressing should be able to interact effectively with the wound and facilitate the healing process by offering protection against bacterial infection, maintaining a hydrated environment, providing thermal insulation, promoting sufficient oxygen circulation,

and allowing cell migration and exudate drainage. With the advent of tissue engineering, it was possible to discover biomaterials that play a key role in creating this environment<sup>4</sup>. During tissue repair, a biomaterial alone or with active biomolecules can be implanted in the repair region to provide a favorable microenvironment for repair<sup>5</sup>.

The *Baccharis dracunculifolia* (BD) plant, popularly known as "alecrim do campo" or "vassourinha", is a native shrub widely found in southern Brazil<sup>7-8</sup>. In popular medicine, wild rosemary is used as a tea to treat fever, diabetes, detoxification of the body, cold, fatigue, intestinal problems, gastric ulcers, anemia, liver problems, improve blood circulation, among others<sup>9</sup>.

BD has already been identified as the botanical source for the production of Brazilian green propolis by *Apis mellifera* bees, through studies such as those by Park et al. (2004)<sup>10</sup>, Alencar et al. (2005)<sup>11</sup> and Rodrigues et al. (2020)<sup>12</sup> who analyzed the chemical composition of Brazilian green propolis with its probable plant source – *Baccharis dracunculifolia*. Although there are some differences between the chemical compositions of the two matrices, the plant has similar biological and medical properties to Brazilian green propolis<sup>13</sup>.

In a review study carried out in 2016 by Ramos Campos and collaborators<sup>14</sup>, 139 compounds isolated from the genus *Baccharis* (33 species) were described in studies reported in the last eleven years before publication. Among the substances found in a greater number of species are the

<sup>1</sup> University of Araraquara, UNIARA, Araraquara, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> Ciclo Farma Indústria Química Eireli, Serrana (SP).

Received 10 July 2023; Accepted 25 September 2023.

doi: <https://doi.org/10.52466/ijamb.v5i2.114>