

## PRODUÇÃO DE FILMES PARA CULTURA CELULAR 3D: MÉTODO ALTERNATIVO PARA SUBSTITUIÇÃO DE ENSAIOS *IN VIVO*<sup>1</sup>

### *PRODUCTION OF FILMS FOR 3D CELL CULTURE: ALTERNATIVE METHOD TO REPLACE IN VIVO ESSAYS*

Ingrid Rosales Costa<sup>2</sup>, Natália Zago Sentena<sup>3</sup>, Camila Medianeira da Silva D'avila<sup>4</sup>,  
Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden<sup>5</sup>, Francine Carla Cadoná<sup>6</sup>,  
Laila Daianna Soltau Missio Pinheiro<sup>7</sup> e Sergio Roberto Mortari<sup>8</sup>

#### RESUMO

Experimentos com animais em alguns casos se tornam menos reprodutíveis, principalmente pelas diferenças fisiológicas entre humanos e as outras espécies. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo produzir filmes com polímero poli(ácido láctico) (PLA), com o intuito de verificar o crescimento celular 3D sob o mesmo, para um possível método alternativo aos ensaios *in vivo*. A este filme foram incorporados óleos essenciais de lavanda e de eugenol suportados em óxido de grafeno (GO). Os filmes foram obtidos por meio de eletrospinning e o GO pelo método adaptado de Hummers, pela oxidação do grafite. O material obtido foi caracterizado pelas técnicas de difração de raios X, ângulo de contato e microscopia óptica, indicando natureza amorfa dos filmes, a adição dos óleos essenciais ao filme de PLA diminuiu o seu caráter hidrofóbico e que o GO se encontra agregado as fibras. Os ensaios *in vitro* foram realizados com a linhagem celular HT-29 (câncer colorretal). Ensaio de MTT, óxido nítrico, PicoGreen, DCFH-DA e crescimento celular foram realizados. Os resultados mostraram aumento na proliferação celular em todos os filmes testados. Os resultados são promissores, sugerindo que o filme produzido tem capacidade de proliferação com a célula HT-29, sendo um modelo alternativo promissor, em substituição aos testes com animais.

**Palavras-chave:** Proliferação celular, nanofibras, óleos essenciais, nanomateriais de carbono.

#### ABSTRACT

*Animal experiments in some cases become less reproducible, mainly because of the physiological differences between humans and other species. Thus, the present study aimed to produce poly(lactic acid) polymer (PLA) films, with the intent of verifying 3D cell growth under the polymer for a possible alternative method to in vivo assays. Lavender and eugenol essential oils supported on graphene oxide (GO) were incorporated into this film. The films were obtained by electrospinning and the GO by the method adapted from Hummers, by oxidation of graphite. The obtained material was characterized by X-ray diffraction, contact angle and optical microscopy techniques, indicating the amorphous nature of the films, that the addition of essential oils to the PLA film decreases its hydrophobic character and that the GO is found aggregated to the fibers. In vitro assays were performed with the HT-29 (colorectal cancer) cell line. MTT, nitric oxide, PicoGreen, DCFH-DA*

1 Trabalho Final de Graduação em Engenharia Biomédica - Universidade Franciscana

2 Curso de Engenharia Biomédica - Universidade Franciscana. E-mail: ingrid.costa@ufn.edu.br

3 Curso de Engenharia Biomédica - Universidade Franciscana. E-mail: natalia.zago@ufn.edu.br

4 Curso de Biomedicina - Universidade Franciscana. E-mail: camila.davila@ufn.edu.br

5 Professor do Curso de Engenharia Química - Universidade Franciscana. E-mail: cristianorbr@ufn.edu.br

6 Professora do Curso de Farmácia - Universidade Franciscana. E-mail: f.cadona@ufn.edu.br

7 Coorientadora, Doutoranda do PPG em Nanociências - Universidade Franciscana. E-mail: laillapinheiro@ufn.edu.br

8 Orientador, Professor do Curso de Engenharia Química - Universidade Franciscana. E-mail: mortari@ufn.edu.br

and cell growth assays were performed. The results obtained showed an increase in cell proliferation. There was cell growth in all films tested, thus the results are very promising, suggesting that the film produced has proliferation capacity with the HT-29 cell, being a promising alternative model, in substitution to animal tests.

**Keywords:** Cell Proliferation, nanofibers, essential oils, carbon nanomaterials.

## INTRODUÇÃO

Com o avanço da biotecnologia, foram desenvolvidas novas ferramentas e metodologias, as quais possibilitam a manipulação de moléculas de DNA, RNA e a manipulação *in vitro* de tecidos, com características semelhantes as observadas em estudos *in vivo* (HABANJAR *et al.*, 2021). Produtos biotecnológicos requerem modelos que permitam avaliar sua eficácia e segurança, antes da sua aplicação em testes clínicos. Em geral, os testes pré-clínicos envolvem os ensaios *in vitro* (cultura de células em monocamada) e modelos *in vivo* (BASKETTER *et al.*, 2012).

Os testes *in vivo*, que utilizam animais de laboratório, por vezes são inadequados uma vez que há diferenças entre as espécies. Desta preocupação, o uso de animais como modelo experimental, surge a política denominada “política dos 3Rs”: *Replacement, Reduction and Refinement*, introduzida nos anos de 1950, ressaltando a substituição, redução e refinamento nos testes *in vivo*. No intuito de encontrar métodos alternativos ao uso de animais, no Reino Unido, foi criado o *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (KNUDSEN *et al.*, 2021). Essa política levou a um aumento da conscientização ética e científica, visando reduzir e substituir o uso de animais em pesquisas. Dados de 2016 revelaram que 59% dos adultos Britânicos estavam preocupados com o uso de animais para experimentos. Nessa mesma linha de pensamento, nos Estados Unidos, em 2017 registrou-se uma alta de 44% dos adultos que se opuseram a testes biomédicos em animais (GROFF *et al.*, 2021).

Além disso, estudos demonstram que os experimentos com animais, em alguns casos, se tornam pouco reprodutíveis, devido às significativas diferenças fisiológicas entre humanos e outras espécies, os quais levantam preocupações sobre a confiabilidade nos resultados obtidos (ADRIAENS *et al.*, 2014). Sendo assim, diversos sistemas de cultura, que propõe uma abordagem mais fisiológica e complexa das células, denominados de cultura 3D, vem sendo desenvolvidos desde os seus primeiros relatos, em 1971. Nestas técnicas as células são cultivadas em moldes tridimensionais de composição variável, sustentadas mecanicamente (COSTA *et al.*, 2018). O diferencial da cultura 3D em relação ao cultivo celular convencional é a possibilidade das células explorem as 3 dimensões do espaço, aumentando assim as interações com o ambiente e entre as células. Um tecido consiste em componentes celulares e matriz extracelular, que fornece recursos físicos para suporte às células que constituem a estrutura 3D. Para isto é necessário que os modelos alternativos procurem criar um ambiente que mimetize a matriz extracelular e, conseqüentemente cause proliferação celular e diferenciação

(NAMGUNG *et al.*, 2021). Diversos materiais estão sendo utilizados para produção dos modelos alternativos, como biopolímeros naturais e sintéticos. Dependendo do tipo celular, a composição dos biomateriais podem variar, podendo, se necessário incorporar fatores de crescimento ao material, favorecendo a proliferação e a diferenciação das células cultivadas (COSTA *et al.*, 2018).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo produzir filmes para crescimento celular 3D, utilizando como polímero o poli(ácido láctico) (PLA) incorporado óleos essenciais de lavanda e de eugenol, suportados em óxido de grafeno (GO). Estes óleos diminuem o caráter hidrofóbico do polímero, favorecendo o crescimento celular. A partir dos resultados, sugerir um possível método alternativo aos ensaios *in vivo*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais e Métodos

Os materiais utilizados para a produção dos filmes foram Poli(ácido láctico) (PLA) (Purac), Clorofórmio PA (Synth), Óleo essencial de lavanda russa (Ferquima), eugenol (Sigma- Aldrich), grafite em flocos (Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico PA, 98% (Merck), ácido nítrico PA, 37% (Vetc) e nitrato de sódio PA (Merck). A água utilizada foi de alta pureza (Milliq<sup>®</sup>).

Para os ensaios *in vitro* utilizou-se linhagem celular HT-29, oriundas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas utilizando meio DMEM, contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibióticos (penicilina e estreptomicina).

### Produção Óxido de grafeno (GO)

O GO foi produzido por método modificado de Hummers (HUMMERS *et al.*, 1958). Para 1,0 g de grafite em pó foram adicionados 0,5 g de NaNO<sub>3</sub>, 10,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 30,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em banho de gelo, sob forte agitação magnética. A essa mistura foram adicionados, lentamente, 5,0 g de KMnO<sub>4</sub> mantendo a agitação por mais 10 minutos, em banho de gelo. Retirou-se o banho de gelo e manteve-se, sob agitação, por 120 minutos à 60 °C. Após, adicionou-se 100,0 mL de HCl (10%), permanecendo em agitação por mais 15 minutos. O produto obtido foi lavado com água purificada diversas vezes, até atingir pH próximo ao neutro (7,0±0,5). Seco em estufa e armazenado em frascos de polipropileno.

### Produção dos filmes de PLA e óleo essencial

Os filmes foram produzidos pela técnica de eletrofiação, que consiste na produção de fibras com diâmetro em escala nanométrica, proporcionando um material com alta porosidade e funcionalidade.

Para esta técnica utilizou-se a eletrofição vertical (figura 1). Inicialmente foram pesados 0,8g de PLA para 8,0 mL de clorofórmio, mantido em agitação constante a 50 °C durante 40 minutos. Foram produzidos filmes com PLA apenas, PLA + GO, PLA + óleo essencial e PLA + GO + Óleo Essencial. Para os filmes contendo os óleos, adicionou-se 1,0% dos óleos essenciais de lavanda e eugenol (Tabela 1) mantendo-se em agitação por mais 5 minutos.

**Tabela 1** - Volume de óleo essencial adicionado aos filmes de PLA.

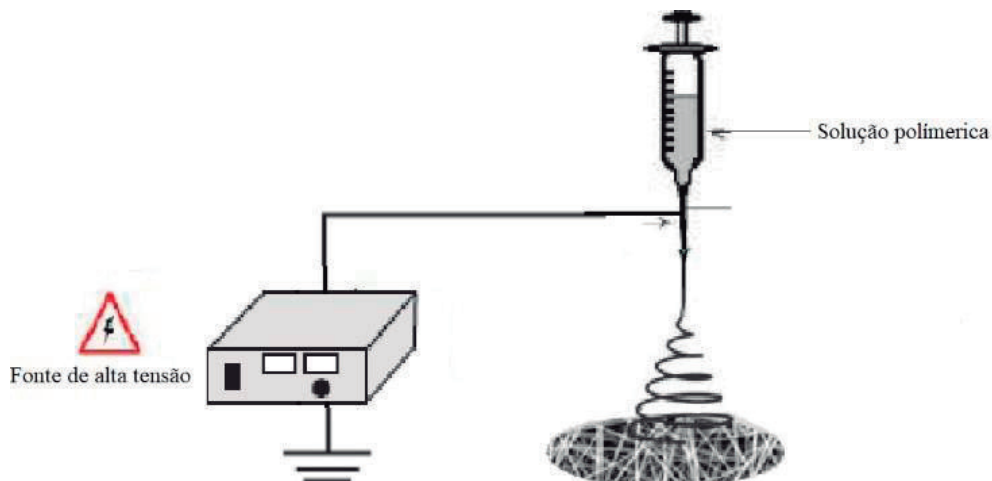
Filme	Óleo de Lavanda (µL)	Eugenol (µL)
1	20	60
2	40	40
3	60	20

Para a eletrofição utilizou-se uma seringa com capacidade de 10,0 mL e agulha com dimensões de 120x40 mm, conectada ao equipamento numa tensão de 10,0 kv a 10 cm de distância do alvo, com rotações de 500 rpm (figura 1). O tempo médio para produção dos filmes foi de 2 horas cada.

### Incorporação do GO aos filmes

A incorporação do GO aos filmes se deu pelo método de imersão. Foram pesados 10,0 mg de GO para 10,0 mL de água destilada e dispersos por radiação ultrassônica (banho) por 15 minutos. Com o GO disperso o mesmo foi colocado em uma placa de petri, onde os filmes foram imergidos (figura 2), permanecendo por 2 horas, retirados e secos em dessecador. Por fim as amostras obtidas foram denominadas em: P1 sendo a amostra branca contendo apenas o polímero, P2 contendo polímero + GO, amostras 1, 2 e 3 contendo polímero + óleo essencial e amostras 1G, 2G e 3G contendo polímero + óleo essencial + GO, com concentrações de óleo essencial apresentadas na tabela 1.

**Figura 1** - Diagrama esquemático de um sistema de eletrofição, Tensão aplicada de 10 KV, 500 rpm.



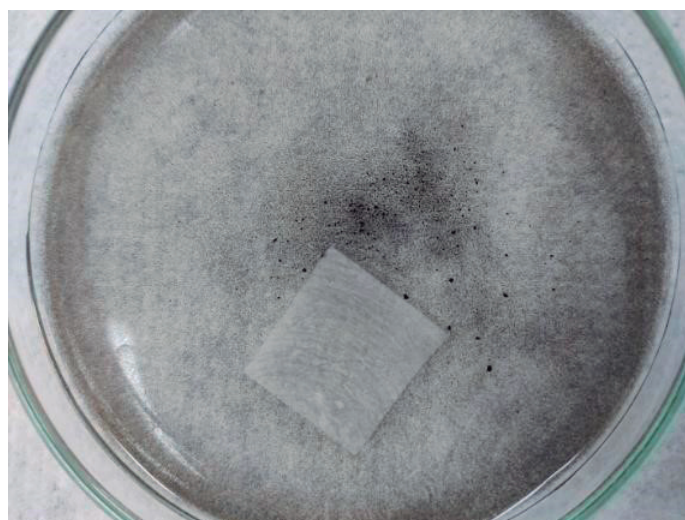
Fonte: Construção da autora

Os filmes obtidos foram cortados em diferentes tamanhos, de acordo com a caracterização e ensaios a serem realizados (tabela 2).

**Tabela 2** - Dimensões dos filmes conforme o ensaio de caracterização.

Tamanho (cm)	Ensaio de caracterização
1x1	DRX e ângulo de contato
2x2	Condutividade elétrica e incorporação do GO
0,5x0,5	Ensaio <i>in vitro</i>

**Figura 2** - Imersão de GO ao filme de PLA



Fonte: Autoral

## Caracterizações dos Filmes Produzidos

### *Difração de raios X (DRX)*

Esta técnica foi utilizada para investigar as estruturas cristalinas presentes nos filmes. Ao incidir um feixe de raios X em um cristal, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração. Esta caracterização foi realizada utilizando o equipamento *Buker D2 Advance*, com tubo de cobre, tensão e corrente de 30,0 kV e 30,0 mA, respectivamente. Velocidade de varredura de 0,1 %/s num intervalo de 5° - 80°.

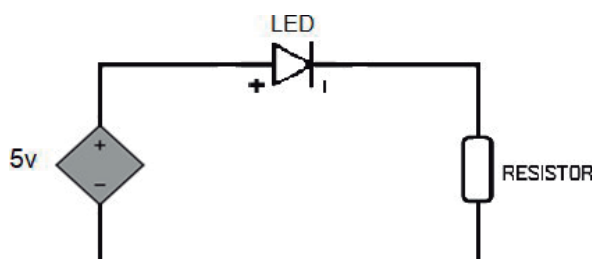
### *Microscopia óptica*

A microscopia óptica foi realizada utilizando o microscópio Zeiss Primo Star, com lente objetiva de 100 x e foi utilizado para verificar a morfologia das fibras no filme, assim como a presença do GO decorando o filme.

### Condutividade Eletrônica

O teste de condutividade eletrônica foi fundamental para determinar se o material é condutor, semicondutor ou isolante. O teste foi realizado nos filmes e no GO separadamente, em forma de pastilha. As pastilhas foram obtidas por prensagem, onde 20,0 mg de GO foram submetidos a uma carga de 3,0 toneladas por 2 minutos. Para o teste de condutividade foi utilizada uma fonte de tensão alimentada a 5,0 V, um LED e as amostras utilizadas como resistor para o circuito (Figura 3). Quando o material for condutor o LED do circuito acende. Neste circuito, o positivo da fonte foi conectado ao LED e o negativo ao resistor (amostra). O circuito foi fechado sendo conectado a outra ponta do resistor ao negativo da fonte.

**Figura 3** - Circuito condutividade eletrônica. Tensão de 5 V.



Fonte: Construção da autora

### Ângulo de Contato

O ângulo de contato é a capacidade de molhamento da amostra, e se refere ao ângulo que forma a superfície de um líquido ao entrar em contato com um sólido. Em cada superfície é possível obter-se um valor de ângulo, considerando a superfície hidrofílica ( $<90^\circ$ ), hidrofóbica ( $90^\circ < 150^\circ$ ) ou super hidrofóbicas ( $>150^\circ$ ) (LIMA., *et al.* 2021). A medida do ângulo de contato foi realizada gotando 5,0  $\mu\text{L}$  de água destilada na superfície dos filmes e então o ângulo foi medido, utilizando um aplicativo de livre acesso, denominado “Angulus”.

### Ensaio *in vitro*

Para os ensaios *in vitro* utilizou-se a linhagem celular HT-29, uma célula de câncer colorretal. Realizou-se os ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio (MTT), Pico-Green, Óxido nítrico, 2,7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) e a verificação de crescimento celular ao filme. Inicialmente os filmes foram submetidos a esterilização por luz ultravioleta por 30,0 minutos (15,0 minutos cada lado). Após, as células foram preparadas para o início dos ensaios, para isto foi retirado o meio de cultura (DMEM) presente na garrafa de células, pipetados tampão

PBS homogeneizados e descartados, para remoção de possíveis interferências presentes nas amostras. Adicionou-se 6,0 mL da enzima Tripsina, incubado em estufa a 37°C por 5,0 minutos. Em seguida o conteúdo foi passado a um tubo cônico de 15,0 mL e completados com o meio de cultura, centrifugado por 5,0 minutos a 1500 rpm. Logo, foi retirado o sobrenadante presente no tubo e adicionado 1,0 mL do meio de cultura e homogeneizados com o auxílio de uma pipeta. Em seguida foi realizada a contagem de células. Para isto foram adicionados em um microtubo 900,0 µL de PBS e 10,0 µL da solução anterior e homogeneizados. Utilizou-se 10,0 µL desta solução e foram adicionados 10,0 µL do corante Trypan, onde foram pipetados em lâmina específica para contagem de células. No microscópio, com objetiva de 10x, as células foram quantificadas em cada quadrante (quatro quadrantes no total). Realizada a contagem das células foi feito o cálculo do rendimento celular, a fim de verificar as células/mL utilizadas nos ensaios. De acordo com os cálculos o total de células plaqueadas na densidade celular foi de  $2,2 \times 10^4$  células/mL, que foram pipetados em uma placa de 12 poços e depositados os filmes, incubados a 37°C por 72 horas.

### *Ensaio PicoGreen*

O *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent* (Invitrogen®) conhecido apenas por PicoGreen, é um reagente fluorescente ultrasensível para a quantificação de duplas fitas de DNA em solução, o qual pode detectar concentrações ínfimas de DNA de até 25,0 pg/mL. Essa técnica pode ser utilizada para a quantificação do DNA liberado no meio devido a apoptose celular, com o objetivo de detectar citotoxicidade. Para este ensaio pipetou-se 80,0 µL do tampão TE 1X e homogeneizado com 10,0 µL do sobrenadante presente na placa, após foram adicionados 10,0 µL do reagente PicoGreen e incubado a temperatura ambiente durante 5,0 minutos e realizada a leitura no espectrofotômetro/fluorímetro nos seguintes comprimentos de onda: 480,0 nm de excitação e 520,0 nm de emissão.

### *Óxido nítrico (NO)*

O teste de NO detecta a presença de nitrito orgânico na amostra que é detectado e analisado pela formação de uma coloração rosada, quando o reagente de Griess é adicionado à amostra contendo NO<sub>2</sub>. A componente sulfanilamida do reagente de Griess é responsável pela formação de sais de diazônio a partir do nitrito da amostra. Quando o azo-composto (N-1- naftiletilenodiamino-bicloridrato) interage com os sais de diazônio, surge então uma coloração rosada na amostra (NOH *et al.*, 2015). Para este ensaio transferiu-se 100,0 µL do sobrenadante à uma placa de 96,0 poços, adicionando 100,0 µL do reagente Griess, onde foram incubados a temperatura ambiente durante 15,0 minutos, e feita a medição de absorbância por espectrofotometria utilizando 540,0 nm como comprimento de onda.

### *2,7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)*

O ensaio DCFH-DA baseia-se na capacidade desta substância ser desacetilada por esterases citosólicas para diclorodihidrofluoresceína (DCFH), produto não fluorescente, que por sua vez, é convertido por espécies reativas para diclorofluoresceína (DCF) podendo ser visualizadas por forte fluorescência a 525,0 nm quando excitada a 488,0 nm. Este ensaio é comumente utilizado para ver o conteúdo de espécies reativas (mais sensível para peróxido de hidrogênio) que será diretamente proporcional à intensidade da fluorescência, que fornece uma medida indireta da taxa total de espécies reativas (ESPOSTI *et al.*, 2002; HALLIELL & WHITEMAN, 2004). O reagente utilizado neste ensaio, a DCFH-DA é uma sonda não fluorescente que atravessa facilmente a membrana celular, permitindo assim, a efetivação do ensaio (BASS *et al.*, 1983). Pipetou-se em uma placa de 96,0 poços 50,0 µL da amostra e 65 µL do tampão TRIS/HCl pH 7,4, após foram pipetados 10,0 µL de DCFH-DA, incubados durante 1,0 hora em temperatura ambiente e em seguida realizada a leitura no espectrofluorímetro utilizando os seguintes comprimentos de onda: 525,0 nm de emissão e 488,0 nm de excitação.

### *Ensaio Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)*

No ensaio de MTT, o sal de tetrazolium, hidrossolúvel e de coloração amarelada, é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pela atividade da enzima succinato desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto denominado formazan, insolúvel em água e de coloração roxo-azulado, que fica armazenado no citoplasma celular, sendo posteriormente solubilizado, pela adição do DMSO (dimetilsulfóxido) e quantificado colorimetricamente, por meio de espectrofotometria (FUKUI *et al.*, 2010). Para este ensaio pipetou-se 100,0 µL da suspensão celular (cultivo lavado com PBS para remoção do tratamento), após foram adicionados 10,0 µL da solução de MTT. Após foi realizada a leitura por meio da espectrofotometria, no comprimento de onda de 570 nm.

### *Crescimento celular*

Para verificação do crescimento celular ao filme, os mesmos foram submetidos ao ensaio violeta, o qual irá corar as células presentes no filme, permitindo a verificação do crescimento celular. Para isto foi retirado o sobrenadante presente na placa, lavado com 1,0 mL de tampão PBS e adicionado 1,0 mL do reagente violeta e incubadas por 30,0 minutos. Retirou-se o restante de violeta e lavou-se novamente com PBS. Após o ensaio violeta foi possível identificar se houve o crescimento celular aos filmes.

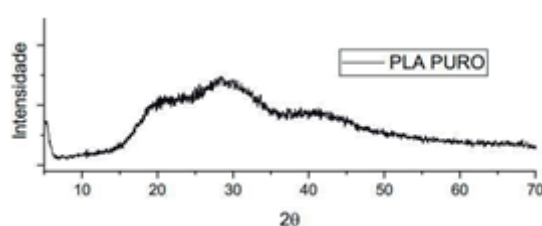


## Resultados e Discussões

### Difração de raios X (DRX)

Os resultados obtidos por DRX indicaram que os filmes apresentaram natureza amorfa (Figura 4), visto que o difratograma de Raios X não apresentou picos de difração. Conforme também reportado por SANTOS *et al.*, 2013. Esperava-se visualizar um pico 11°, característico de GO. Acredita-se que pela imersão do filme na água, o caráter hidrofóbico do polímero não tenha possibilitado incorporar quantidades significativas de GO, detectáveis na técnica de DRX.

**Figura 4** - Difratograma de Raio X do polímero PLA, Tubo de Cobre.

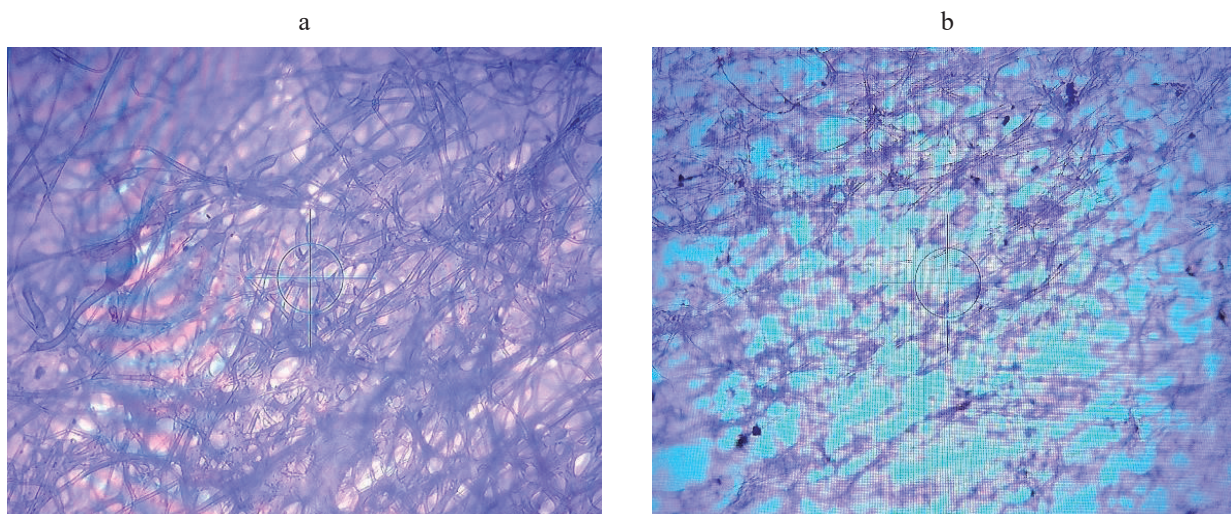


Fonte: Autoral

### Microscopia óptica

Pelas imagens verifica-se a morfologia das fibras obtida, fios longos e entrelaçados formando um agregado (Figura 5a). Na microscopia do filme P2 (Figura 5b), foi possível verificar o GO agregado as fibras, pontos escuros, comprovando sua presença.

**Figura 5** - Imagens de microscopia óptica, objetiva 100x. a) Filme PLA puro b) Filme de PLA contendo GO



Fonte: Autoral.

## Condutividade Eletrônica

As medidas de condutividade eletrônica mostraram que o GO é um material condutor. Já os filmes de PLA, apresentaram comportamento isolante. Para os demais filmes avaliados e produzidos, acredita-se que as fibras de PLA envolveram as partículas de GO, mantendo o comportamento isolante.

## Ângulo de Contato

De acordo com os resultados foi possível identificar, nos filmes brancos (apenas o polímero), o caráter hidrofóbico do PLA. Os filmes contendo óleo essencial e GO, pelo ângulo de contato obtido, menor que 90°, mostra que a adição dos óleos essenciais ao filme de PLA diminui seu caráter hidrofóbico, sendo este um resultado promissor, pois facilita a imersão do GO ao filme. (Tabela 3).

**Tabela 3** - Resultados Ângulo de contatos dos filmes poliméricos. Aplicativo “Angulus”.

Filme	0 min	1 min
P1	90° ± 0,2	90° ± 0,1
P2	78° ± 1,7	71° ± 1,5
1	80° ± 2,9	79° ± 0,5
1G	74° ± 0,8	73° ± 0,6
2	86° ± 2,0	84° ± 1,2
2G	73° ± 1,9	70° ± 2,0
3	81° ± 2,7	75° ± 2,8
3G	77° ± 1,7	72° ± 2,7

P1 = PLA; P2 = PLA+GO; 1, 2 e 3 = PLA+óleo essencial; 1G, 2G e 3G = PLA+óleo essencial+GO

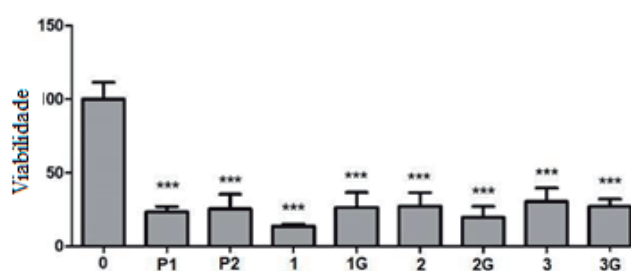
Fonte: Construção da autora

## Ensaio in vitro

### *PicoGreen*

Com os resultados obtidos foi possível identificar, por meio do controle, que houve uma diminuição de DNA livre presente na placa, o que remete que os filmes não apresentaram citotoxicidade (Figura 6).

**Figura 6** - Resultados do ensaio PicoGreen. Os dados são mostrados como intensidade de absorbância do grupo controle. (\*) indicam diferenças estatísticas entre tratamento e controle celular.

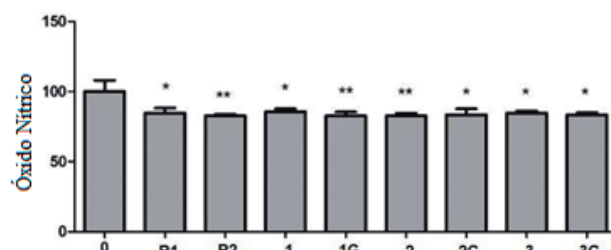


P1 = PLA; P2 = PLA+GO; 1, 2 e 3 = PLA+óleo essencial; 1G, 2G e 3G = PLA+óleo essencial+GO

## Óxido Nítrico (NO)

Com o ensaio de NO é possível avaliar o potencial anti-inflamatório, sendo avaliada através da inibição de NO. Os resultados obtidos por meio do ensaio (Figura 7) foi possível identificar, em relação ao controle que as amostras diminuíram os níveis de NO, ou seja, inibiu a produção deste gás.

**Figura 7** - Resultados óxido nítrico. Os dados são mostrados como intensidade de absorbância do grupo controle. (\*) indicam diferenças estatísticas entre tratamento e controle celular

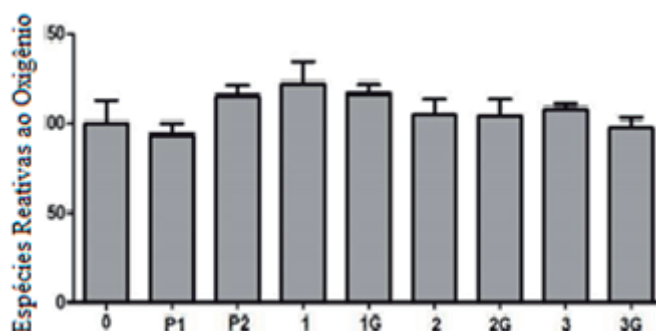


P1 = PLA; P2 = PLA+GO; 1, 2 e 3 = PLA+óleo essencial; 1G, 2G e 3G = PLA+óleo essencial+GO

## 2,7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)

Com base nos resultados obtidos foi possível identificar que não houve diferença estatística significativa nas amostras em relação ao controle, ou seja, não houve alteração na EROs. Assim, não se verificou atividade antioxidante (Figura 8) dos filmes.

**Figura 8** - Resultados do Ensaio de DCFH-DA. Os dados são mostrados como intensidade de absorbância do grupo controle. (\*) indicam diferenças estatísticas entre tratamento e controle celular.

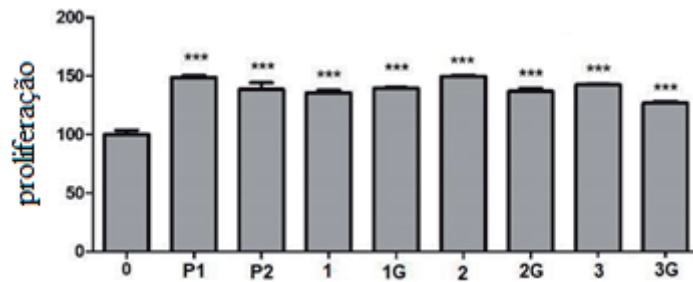


P1 = PLA; P2 = PLA+GO; 1, 2 e 3 = PLA+óleo essencial; 1G, 2G e 3G = PLA+óleo essencial+GO

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

Para a determinação de segurança dos filmes, foi avaliado a viabilidade celular. De acordo com os resultados obtidos houve proliferação celular em todas as amostras testadas, sendo um resultado promissor para o crescimento celular ao filme (Figura 9), objetivo do trabalho.

**Figura 9** - Resultados do ensaio MTT. Os dados são mostrados como intensidade de absorbância do grupo controle. (\*) indicam diferenças estatísticas entre tratamento e controle celular.

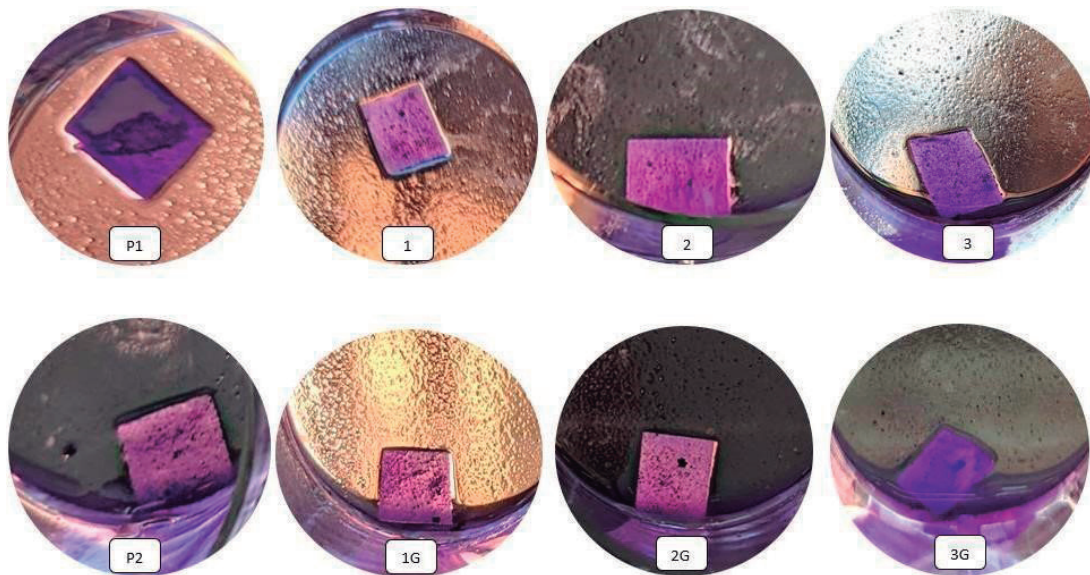


P1 = PLA; P2 = PLA+GO; 1, 2 e 3 = PLA+óleo essencial; 1G, 2G e 3G = PLA+óleo essencial+GO

### *Crescimento celular*

Os resultados mostram o crescimento celular em todos os filmes testados, com um menor crescimento percebido nos filmes P1, 2 e 3G (Figura 10). A partir disto, acredita-se que os filmes produzidos são promissores para cultura celular 3D.

**Figura 10** - Proliferação celular nos filmes



P1 = PLA; P2 = PLA+GO; 1, 2 e 3 = PLA+óleo essencial; 1G, 2G e 3G = PLA+óleo essencial+GO

Fonte: Autoral

## CONCLUSÃO

Os filmes produzidos por meio da eletrofição proporcionaram bons resultados, sendo capazes de manter os óleos essenciais, identificável pelo odor característico. Em relação as caracterizações obtidas, foi possível perceber que a imersão do GO ao filme, em água destilada é pouco eficaz devido a hidrofobia do polímero utilizado, comprovada por meio do ensaio de ângulo de contato. Contudo, apesar de sua hidrofobia, foi possível identificar que as fibras proporcionadas pela eletrofição e a

união dos óleos essenciais ao filme, possibilitou uma melhor imersão do GO. Em relação aos ensaios *in vitro*, os resultados foram bastante promissores, sugerindo que o filme produzido tem capacidade de proliferação com a linhagem celular HT-29 e de crescimento celular. Isto abre caminho para avançar na utilização destes filmes como modelo alternativo aos testes *in vivo*. Além disso, nenhuma amostra causou citotoxicidade e nem diminuição da viabilidade celular, o que possibilitou o crescimento celular sobre o filme. Como perspectivas futuras serão realizados ensaios com linhagem de célula saudável (fibroblastos L929), e a verificação de matriz extracelular e diferenciação celular, a fim de comprovar então sua utilização como modelo alternativo aos ensaios *in vivo*.

## AGRADECIMENTOS

FAPERGS, CNPq, UFN.

## REFERÊNCIAS

ADRIAENS, E. *et al.* Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the *in vivo* endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of *in vitro* test methods. **Archives of toxicology**, v. 88, n. 3, p. 701-723, 2014. DOI: 10.1007/s00204-013-1156-8

BASKETTER, D. *et al.* A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing. **ALTEX-Alternative to animal experimentation**, v. 29, n. 1, p. 3- 91, 2012. DOI: 10.14573/altex.2012.1.003.

BASS, D. A. *et al.* Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology**. v. 130, n 4, p. 1910- 1917, 1983.

COSTA, M.C. *et al.* Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o *in vitro* do *in vivo*. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 6, n. 1, p. 72-83, 2018.

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 335-340, 2 abr. 2002.

FUKUI M, YAMABE N, ZHU B T. Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo*. **Eur J Cancer**. v. 46, n. 10, p. 1882-1891, 2010. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.02.004.

GROFF, Katherine *et al.* In vitro and integrated in vivo strategies to reduce animal use in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 36, n. 6, p. 389-400, 2021. DOI: 10.1093/mutage/geab035.

HA, T.T.N. *et al.* Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. **PloS one**, v. 6, n. 10, e25969, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025969.

HABANJAR, O. *et al.* 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12200, 2021. DOI: 10.3390/ijms222212200.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705776.

HUMMERS, William S.; OFFEMAN, Richard E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958.

KNUDSEN, L.E.; RITSKES. H.M. Alternatives: Refinement, reduction, and replacement of animal uses in the life sciences. In: **Handbook of Laboratory Animal Science**. CRC Press, 2021. p. 23-38.

LIMA, E.P.N. *et al.* Influência da espessura nas propriedades mecânicas, ângulo de contato, absorção e perda em água de membranas derivadas do látex natural. **Matéria (Rio de Janeiro)**, [S.L.], v. 26, n. 4, 2021. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620210004.1377>.

NAMGUNG, B. *et al.* Engineered cell-laden alginate microparticles for 3D culture. **Biochemical Society Transactions**, v. 49, n. 2, p. 761-773, 2021. DOI: 10.1042/BST20200673.

NOH, H.J. *et al.* Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu. **Journal of ethnopharmacology**, v. 163, p. 106-112, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2015.01.024.

SANTOS, F.A.; TAVARES, M.I B. Preparo e caracterização de filmes obtidos a partir de poli (ácido láctico) e celulose microcristalina. **Polímeros**, v. 23, p. 229-235, 2013. <https://doi.org/10.4322/S0104-14282013005000021>.