

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Laurent Rodrigues Rezende

***Gustavia augusta*: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS
EXTRATOS ORGÂNICOS EM LINHAGEM VERO**

São Bernardo do Campo,

Julho de 2023

LAURENT RODRIGUES REZENDE

***Gustavia augusta*: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS
EXTRATOS ORGÂNICOS EM LINHAGEM VERO**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao curso de graduação em
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do ABC, como
requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane
Bertachini Lombello

São Bernardo do Campo,

Julho de 2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rezende, Laurent Rodrigues

Gustavia augusta : AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS
EXTRATOS ORGÂNICOS EM LINHAGEM VERO / Laurent Rodrigues
Rezende. — 2023.

24 fls. : il.

Orientadora: Christiane Bertachini Lombello

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC,
Bacharelado em Ciências Biológicas, São bernardo do Campo, 2023.

1. MTT. 2. Azul de Tripan. 3. Engenharia de Tecidos. 4. Regeneração
Tecidual. 5. Viabilidade Celular. I. Lombello, Christiane Bertachini. II.
Bacharelado em Ciências Biológicas, 2023. III. Título.

RESUMO

A Engenharia de Tecidos utiliza conhecimentos interdisciplinares em Engenharia e Ciências da Vida na busca pelo desenvolvimento de substitutos biológicos e técnicas que permitam a regeneração dos tecidos biológicos. Nesse sentido, o desenvolvimento de biomateriais e compostos requer que sejam avaliadas os tipos celulares do tecido de interesse, as interações célula-matriz, mecanismos de transdução, a diferenciação celular entre outros fatores. Um dos requisitos básicos inerentes à aplicação de compostos na Engenharia Biomédica é a biocompatibilidade: o material de interesse não pode se apresentar tóxico ou desencadear processos alérgicos ou danosos ao tecido. Esses biomateriais podem ter origem sintética ou natural: as plantas vêm sendo utilizadas com fins medicinais pela humanidade há pelo menos 50.000 anos. O território brasileiro é um dos mais ricos em biodiversidade e possui muitas espécies com potencial farmacológico, como a *Gustavia augusta*, árvore nativa da família Lecythidaceae. Esta vem apresentando características de interesse, como potencial anti-inflamatório, antioxidante e antitumoral. A realização de diferentes testes quantitativos de viabilidade celular com os extratos orgânicos (etanólico e metanólico), baseados em diferentes critérios para estimar o grau de citotoxicidade, visa complementar os estudos já realizados, descrevendo os padrões de citotoxicidade apresentados de forma quantitativa. Das quatro análises quantitativas empregadas em linhagem celular Vero (MTT, cristal violeta, azul de trypan e vermelho neutro), três demonstraram citotoxicidade relevante para os extratos de *G. augusta* a partir de 50 ug/mL, com viabilidade inferior a 70%. Ainda, o extrato etanólico apresentou citotoxicidade mais acentuada em comparação aos demais, apresentando o menor valor de LD₅₀, o que sugere uma afinidade apolar dos compostos citotóxicos. O perfil de citotoxicidade extratos pode direcionar a segurança de aplicações clínicas, como utilização em emplastos, curativos ou a sua incorporação como fatores de indução junto à biomateriais, visando regeneração tecidual.

Palavras Chave: citotoxicidade; azul de tripan; cristal violeta; MTT; vermelho neutro; *regeneração tecidual*; viabilidade celular.

ABSTRACT

Tissue Engineering uses interdisciplinary knowledge in Engineering and Life Sciences in the search for the development of biological substitutes and techniques that allow the regeneration of biological tissues. In this sense, the development of biomaterials and compounds requires that the cell types of the tissue of interest, cell-matrix interactions, transduction mechanisms, cell differentiation, among other factors, be evaluated. One of the basic requirements inherent to the application of compounds in Biomedical Engineering is biocompatibility: the material of interest cannot be toxic or trigger allergic or tissue-damaging processes. Biomaterials can be of synthetic or natural origin: plants have been used for medicinal purposes by mankind for at least 50,000 years. The Brazilian territory is one of the richest in biodiversity and has many species with pharmacological potential, such as *Gustavia augusta*, a native tree of the Lecythidaceae family. This has been showing characteristics of interest, such as anti-inflammatory, antioxidant and antitumor potential. Carrying out different quantitative tests of cell viability with organic extracts (ethanolic and methanolic), based on different criteria to estimate the degree of cytotoxicity, aims to complement the studies already carried out, describing the cytotoxicity patterns presented in a quantitative way. Of the four quantitative analysis used in Vero cell lines (MTT, crystal violet, trypan blue and neutral red), three showed relevant cytotoxicity for *G. augusta* extracts from 50 ug/mL, with viability lower than 70%. Furthermore, the ethanolic extract showed more pronounced cytotoxicity compared to the others, with the lowest LD₅₀ value, which suggests a non-polar affinity of the cytotoxic compounds. The cytotoxicity profile of extracts can guide the safety of clinical applications, such as use in plasters, dressings or incorporation into biomaterials aiming at tissue regeneration.

Palavras Chave: cytotoxicity; trypan blue; crystal violet; MTT; neutral red; *tissue regeneration*; cell viability.

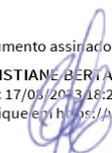
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1. <i>Gustavia augusta</i>	6
1.2. Ensaio in vitro: análises morfológicas e quantitativas	7
1.3. Metabólitos secundários e extratos orgânicos	10
2. OBJETIVOS	12
3. METODOLOGIA	12
3.1. Cultura de células Vero	12
3.2. Obtenção dos extratos de <i>Gustavia augusta</i>	12
3.3. Ensaio de exclusão do azul de tripan	13
3.4. Ensaio de coloração por cristal violeta	13
3.5. Ensaio de redução do MTT	13
3.6. Ensaio de retenção do vermelho neutro	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Análise qualitativa da morfologia celular.	14
4.2. Análises quantitativas da citotoxicidade	16
4.2.1. Exclusão do azul de tripan	16
4.2.2. Coloração com cristal violeta	17
4.2.3. Redução do MTT	17
4.2.4. Retenção do vermelho neutro	18
4.3. Comparativo entre metodologias	19
4.4. Comparativo entre extratos	20
5. CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS	23

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

No dia **09 de agosto de 2023**, em uma sessão remota de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), a Banca Examinadora para avaliação do TCC em Ciências Biológicas da UFABC foi instalada pelo(a) **Profa. Dra. Christiane Bertachini Lombello**. Estiveram presentes professores, alunos e visitantes. A banca examinadora foi constituída pelos membros **Dra. Mônica Helena Monteiro do Nascimento** (membro Titular), **Profa. Dra. Elizabeth Teodorov** (membro Titular) e o **Profa. Dra. Christiane Bertachini Lombello** (Orientador) da monografia a quem coube a presidência dos trabalhos. Às **18:00** horas, a banca iniciou seus trabalhos, convidando o aluno **Laurent Rodrigues Rezende** a fazer a apresentação da monografia intitulada *“GUSTAVIA AUGUSTA: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS ORGÂNICOS EM LINHAGEM VERO”*. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Em seguida, os membros reuniram-se para a apreciação do desempenho do estudante. Após a avaliação, os membros presentes da Banca Examinadora decidiram por sua aprovação (aprovação/reprovação), com conceito A.

Santo André, 09 de agosto de 2023.

Documento assinado digitalmente

gov.br CHRISTIANE BERTACHINI LOMBELLO
Data: 17/08/2023 16:26:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Christiane Bertachini Lombello (Presidente e orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br MONICA HELENA MONTEIRO DO NASCIMEI
Data: 17/08/2023 16:41:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Mônica Helena Monteiro do Nascimento (Titular)

Documento assinado digitalmente
gov.br ELIZABETH TEODOROV
Data: 10/08/2023 14:56:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

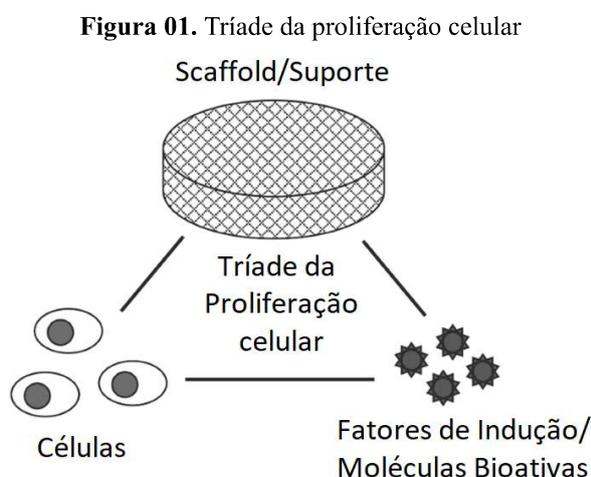
Profa. Dra. Elizabeth Teodorov (Titular)

1. INTRODUÇÃO

A Engenharia de Tecidos é uma área de pesquisa que se baseia na interdisciplinaridade dos conhecimentos de engenharia e de ciências da vida, para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam recuperar, manter ou melhorar a função de determinado tecido^{[1],[2]}. Para tanto, se estudam as relações entre célula e matriz extracelular, para o desenvolvimento de biomateriais que sejam compatíveis com os diversos sinais moleculares inerentes aos processos celulares^{[1]-[6]}. É estudada, ainda, a inserção de moléculas indutoras de respostas ou de células progenitoras, visando a promoção ou direcionamento correto da restauração tecidual.

Assim, a restauração tecidual requer atenção para diversos fatores, dentre eles a biocompatibilidade do material a ser implantado, que não pode acarretar em respostas tóxicas, alergênicas ou imunológicas no organismo do receptor^{[1],[2]}. A ISO 10993-1 (2009) trata das diretrizes relacionadas aos materiais e sua biocompatibilidade, estabelecendo diversos testes a serem realizados a fim de que garantir a segurança e os efeitos biológicos do material: citotoxicidade, toxicidade aguda, compatibilidade hematológica, entre outros.

Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas regenerativas varia de acordo com cada tecido específico, sendo avaliados sua matriz extracelular, os tipos celulares envolvidos, seus mecanismos de transdução de sinal e de força mecânica^{[1]-[3]}. São consideradas as relações célula-matriz, buscando a produção de biomateriais compatíveis aos diversos sinais moleculares inerentes aos processos celulares^{[1]-[4]}. A partir da síntese de um biomaterial adequado, pode-se produzir arcabouços com topografia e propriedades voltadas para o crescimento e diferenciação celular^{[1]-[3]}. É estudada, ainda, a inserção de moléculas indutoras de respostas ou de células progenitoras, visando a promoção ou direcionamento correto da restauração tecidual^{[5],[6]} (Fig. 01).



Fonte: Adaptado de Shimojo, A.A.M, *et. al.*

Os arcabouços são um substitutos biológico capaz de proporcionar um superfície de apoio mecânico, que seja adequado às células do hospedeiro (histocondução), possibilitar um ambiente bioquímico apropriado ao organismo (histoindução), e favorecer o desenvolvimento de células progenitoras (histogênese)^[5]. Essas estruturas fornecem o suporte tridimensional para as células do tecido a ser regenerado, permitindo as interações célula-matriz e fornecendo as características físico-química (polaridade, pH, resistência mecânica e elasticidade, entre outros). Ainda, para que o tecido se restabeleça no final do processo regenerativo é preferível que esse biomaterial seja bioabsorvível pelo organismo do hospedeiro^[1-6].

Já os fatores de indução, visam conduzir a correta replicação ou diferenciação celular, através de sinais bioquímicos de liberação controlada. Geralmente, esses fatores são associados ao arcabouços, e podem desempenhar o papel de evitar respostas oxidativas e inflamatórias ou antibióticas^[5,6]. A correta regeneração tecidual deve restabelecer a função do tecido, e isso envolve evitar o processo de cicatrização por colágeno I, resultante de respostas inflamatórias que promovem a fibrose tecidual^[4-6].

Esses arcabouços ou fatores de indução podem ser tanto de origem sintética quanto natural, ou derivado de origens naturais. Sabe-se que a utilização de plantas com finalidades terapêuticas e curativas pela humanidade é datada de 50.000 anos^[7]. Ainda hoje, estas espécies representam grande importância no desenvolvimento de fármacos ou compostos de interesses médicos sendo amplamente empregada na Engenharia de Tecidos. O Brasil, como detentor da maior parcela da biodiversidade mundial^[7], possui um enorme potencial natural para a seleção e desenvolvimentos de novos produtos para a área da Saúde^[7-13]. Com isso, cresce a importância de estudos que verifiquem o potencial terapêutico dos representantes da vasta biodiversidade do nosso país, e a avaliação da citotoxicidade de extratos vegetais é a primeira etapa para um *screening* da aplicabilidade dessas moléculas visando regeneração tecidual.

A cultura popular brasileira é fortemente ligada ao uso de remédios caseiros como extratos, chás e emplastos^[9,10], sendo um importante indicativo do potencial de interesse das espécies vegetais. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconhece esse potencial farmacológico, e propõe a execução de estudos *in vivo* e *in vitro* a fim de comprovar a eficácia e segurança dos compostos naturais, empregando o conhecimento e a cultura popular no desenvolvimento científico.

1.1. *Gustavia augusta*

A *Gustavia augusta*, nome popular Jeniparana, é uma espécie arbórea da família Lecythidaceae, distribuída amplamente em todo o Brasil^[11]. Chega a 22 metros de altura, com copa em formato piramidal e com tronco de 20 a 30 cm de diâmetro. De filotaxia alterna simples, tem folhas glabras com pinas de até 45 cm de comprimento. Apresenta inflorescência terminal com até 8 flores,

vistas, de coloração branco-róseo pubescentes. Os frutos são globosos, de 3 a 7 cm de diâmetro, com sementes esféricas^[11-13] (Fig.02).

Fig. 02. *Gustavia augusta*, caule (esq.) e detalhe da flor (dir.).



Fonte: Tarcísio Leão (caule) e Dick Culbert (flor).

Popularmente, a árvore é utilizada com fins medicinais, no preparo de chás e emplastos: as folhas são utilizadas descongestionantes e no tratamento de icterícia, já as raízes, como laxantes^{[11]-[12]}. Ainda, é empregada como antiinflamatório, no tratamento da Leishmaniose e de distúrbios gastrointestinais, na forma de fitoterápico^[10-13]. Apresenta diversos indicativos de potencial farmacológico, apresentando possíveis aplicações em Engenharia de Tecidos. Os extratos de *G. augusta* foram relacionados a efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes^[12,13] e potencial antitumoral^[14]. O efeito citotóxico do extrato da casca na linhagem de câncer de próstata PC-3 foi observado em concentrações de 100 ug/mL sendo necessário mais estudos das atividades *in vitro* e *in vivo* para uma avaliação conclusiva desse potencial.

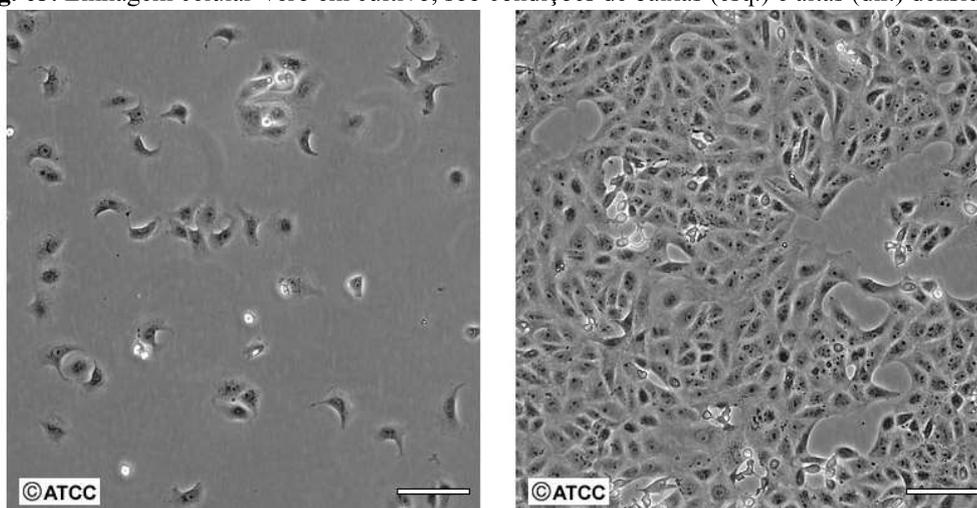
Tanto esse potencial farmacológico descrito em literatura, quanto a ampla utilização dessa espécie pela cultura popular trazem um importante potencial de aplicação para a *G. augusta*. Dessa forma, este estudo propôs a avaliação de uma espécie nacional visando verificar sua possível aplicação como fator de indução em regeneração tecidual.

1.2. Ensaios *in vitro*: análises morfológicas e quantitativas

A viabilidade celular é uma medida que pode ser definida como o número de células saudáveis em uma amostra^[15-17]. Se destaca como uma das medidas *in vitro* fundamentais à qualquer análise na área, tanto para avaliar a taxa de sobrevivência celular nos processos rotineiros de cultivo (repique, congelamento e descongelamento), quanto na obtenção do número de células viáveis como um parâmetro para outros fatores estudados (atividade, síntese, viabilidade, citotoxicidade, etc.)^[15-17].

Os testes morfológicos utilizam os critérios de comportamento celular associados à morfologia das células. Para tanto, utiliza-se a observação em microscópios de luz ou eletrônicos de varredura para verificar os padrões de formato celular, espalhamento, adesão, presença de hiper vesiculação, integridade da célula, entre outros^[3,15-17]. A ISO 10993-5, considera a avaliação morfológica como uma metodologia indicativa de dano celular, apresentando a linhagem celular Vero como padrão para estas análises^[3,18]. A linhagem celular Vero, como observado na Figura 03, é uma linhagem aderente obtida em 1962 por Yasumura e Kawakita, a partir de células epiteliais do rim de Macaco Verde Africano^[18]. De morfologia hexagonal, possui contagem cromossômica hipodiplóide. Em condições ideais de cultivo, se apresenta bem espalhada, com um ou mais nucléolos evidentes, e extensão de lamelipódios^[18].

Fig. 03. Linhagem celular Vero em cultivo, sob condições de baixas (esq.) e altas (dir.) densidade.



Fonte: ATCC[®] [18].

O uso de linhagens com comportamento morfológico bem estabelecido permite uma comparação mais precisa, já que o comportamento celular em condições ideais de cultivo (controle negativo) é bem conhecido, facilitando a identificação de alterações nos parâmetros morfológicos das populações de teste e do controle positivo (citotóxico). Em conjunto à análises quantitativas, a análise morfológica permite uma inferência sobre o grau de citotoxicidade induzida^[2,12,13].

Os ensaios desenvolvidos variam de técnicas de análise populacional, e é constante a busca por novas metodologias que ofereçam maior sensibilidade e confiabilidade. Dentre os protocolos clássicos pode-se elencar desde a exclusão do corante azul de Tripán por células viáveis, até análises mais complexas, com análise individual de células, como nos ensaios com citometria de fluxo^[15-17;21-33].

Nos últimos anos, foram publicados estudos controversos a respeito da aplicação das técnicas utilizadas para determinação da viabilidade celular^{[21]-[26]}. Muitas vezes, ocorre a interação entre nanopartículas ou agentes químicos testados e os corantes^[21,22], ou a interferência de agentes de determinadas vias metabólicas, devido às condições experimentais^[23-25]. Assim, torna-se necessário um

estudo avaliativo destes testes, a fim de se estabelecer qual teste ou quais combinações são capazes de oferecer um resultado mais exato para os índices de viabilidade nas rotinas de pesquisa: individualmente, cada ensaio de viabilidade se baseia em um único critério para a quantificação de morte celular, possibilitando resultados incompletos ou falhos amplamente descritos na literatura, uma vez que a definição de morte celular é complexa e multifatorial^{[25],[31]-[37]}

A Tabela 01 contém um panorama geral dos principais testes conhecidos e sua categoria. De um modo geral, uma análise populacional é um ensaio rápido e indireto, enquanto as individuais analisam célula a célula. O custo, o tempo de ensaio e a complexidade do equipamento necessário são importantes fatores a serem levados em consideração, já que a escolha de um método específico terá uma influência direta na interpretação dos dados.

Tabela 01. Principais critérios utilizados nos testes de viabilidade

Categoria do teste	Testes	Princípios
Teste de integridade de membrana	Corantes de exclusão Corantes fluorescentes Liberação de LDH	Determinação da integridade de membrana, via exclusão de um corante, ou presença de compostos intracelulares (LDH) no meio
Testes funcionais	Quantificação de ATP Redução de MTT, XTT Síntese protéica/ DNA	Avaliação de componentes metabólicos necessários à sobrevivência
Sondas fluorescentes	Conjugados fluorescentes	Marcação de estruturas específicas (caspase ativada, fosfatidilserina)
Testes morfológicos	Observação ao microscópio	Avaliação morfológica

Fonte: O Autor

Ainda, foi demonstrado, em estudos anteriores, que a viabilidade dos extratos aquosos de *G. augusta* apresentou variação entre metodologias testadas^[20]. Dessa forma, esse trabalho propôs a realização de ensaios de citotoxicidade que utilizem diferentes abordagens para análise da viabilidade: integridade de membrana (exclusão do azul de tripan^[15-17]), aderência celular (coloração com cristal violeta^[21-23]), metabolismo mitocondrial (redução do MTT^[23-29]) e metabolismo de ATP (retenção do vermelho neutro^{[30],[31]}).

Foi utilizado neste estudo, como forma de quantificar a citotoxicidade, o parâmetro *Lethal Dose 50*, ou LD₅₀. Trata-se de um cálculo de progressão linear amplamente empregado nas áreas de toxicologia, onde utilizam-se o logaritmo das concentrações testadas, para se estimar a dose necessária para provocar a morte de 50% de uma população. Quanto menor o LD₅₀ de um composto, mais tóxico este é considerado, já que uma dose menor seria necessária para causar a morte de 50% de uma população tratada com ele.

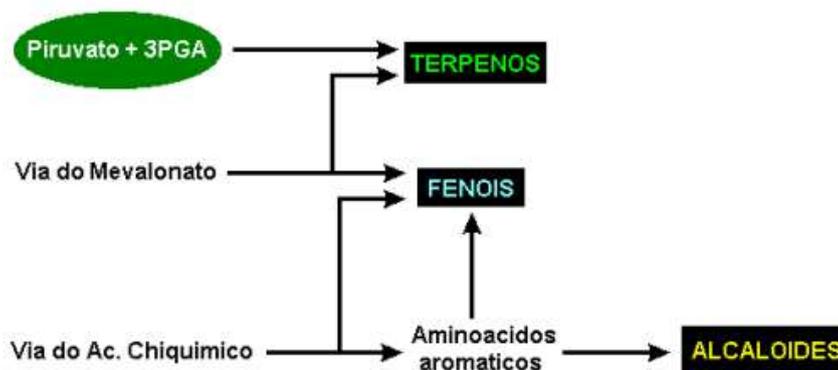
1.3. Metabólitos secundários e extratos orgânicos

As plantas possuem um metabolismo complexo, adaptado para garantir a sobrevivência de indivíduos sésseis, que precisam se desenvolver em um ambiente fixo sujeito a diversas variações ambientais (calor, umidade, pH, entre outros)^[34]. Os componentes químicos envolvidos no metabolismo das plantas são divididos entre primários (aqueles que desenvolvem função essencial para a sobrevivência do indivíduo) e secundários. As plantas selvagens, que ao longo de sua evolução foram submetidas à várias pressões seletivas, exibem uma quantidade e diversidade maior desses metabólitos secundários, que, apesar de não estarem relacionadas com o crescimento e sobrevivência, exercem as mais variadas funções ecológicas, desde atividade antioxidante, à ação inseticida e defesa contra herbívoros^[34, 35].

Essas moléculas são extremamente diversas, e podem conter as mais diversas atividades, com aplicações farmacológicas, antitumorais ou psicoativas. Fatores de defesa contra patógenos podem conter atividade antimicrobiana, e agentes inseticidas naturais podem exercer função neuroativa funcionando como antidepressivos, ansiolíticos ou relaxantes musculares^[36].

Os metabólitos secundários são classificados em três grandes famílias: alcalóides, fenóis e terpenos^[34] (Fig. 04). É importante considerar os principais metabólitos secundários descritos na literatura, pois eles possuem diferentes afinidades químicas, podendo ser mais hidrossolúveis (características polares) ou lipossolúveis (características apolares). As plantas, por possuírem um metabolismo fotossintetizante dependente de cromóforos reativos à luz solar, estão sujeitas a um grau de estresse oxidativo gerado pelos estados excitados pela luz, que podem oxidar moléculas diversas^[34]. Além disso, há o estresse por excesso de calor, ou perda de água decorrente da luz solar. Dessa forma, uma classe de metabólitos secundários denominada carotenóides é comumente produzida, a fim de controlar esse estresse oxidativo e proteger contra degradação por excesso de luz solar. Ainda, diversas espécies possuem óleos essenciais, e outras espécies químicas de baixa solubilidade em água.

Fig. 04. Principais famílias de metabólitos secundários das plantas



Fonte: UFPEL, PEREZ, Lázaro E. P. Metabolismo Secundário

Dessa forma, frações diferentes das biomoléculas de uma planta são extraídas de acordo com a polaridade do solvente utilizado^[37]. Extratos aquosos tendem a conter maior fração de moléculas polares, podendo não extrair as moléculas lipossolúveis como óleos essenciais ou carotenóides de importante ação antioxidante. Os extratos orgânicos visam, então, a extração da fração lipossolúvel das plantas podendo ter como solvente etanol, metanol, éter, entre outros^[35]. A avaliação dos extratos com solventes de diferentes polaridades é denominada de perfil fitoquímico, e permite que se averigue em quais frações de polaridade se encontram compostos-chave de interesse. Ainda, a técnica facilita a separação e purificação dentre as diversas moléculas provenientes do metabolismo secundário.

A comparação realizada entre a citotoxicidade de extratos com diferentes solventes foi importante pois avaliou a resposta celular a diferentes frações do metabolismo de uma mesma planta, indicando qual a polaridade dos compostos responsáveis pelos efeitos observados.

Pôde-se perceber uma diferença na citotoxicidade de diferentes frações de polaridade dos extratos de *G. augusta*, o que trouxe indícios sobre a polaridade dos compostos citotóxicos, permitindo direcionamento para trabalhos posteriores. Ainda, ao utilizar metodologias diversas para mensurar a viabilidade celular, esse estudo gerou uma base de dados comparativa para corroborar os padrões citotóxicos, que foram obtidos através de parâmetros complementares na mensuração da morte celular.

Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho além de permitirem uma análise comparativa entre as metodologias utilizadas, fornecem um resultado mais robusto e confiável para determinação dos padrões de citotoxicidade induzidos pelos extratos orgânicos de *G. augusta*, apurando a segurança e viabilidade de possíveis aplicações na área de fitoterapia e Engenharia de Tecidos.

2. OBJETIVOS

Avaliar a citotoxicidade dos diferentes extratos orgânicos do caule de *Gustavia augusta* (etanólico, metanólico), através de diferentes técnicas quantitativas de viabilidade, utilizando as análises morfológicas (qualitativas) das células como padrão de acompanhamento dos ensaios.

Para isso, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- 2.1. Avaliar a citotoxicidade de cada extrato, em curva crescente de concentrações.
- 2.2. Calcular a Dose Letal (LD₅₀) para cada extrato, nas diferentes metodologias de ensaios (descritas nos itens 3.3 a 3.6 da metodologia)

3. METODOLOGIA

Todos os protocolos foram realizados no laboratório de Engenharia de Tecidos e Biomoléculas, localizado na sala 104 do Bloco Ômega do *campus* São Bernardo do Campo da UFABC, e na Central Multiusuário deste Campus.

3.1. Cultura de células Vero

As células Vero (CCIAL 057) foram cultivadas em meio de cultura HAM F10, com 10% de soro fetal bovino (SFB), e 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina. As culturas, mantidas a 37°C e 5% CO₂. A morfologia celular foi avaliada ao longo da cultura por microscopia de luz invertida, com contraste de fase (Axiovert A1 / Zeiss), entre repiques e trocas de meio.

Para os ensaios de viabilidade celular, as células Vero foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, na densidade de 10⁴ células por poço, em 100 µl de meio completo (Fig. 05). A cultura foi mantida por 24 horas para o estabelecimento da monocamada. Após este período o meio de cultura foi substituído pelos extratos de teste de *Gustavia augusta*. Após outras 24 horas de contato das células com os extratos foram realizados os ensaios de viabilidade celular (itens 3.3 a 3.6 da metodologia). O controle positivo utilizado foi a solução de fenol 0,25%, e o controle negativo as condições ideais de cultivo celular.

3.2. Obtenção dos extratos de *Gustavia augusta*

Os extratos de teste de *Gustavia augusta*, foram obtidos mantendo-se as amostras vegetais de 60°C em estufa ventilada por 24 horas, até atingir teor de umidade padrão de 20%. Manteve-se 10g da amostra seca do caule em solvente (etanol ou metanol) por 24 horas. O extrato foi posteriormente concentrado via rotaevaporação e avaliados nas concentrações 1, 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL.

3.3. Ensaio de exclusão do azul de tripan

Na quantificação das células utilizando o azul de tripan, realizou-se, após 24h de incubação com os extratos, a suspensão das células em solução de tripsina/EDTA (0,25%). O conteúdo celular foi ressuspensionado em 100 uL de meio, corando-se com azul de tripan 0,4% (Sigma), na proporção de 1:1. A contagem foi realizada com Câmara de Neubauer, em microscópio invertido (Axiovert A1 / Zeiss).

3.4. Ensaio de coloração por cristal violeta

Para a quantificação das células com cristal violeta as células incubadas foram lavadas com tampão PBS, fixadas durante 15 min em glutaraldeído 2,5% (Synth). As células fixadas foram coradas com o cristal violeta (Synth, 0,05%, em metanol a 20%) durante 15 min, e lavadas 4 vezes com água destilada por 3 minutos. A diluição do corante foi realizada com 100 uL em solução 0,1 M de citrato de sódio (50% etanol, pH 4,2). A leitura foi realizada a 540 nm (SpectraMax M5).

3.5. Ensaio de redução do MTT

Na análise de viabilidade celular por redução de MTT, foram adicionados 100 µL da solução de 500 µg/mL de MTT (Sigma Aldrich) às células lavadas em PBS. Após 3 h de incubação com o corante, o meio foi removido e as células lavadas. Aplicou-se 100 µL de DMSO (synth), procedendo-se a leitura espectrofotométrica a 570 nm (SpectraMax M5).

3.6. Ensaio de retenção do vermelho neutro

Para a análise de viabilidade celular por vermelho neutro, as células foram lavadas com 100 µL de tampão fosfato. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de 50 µg/mL de vermelho neutro (Sigma). Após 3 h de incubação com o corante, o meio foi removido, e as células lavadas em tampão fosfato. Foi aplicada 100 µL de solução ácido acético glacial (1 %) em etanol. Após 10 minutos de incubação realizou-se leitura espectrofotométrica a 540 nm (SpectraMax M5).

3.7. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Para análise estatística utilizou-se o software GraphPad Prism™, versão 6.0 e Microsoft Excel™. Todos os resultados estão apresentados como média +/- desvio padrão. Foram realizadas análises de variância (ANOVA One ou TwoWay) e o teste posterior de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo morfológico de citotoxicidade dos extratos, aquoso e orgânicos, de caule e folhas de *Gustavia augusta*, foi executado por PADILHA, C. e colaboradores^[16], em linhagem celular Vero.. Foi relatado, para o extrato aquoso de caule, um padrão morfológico de citotoxicidade para as concentrações iguais e superiores à 75 ug/mL do extrato^[19]. Ainda, a citotoxicidade do extrato aquoso do caule foi testada em estudos anteriores, na comparação entre metodologias quantitativas de viabilidade, corroborando o potencial citotóxico expressivo à partir de 75 ug/mL do extrato^[20].

Esse estudo realizou as análises morfológicas e quantitativas dos extratos orgânicos de *Gustavia augusta* em células Vero. Os extratos orgânicos apresentaram efeitos de citotoxicidade para as concentrações a partir de 75 ug/mL do extrato.

4.1. Análise qualitativa da morfologia celular.

O acompanhamento das células Vero no microscópio de luz invertido com contraste de fase, demonstrou que ambos os extratos (etanólico e metanólico) de *G. augusta* não demonstraram sinais de citotoxicidade nas concentrações de 1 e 10 µg/mL. Para estas concentrações, as células apresentaram morfologia similar ao controle negativo: mantiveram-se com um formato alongado, bem aderidas e espalhadas, com projeções de lamelipódios e filopódios. Os núcleos pareciam íntegros, contendo dois ou mais nucléolos em cada célula. Nas concentrações mencionadas e no controle, observou-se a presença de células em divisão, e de algumas células não aderidas, com formato arredondado.

Ambos os extratos apresentaram um aumento de células não aderidas na concentração de 25 µg/mL, com formato arredondado. A morfologia da monocamada assim como sua confluência, porém, mantiveram-se inalteradas. Na concentração de 50 µg/mL, observou-se para ambos os extratos um aumento expressivo na proporção de células não aderidas. As células aderidas apresentaram morfologia levemente alterada, com formato mais arredondado, menor lançamento de lamelipódios e filopódios e espalhamento menos intenso. Os núcleos estavam menos evidentes, com formatos mais irregulares e os nucléolos menos pronunciados. Ainda assim, a confluência da monocamada foi mantida nas células tratadas com extrato metanólico. O extrato etanólico, por sua vez, apresentou alguma interferência na confluência da monocamada para esta concentração.

As concentrações de 75 e 100 µg/mL demonstraram padrão de citotoxicidade similar ao controle positivo: grande número de células não aderidas, morfologia das células arredondada, com pouca adesão, não se observando prolongamentos de lamelipódios, nem um espalhamento evidente (Figuras 05 e 06). Os núcleos não se mostravam evidentes, ou com formato definido, nem distinguem nucléolos. Observou-se padrão de formação de bolhas nos limites celulares, indicando o

comportamento de *blebbing* apoptótico e hiper vesiculação. O fundo da placa continha acúmulo de resíduo celular, com perda completa da confluência da monocamada. Os sinais de citotoxicidade se apresentaram de forma mais severa na concentração de 75µg/mL para o extrato etanólico.

Fig 05. Morfologia das células Vero,após incubação com extrato metanólico do caule de *G. augusta*. A- Controle negativo. B- 1 µg/mL. C- 10 µg/mL. D- 25 µg/mL. E- 50 µg/m . F- 75 µg/LL. G- 100 µg/mL. H- Controle positivo.

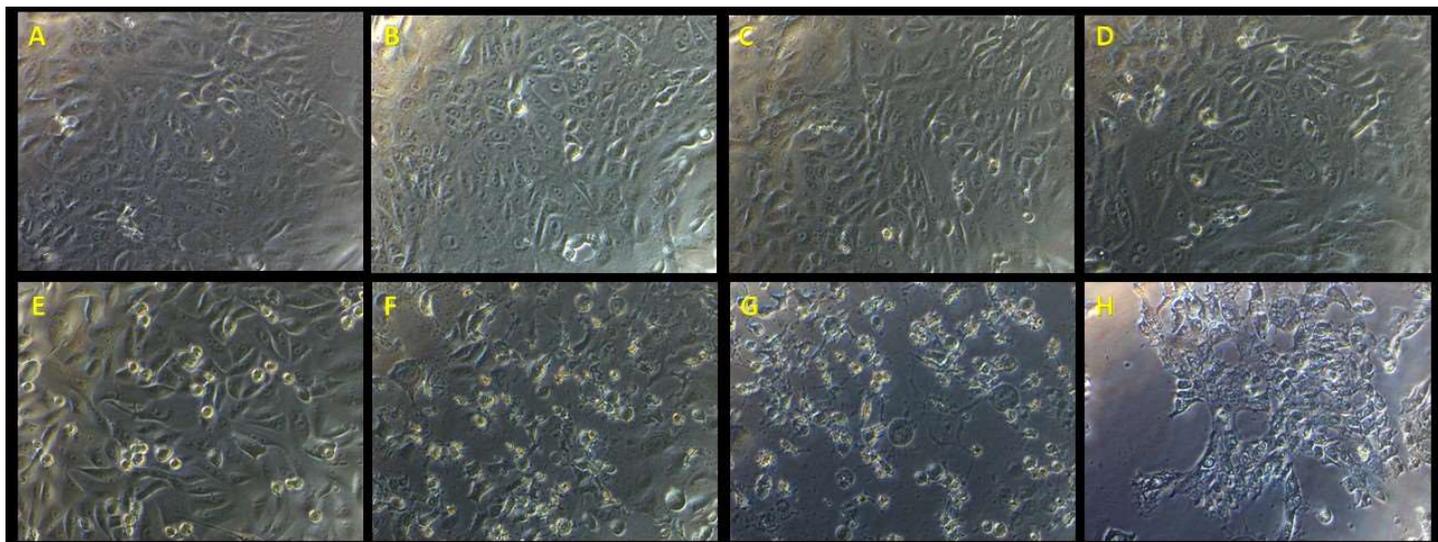
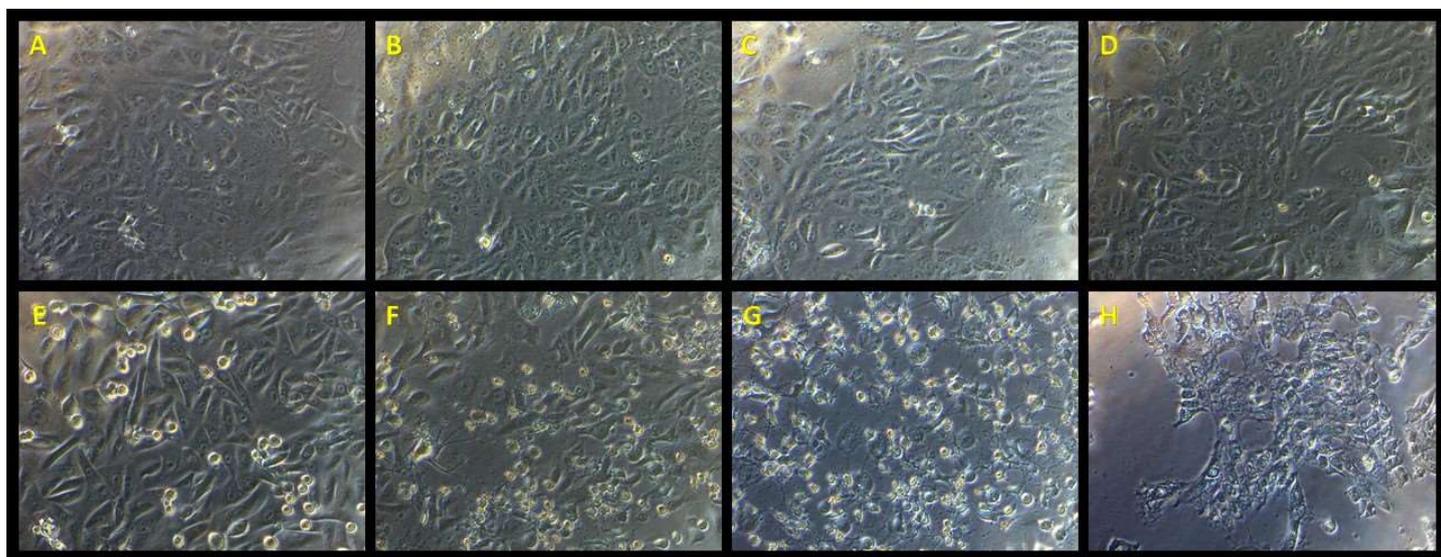


Fig 06. Morfologia das células Vero,após incubação com extrato etanólico do caule de *G. augusta*. A- Controle negativo. B- 1 µg/mL. C- 10 µg/mL. D- 25 µg/mL. E- 50 µg/mL. F- 75 µg/mL. G-100 µg/mL. H- Controle positivo.



A ação citotóxica dos extratos orgânicos do caule de *G. augusta* apresentou indícios de alteração da morfologia das células a partir da concentração de 50 ug/mL. Esse resultado corrobora o descrito por PADILHA^[24], para as mesmas condições experimentais. O extrato etanólico apresentou um maior impacto na morfologia das células em relação ao metanólico, à partir da concentração de 50

ug/mL. Essa diferença entre a citotoxicidade dos extratos está provavelmente associada às características químicas dos compostos do caule: é possível que os agentes citotóxicos presentes na amostra vegetal tenham uma afinidade apolar, sendo extraídos em maiores concentrações nos compostos etanólicos.

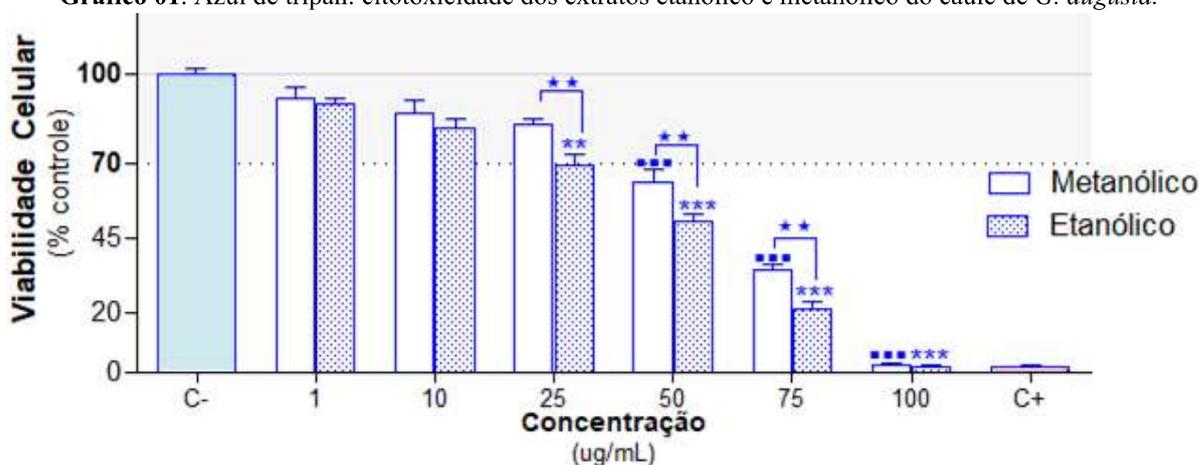
4.2. Análises quantitativas da citotoxicidade

As análises quantitativas da citotoxicidade foram realizadas para os ensaio de viabilidade, de acordo com os protocolos descritos na metodologia:

4.2.1. Exclusão do azul de tripan

O teste de exclusão do azul de tripan (gráfico 01), registrou para ambos os extratos, variação em relação ao controle negativo para as concentrações à partir de 25 µg/mL ($P < 0.05$). As concentrações acima de 50 µg/mL resultaram em viabilidade celular inferior à 70%, considerada citotóxica. O ensaio demonstrou diferença entre a citotoxicidade induzida por metanol em relação à induzida por etanol para as concentrações de 25 a 75 mL.

Gráfico 01. Azul de tripan: citotoxicidade dos extratos etanólico e metanólico do caule de *G. augusta*.

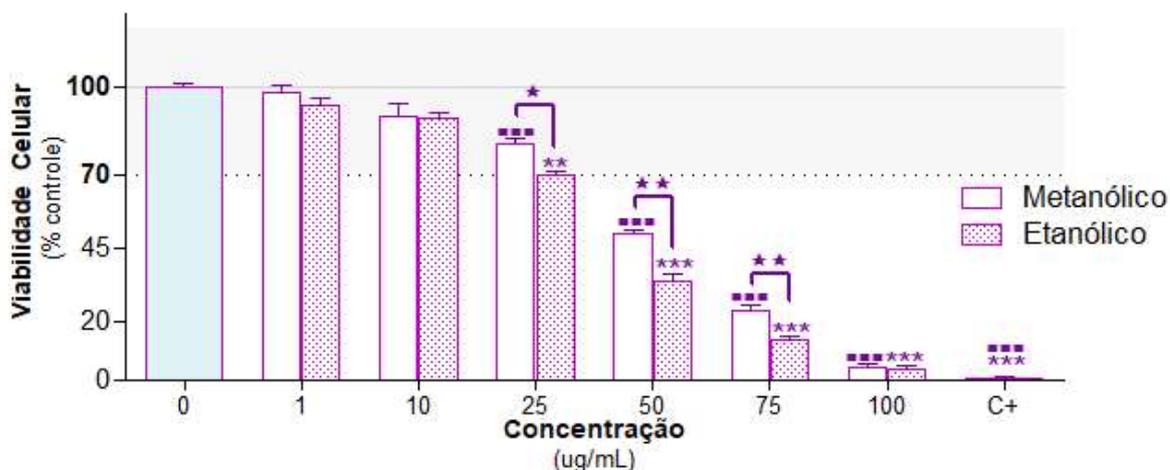


O resultado corrobora o padrão citotóxico observado em análise morfológica: ambos os extratos possuem uma citotoxicidade relevante à partir de 50 µg/mL. O extrato etanólico, de afinidade mais apolar apresentou uma atividade citotóxica mais intensa em relação ao metanólico na faixa de 25-75µg/mL. Isso sugere que a citotoxicidade induzida pelos extratos do caule de *G. augusta* é induzida por fatores de característica apolar presentes na amostra vegetal. Esses fatores teriam maior afinidade pelo solvente etanol em relação aos demais (água e metanol).

4.2.2. Coloração com cristal violeta

O teste de viabilidade celular por coloração com cristal violeta (Gráf. 02), registrou em ambos os extratos, algum grau de citotoxicidade em relação ao controle negativo para as concentrações à partir de 25 µg/mL. A partir de 50 µg/mL, os extratos resultaram em viabilidade celular inferior à 70%, considerada citotóxica. Verificou-se maior citotoxicidade do extrato etanólico em ao metanólico nas concentrações de 25 µg/mL à 75 µg/mL.

Gráfico 02. Cristal violeta: citotoxicidade dos extratos etanólico e metanólico do caule de *G. augusta*.

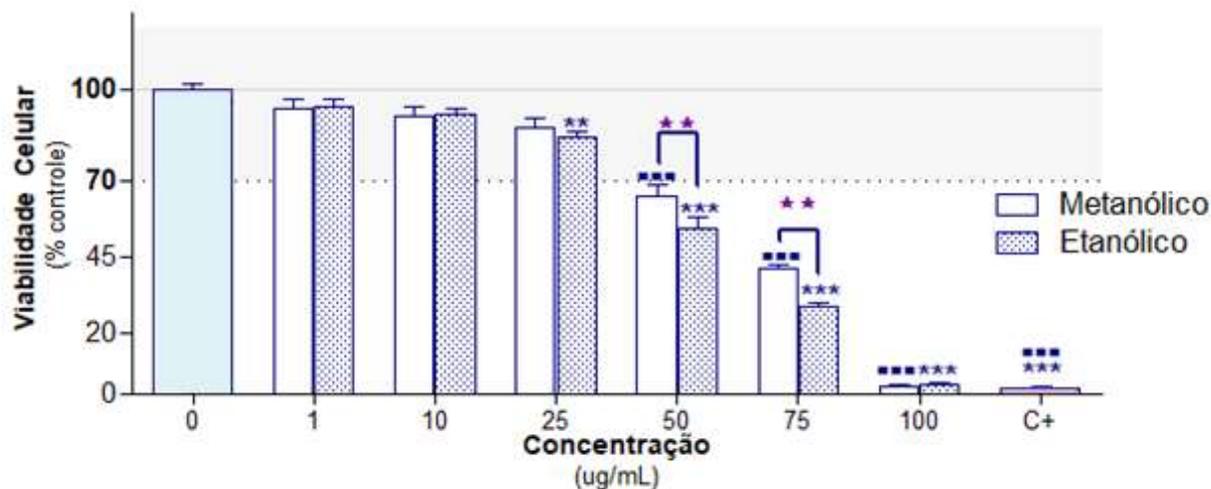


Esse resultado reforça o padrão observado pela análise morfológica, com citotoxicidade relevante (viabilidade inferior à 70%) à partir da concentração de 50 µg/mL. O extrato etanólico, obtido de um solvente mais apolar apresentou uma atividade citotóxica mais intensa (em relação ao metanólico) na faixa de 25 à 75µg/mL. Esse dado reforça os achados com azul de tripan, que aponta para uma afinidade apolar dos compostos citotóxicos presentes no caule.

4.2.3. Redução do MTT

A viabilidade celular por redução de MTT (Gráf. 03) apresentou variação significativa em relação ao controle negativo para as concentrações de 50 à 100 µg/mL dos extratos orgânicos do caule de *G. augusta*. O extrato etanólico apresentou variação à partir da concentração de 25 µg/mL. O ensaio por redução de MTT demonstrou diferença estatística no padrão de citotoxicidade entre os extratos etanólico e metanólico, para as concentrações de 50 e 75 µg/mL ($P < 0,01$). O extrato etanólico apresentou uma variação significativa da viabilidade a partir de 25 µg/mL, corroborando com os demais ensaios.

Gráfico 03. MTT: citotoxicidade dos extratos orgânicos do caule de *G. augusta*, em Vero.

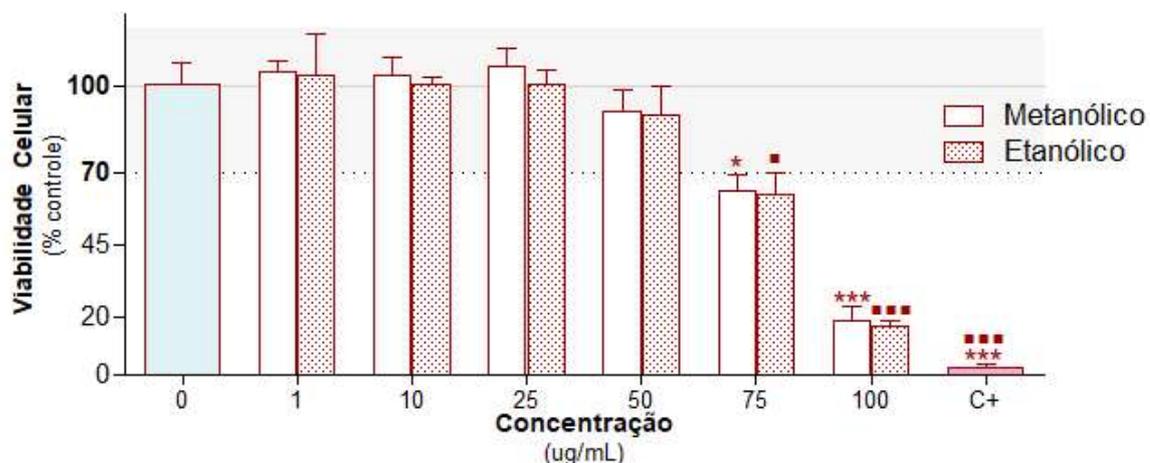


Para ambos os extratos, verificou-se que o ensaio por MTT obteve percentuais de viabilidade maiores em relação aos ensaios por azul de tripan e cristal violeta. Ainda assim, ambos os extratos demonstraram citotoxicidade relevante a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$, resultado que reforça os dados obtidos até então.

4.2.4. Retenção do vermelho neutro

O teste de viabilidade celular das células Vero por retenção do vermelho neutro (graf. 04) não demonstrou uma variação significativa em relação ao controle negativo para as concentrações de 1 à 50 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos orgânicos (metanólico e etanólico) do caule de *G. augusta*. Somente a concentração de 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos apresentaram citotoxicidade, em comparação ao grupo controle negativo (respectivamente $P < 0,05$ e $P < 0,001$).

Gráfico 04. Vermelho neutro: citotoxicidade dos extratos etanólico e metanólico do caule de *G. augusta*, em Vero. Valores de viabilidade calculados como uma porcentagem em relação ao controle negativo.



O ensaio não demonstrou diferenças no padrão de citotoxicidade entre os extratos etanólico e metanólico, nem representa quantitativamente as alterações morfológicas observadas na faixa de concentração de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado reforça o observado em trabalhos anteriores, sugerindo que o vermelho neutro parece ter pouca afinidade de absorção pelas células Vero, ou sofrer alguma interferência em relação aos extratos, já que não demonstra a mesma sensibilidade à ação citotóxica dos extratos de *G. augusta* apontada pela observação da morfologia ou pelas técnicas quantitativas.

4.3. Comparativo entre metodologias

As quatro metodologias quantitativas apresentaram citotoxicidade a partir da concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos. O ensaio de retenção do vermelho neutro demonstrou-se menos sensível para a quantificação da viabilidade celular em relação às demais metodologias quantitativas empregadas, que registraram sinais de citotoxicidade à partir da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os extratos. O ensaio que mais se assemelhou ao padrão de citotoxicidade observado na morfologia foi o cristal violeta (gráficos 05 e 06) seguido do MTT e do azul de tripan, que apresentou a maior citotoxicidade em comparação aos demais ensaios.

Gráfico 05. Comparativo entre metodologias: citotoxicidade do extrato metanólico de caule de *G. augusta*

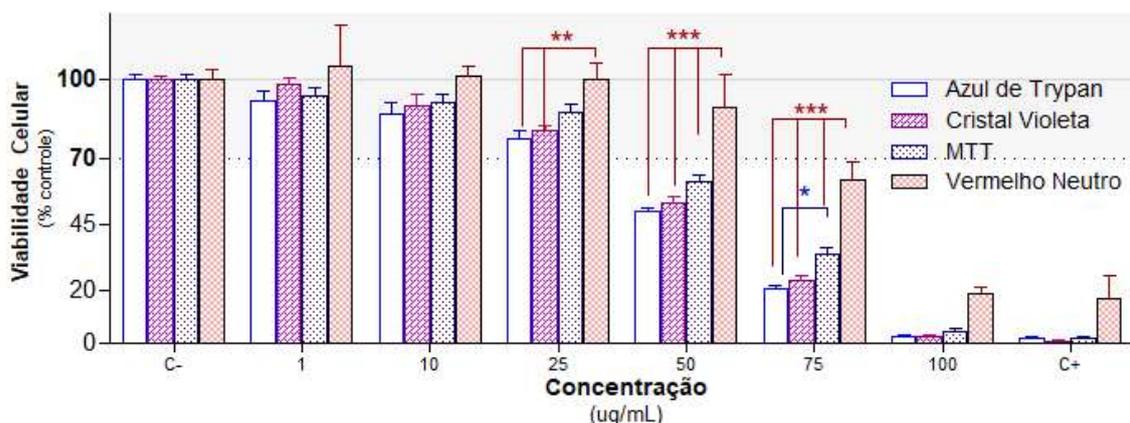
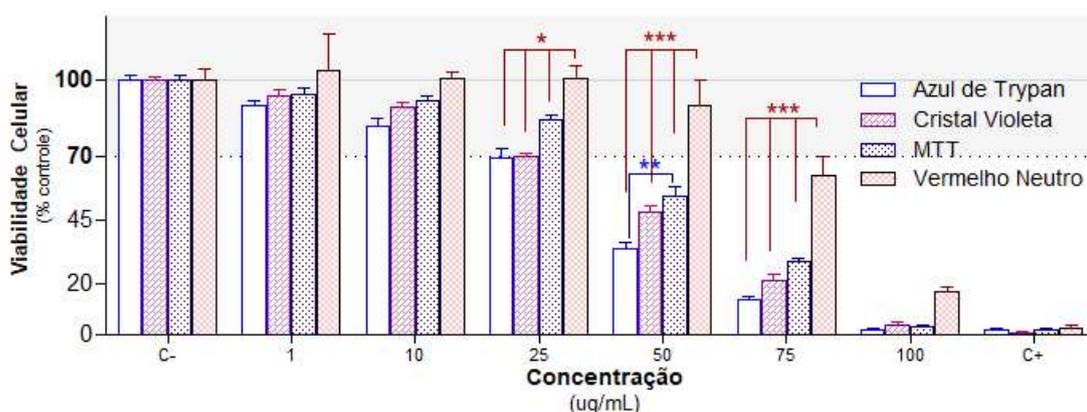


Gráfico 06. Comparativo entre metodologias: citotoxicidade do extrato etanólico de caule de *G. Augusta*



A citotoxicidade aferida variou de acordo com a metodologia empregada, para ambos os extratos. O ensaio por vermelho neutro foi estatisticamente diferente dos demais para as concentrações de 25 à 75 µg/mL em ambos os extratos ($P < 0.001$). Os ensaios por cristal violeta e azul de tripan apresentaram menores valores de viabilidade em todas as concentrações para ambos extratos. O azul de tripan obteve as menores taxas de desvio padrão médio (Tabela 02).

Essa divergência entre resultados ressalta a importância da aplicação de múltiplas metodologias nas análises de citotoxicidade. O teste por coloração do vermelho neutro apresenta uma citotoxicidade inferior aos demais testes empregados, o que poderia resultar num resultado falso-negativo para citotoxicidade das altas concentrações dos extratos. Esse padrão foi observado e relatado em estudos anteriores para o vermelho neutro: não se sabe se esse resultado é decorrente da não internalização deste pelas células de linhagem Vero ou se ainda ocorre alguma interferência entre o vermelho neutro e os extratos de *G. augusta*. Mais estudos devem se realizar para averiguação.

Tabela 02: desvio-padrão médio associado à cada técnica.

Metodologia aplicada	Desvio-padrão médio
Exclusão do azul de tripan	6,533
Coloração por Cristal Violeta	2,398
Redução do MTT	5,378
Retenção do vermelho neutro	7,992

Por outro lado, os demais testes não demonstraram diferença significativa entre si, apesar de avaliarem a viabilidade através de diferentes parâmetros. Com exceção do MTT, que apresentou as maiores médias de viabilidade em comparação ao cristal violeta e ao azul de tripan, demonstrando diferença estatisticamente significativa em relação ao azul de tripan, nas concentrações de 75 µg/mL do extrato etanólico e 50 µg/mL do extrato metanólico. Essa diferença pode ocorrer da técnica de execução do azul de tripan, que avalia a integridade da membrana de uma amostra coletada dentro da população celular.

4.4. Comparativo entre extratos

O cálculo da LD_{50} é comumente empregado nas análises de viabilidade e em toxicologia. Utilizando o logaritmo das taxas de viabilidade, ele fornece uma projeção da dose necessária de um composto para promover uma taxa de morte de 50% de uma população. Ou seja: quanto menor o LD_{50} de um composto, menor é a concentração necessária para promover toxicidade.

O extrato etanólico apresentou um padrão mais elevado de citotoxicidade em relação ao extrato metanólico, com diferenças estatísticas para as concentrações de 25, 50 e 75 µg/mL nos ensaios de azul de tripan, cristal violeta e MTT. Esse padrão de citotoxicidade do extrato etanólico, mais elevado em concentrações menores resultou em um LD₅₀ menor para o extrato, corroborando sua maior citotoxicidade em relação ao extrato metanólico (Tab. 02). O ensaio por vermelho neutro foi exceção, não registrando diferença estatística entre a viabilidade de cada extrato.

Tabela 03. LD₅₀ referente aos extratos orgânicos de *Gustavia augusta*.

	Azul Trypan	Cristal Violeta	MTT	Vermelho Neutro	Media	DP
Etanólico	32,12	36,18	38,15	NA	35,5	6,3
Metanólico	38,87	42,18	45,15	NA	42,1	6,6

Os extratos orgânicos de *Gustavia augusta* apresentaram uma citotoxicidade mais elevada que o extrato aquoso testado nas mesmas condições, em estudos anteriores. Ainda, o extrato etanólico apresentou a maior citotoxicidade em comparação ao metanólico. Isso aponta para uma provável característica apolar dos compostos citotóxicos, já que a viabilidade celular parece estar decrescendo conforme se aumenta a hidrofobicidade do solvente^[34-37].

Dentre os metabólitos secundários descritos em literatura, diversos apresentam respostas tóxicas^[34,35]. A família das cumarinas, caracterizada quimicamente por dois anéis benzênicos adjacentes, é especialmente apolar, tendo boa solubilidade em etanol^[35,36]. As moléculas dessa família exercem um papel de defesa contra herbivoria, contendo ação inseticida ou um sabor amargo^[36]. As cumarinas possuem efeito tóxico relatado para os rins e fígado humano, e são um exemplo de biomoléculas apolares que podem ser responsáveis pelo efeito citotóxico observado^[36,37], já que o modelo celular utilizado é proveniente de células epiteliais de rins de macacos^[18]. Mais estudos serão necessários para verificar qual ou quais classes de moléculas são responsáveis pela citotoxicidade.

5. CONCLUSÕES

Houve variação no resultado apresentado pelas metodologias utilizadas, em ambos os extratos. A variação entre os resultados reforça a importância da combinação de ensaios para determinação de citotoxicidade, sendo as análises morfológicas, por MTT e cristal violeta, as mais complementares e indicadas neste estudo. O ensaio por retenção do vermelho neutro apresentou uma menor sensibilidade em relação aos demais para a citotoxicidade induzida pelos extratos de *G. augusta*. O ensaio apresentou a maior taxa de desvio padrão, e uma diferença estatística em relação aos demais testes nas concentrações de 25 à 75 µg/mL. Já a metodologia de coloração por cristal violeta apresentou os resultados mais condizentes com os achados morfológicos. Essa técnica possui o menor valor de reagente, e metodologia de mais fácil execução.

Ainda, o extrato etanólico apresentou um padrão de citotoxicidade mais elevado em comparação ao extrato metanólico, tanto na análise morfológica nos ensaios quantitativos, apresentando um menor LD₅₀ e variação estatística ($P < 0.01$) em relação ao extrato metanólico. A exceção foi o ensaio por retenção de vermelho neutro, que não demonstrou uma sensibilidade condizente com os demais ensaios deste estudo, e não permitiu o cálculo do LD₅₀. São necessários mais estudos sobre os extratos para definir se essa citotoxicidade é decorrente de uma maior concentração de compostos tóxicos apolares na fração etanólica, ou de uma menor fração de compostos antioxidantes ou citoprotetores como os carotenóides, de característica levemente mais polar, em relação aos demais extratos.

REFERÊNCIAS

1. LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J.P. **Principles of Tissue Engineering**. 5. ed. 2020.
2. LANGER, R.; VACANTI, J. **Advances in tissue engineering**. Elsevier: Pediatric Surgery. 2016.
3. INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. ISO 10993-1. Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and tests. 2009. 21p.
4. ALBERTS, B. *et. al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. Ed. Porto Alegre: ARTMED, 2017.
5. BERTOLINO, J. **Biomaterial de quitosana, gelatina e óleo de pequi: caracterização, avaliação da biocompatibilidade e da atividade antimicrobiana**. 2018. Dissertação (Mestrado) - Curso de Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 71. f. 2018.
6. ALBREKTSSON, T. ; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J** (2001) 10 :S96–S101. DOI 10.1007/ s005860100282
7. SOTERO, D. E. G. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: Chopé (*Gustavia augusta* L.), Sacha Mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e Macambo (*Theobroma bicolor*)**. 2002. Tese (Doutorado em Bromatologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
8. BRASIL. Governo Federal. **Ministério do Meio Ambiente**. “Biodiversidade Brasileira”. Acesso: 07.2023. Disponível em: <<https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>>
9. LORENZI, H. e MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**. 2. ed. Instituto Plantarum, 2008.
10. JARDIM, M. A. G.; MEDEIROS, T. D. S. **Plantas oleaginosas do Estado do Pará: composição florística e usos medicinais**. Revista Brasileira de Farmácia, v. 87, n. 4, p. 124-127, 2006.
11. SALIMENA, F.R.G. *et al.* **Verbenaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de botânica. 2018.
12. SANTOS, A.C.B. *et al.* Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. V. 17, n.4,p. 980-991, 2015.
13. GARCIA-TORRES, D. E. *et. al.* **Actividad antioxidante de los extractos del chopé (*Gustavia augusta* L.)**. Revista de la Sociedad Química del Perú, v. 75, n. 3, 2009.
14. SUFFREDINI, I. B. *et al.* **In vitro prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts**. Pharmazie, p. 722-724, 2006.
15. STODDART, J. M., *et. al.* Mammalian cell viability. **Methods and Protocols**. Nova York: Springer Science Business Media, 2011. 240 p.
16. GILBERT, F. D.; FRIEDRICH, O.; *et. al.* Cell viability assays. **Methods in molecular biology**. Nova York: Springer Science+Business Media. 299 p. 2017.
17. JIANG, L.; POON, I. K. H. Methods for monitoring the progression of cell death, cell disassembly and cell clearance. **Apoptosis Apr**;24(3-4):208-220. 2019.
18. ATCC®. American Type Culture Collection. **Vero (ATCC® CCL-81™)**. [Internet]. [Acesso: set. 2020]. [Disponível em:] <<https://www.atcc.org/Products/All/CCL-81.aspx>>.
19. PADILHA, C. B. **Citotoxicidade e proliferação de células na presença de *Gustavia augusta* L. (*Lecythidaceae*)**. 2018. 26f. Trabalho de Iniciação Científica – Universidade Federal do ABC, 2018.
20. REZENDE, L. R. **Ensaio de viabilidade celular: um estudo comparativo de metodologias quantitativas**. 2019. 30f. Trabalho de Iniciação Científica – Universidade Federal do ABC, 2019.
21. FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harb Protoc**; doi:10.1101/pdb.prot087379, 2016.
22. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application on proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-65. 1983.
23. ALMUTARY, A.; SANDERSON, B. J. S. The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle. Toxicity Testing International. **Journal of Toxicology**, v.35, n.4, p.454-462, 2016.
24. RIVIERE, N. A. M.; INMAN, A. O.; ZHANG, L. W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.234, p. 222–235, 2009.

25. STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene** v.574, p.193–203, 2015.
26. PLUMB JA et. al. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. **Cancer Res.** 1989;49:4435-40.
27. STOCKERT, J. C. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v.114, p.785–796, 2012.
28. KANNIAPPAN, G. S.; MORGAN, R., H.. **The pyruvic acid analogue 3-bromopyruvate interferes with the tetrazolium reagent MTS in the evaluation of cytotoxicity.** Assay Drug Dev Techn, 2010.
29. PINTOR, A. V. B.; QUEIROZ, L. D.; BARCELOS, R. *et. al.* MTT versus other cell viability assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials: a systematic review. **International Endodontic Journal.** <https://doi.org/10.1111/iej.13353>. V.53. 2020.
30. REPETTO, G.; PESO, A. & ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols** v.3, n.7, 2008.
31. BORENFREUD, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett.** v.24, n.2–3, p.119–24, 1985.
32. LAMBERS, H. OLIVEIRA, R. **Plant Physiological Ecology.** Springer Nature. 3. ed. 2019
33. JONES, W. P.; KINGHORN, D. **Extraction of Plant Secondary Metabolites.** *In:* SARKER, S. & NAHAR, L. **Natural Products Isolation.** 3. ed. Spring. 2012
34. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica.** 7. ed. Sarvier, 2018.