



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ENGENHARIA - CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

Kelly Costa Barboza

Avaliação dos danos ao DNA de linfócitos humanos tratados com *Piper cubeba*

Ilha Solteira – SP
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ENGENHARIA - CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

Kelly Costa Barboza

Avaliação dos danos ao DNA de linfócitos humanos tratados com *Piper cubeba*

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado à Faculdade de Engenharia,
Campus de Ilha Solteira, Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
como parte das exigências para obtenção do
título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karine Assis Costa

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina
Rodrigues Lisoni

Ilha Solteira – SP
2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Barboza, Kelly Costa.
B239a Avaliação dos danos ao dna de linfócitos humanos tratados com *Piper cubeba* / Kelly Costa Barboza. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
76 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2023

Orientador: Karine Assis Costa
Co-orientador: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
Inclui bibliografia

1. Análise citogenética. 2. Efeitos genotóxicos. 3. Lignanas. 4. Teste do cometa.


Amanda Sertori dos Santos

Bibliotecária - CRB/8-9061
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao
Usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**"AVALIAÇÃO DOS DANOS AO DNA DE LINFÓCITOS HUMANOS TRATADOS
COM PIPER CUBEBA"**

KELLY COSTA BARBOZA

REGULAMENTO SOBRE A AVALIAÇÃO:

Artigo 25º - § 2º A apresentação pública do trabalho de TCC deverá ser de no mínimo 20 (vinte) minutos e máxima de 40 (quarenta) minutos. Após um intervalo de 5 (cinco) minutos, haverá a arguição do Trabalho pelos examinadores. O tempo de arguição, será de até 15 (quinze) minutos para cada examinador, e até 15 (quinze) minutos o tempo para a resposta do(a) aluno(a) a cada examinador ou no caso de se optar pelo diálogo o tempo conjunto entre examinador e acadêmico(a) será de no máximo 30 (trinta) minutos.

Artigo 24º - No julgamento do TCC, a banca examinadora deverá avaliar a apresentação oral, escrita e a defesa do trabalho durante a arguição. O conceito final será APROVADO(A) ou REPROVADO(A).

COMISSÃO EXAMINADORA

1ª EXAMINADORA (Orientadora-Presidente)

Nome: Profa. Dra. Karine Assis Costa

Karine Assis Costa

2ª EXAMINADORA

Nome: Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti

Rita Luiza Peruquetti

3ª EXAMINADORA

Nome: Dra Isabel Samila Lima Castro



Documento assinado digitalmente

ISABEL SAMILA LIMA CASTRO

Data: 11/12/2023 17:13:38-0300

Verifique em <https://validar.jb.gov.br>

CONCEITO

(X) Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Ilha Solteira-SP, 11 de dezembro de 2023.

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Cursos: Agronomia, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica, Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia

Avenida Brasil Centro, 56 Caixa Postal 31 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil
tel (18) 3743 1100 fax (18) 3742 2735 stcom@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

Poucas pessoas fizeram significativamente parte da minha jornada, elas me ajudaram a chegar até aqui, acreditando na minha capacidade, me fazendo sorrir e me ouvindo quando precisei, dedico esse projeto a elas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, me dirijo as mulheres da minha família, especialmente a minha mãe Vera e minha irmã Elenice, saibam, o diploma que receberei também é mérito de vocês. Mãe, agradeço por todos os sacrifícios que realizou desde o momento em que decidiu me tornar sua filha, eu sai de casa para realizar o sonho de todas nós e você sempre esteve ao meu lado. Agradeço a minha querida amiga Célia e seu esposo Marco, que com sua incrível bondade me ajudaram no momento em que mais precisei durante o curso. Também não poderia deixar de falar sobre meu amado marido Ítalo, durante os momentos mais sombrios da minha vida, sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me amando incondicionalmente. Acredito que toda pessoa carrega consigo uma bagagem invisível, levando não só suas histórias e vivências, mas também daqueles que a antecede, sendo assim, mesmo que não estejam mais aqui, não posso deixar de agradecer a minha querida avó Tereza e ao meu pai de coração Nilton, eles me deixaram lindas e alegres lembranças de infância, que iluminaram meu caminho e me deram forças nos momentos difíceis. Por fim, sem medo de ser arrogante, me agradeço, por não me permitir ser tomada pelo desânimo a ponto de desistir, reconheço que o caminho foi mais longo do que imaginei, mas, enfim consigo enxergar a chegada e reconhecer minha força em meio ao medo do fracasso.

“Existe a hora de estremecer e correr, mas, também existe a hora de não agir assim. Às vezes não haverá palavras que estimulem sua coragem, sendo preciso simplesmente, mergulhar.”

(Clarissa Pinkola Estés)

RESUMO

As propriedades medicinais da *Piper cubeba* são conhecidas na medicina tradicional devido à sua eficácia no tratamento de doenças como sífilis, gonorreia e alguns tipos de tumores. Algumas lignanas presentes nessa planta demonstram a capacidade de reduzir células tumorais, bem como ação antibacteriana e hepatoprotetora. O Ensaio Cometa é um método primário empregado para avaliar a genotoxicidade dessas lignanas. Esse experimento envolveu oito tratamentos: um controle negativo (CN), um controle utilizando o solvente dimetilsulfóxido (DM) a 50 µg/ml, a ciclofosfamida em duas concentrações (50 µg/ml - CP1 e 100 µg/ml - CP2), e quatro tratamentos com as lignanas: cubebina (C), dihidrocubebina (D), etilcubebina (E) e hinoquinina (H), todos na concentração de 50 µg/ml. Os extratos concentrados foram cedidos pelo Departamento de Físico-Química da FEIS/UNESP e posteriormente diluídos. Cada tratamento foi avaliado em intervalos de 4h, 24h, 48h e 72h, exceto os grupos com ciclofosfamida, que foram avaliados apenas no tempo de 72h. O objetivo principal foi estabelecer um protocolo padronizado do Teste do Cometa para linfócitos humanos, visando avaliar o potencial genotóxico das lignanas, bem como do solvente dimetilsulfóxido. Para conduzir o experimento, foi coletado sangue de um voluntário e os linfócitos foram cultivados com meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino, penicilina, fito- hemaglutinina e a substância a ser analisada, após a centrifugação nos intervalos designados, foram coletados e o protocolo do Cometa foi aplicado. A análise estatística ANOVA Two Way com medidas repetidas executado no programa GraphPad Prism10 e o teste Kruskal-Wallis com nível de confiança de 95% ($P \geq 0.05$), ambos não revelaram diferenças significativas entre os tratamentos. Também não foram observadas diferenças estatísticas dentro de cada tratamento nos diferentes intervalos de tempo analisados. Tais efeitos genotóxicos não eram esperados, pois de acordo com outros estudos que utilizaram compostos semelhantes, esses efeitos não foram comprovados. Esses resultados são importantes pois indicam que essas lignanas não possuem efeitos genotóxicos nos linfócitos, sugerindo segurança em seu uso medicinal. Além disso, o solvente dimetilsulfóxido também não demonstrou efeitos genotóxicos, o que é relevante, visto seu amplo uso como solvente em experimentos com outras substâncias orgânicas.

Palavras-chave: Análise citogenética, efeitos genotóxicos, lignanas, teste do Cometa.

ABSTRACT

The medicinal properties of *Piper cubeba* are known in traditional medicine due to its effectiveness in treating diseases such as syphilis, gonorrhea and some types of tumors. Some lignans present in this plant demonstrate the ability to reduce tumor cells, as well as antibacterial and hepatoprotective action. The Comet Assay is a primary method used to evaluate the genotoxicity of these lignans. This experiment involved eight treatments: a negative control (CN), a control using the solvent dimethylsulfoxide (DM) at 50 µg/ml, cyclophosphamide in two concentrations (50 µg/ml - CP1 and 100 µg/ml - CP2), and four treatments with lignans: cubebin (C), dihydrocubebin (D), ethylcubebin (E) and hinokinin (H), all at a concentration of 50 µg/ml. The concentrated extracts were provided by the Department of Physical Chemistry at FEIS/UNESP and subsequently diluted. Each treatment was evaluated at intervals of 4h, 24h, 48h and 72h, except for the cyclophosphamide groups, which were evaluated only at 72h. The main objective was to establish a standardized Comet Test protocol for human lymphocytes, aiming to evaluate the genotoxic potential of lignans, as well as the solvent dimethylsulfoxide. To conduct the experiment, blood was collected from a volunteer and the lymphocytes were cultured with RPMI 1640 culture medium, fetal bovine serum, penicillin, phytohemagglutinin and the substance to be analyzed, after centrifugation at the designated intervals, they were collected and the Comet protocol was applied. The statistical analysis Two Way ANOVA with repeated measures performed in the GraphPad Prism10 program and the Kruskal-Wallis test with a confidence level of 95% ($P \geq 0.05$), both revealed no significant differences between treatments. There were also no statistical differences observed within each treatment in the different time intervals analyzed. Such genotoxic effects were not expected, as according to other studies that used similar compounds, these effects were not proven. These results are important as they indicate that these lignans do not have genotoxic effects on lymphocytes, suggesting their safe medicinal use. Furthermore, the solvent dimethyl sulfoxide also did not demonstrate genotoxic effects, which is relevant, given its wide use as a solvent in experiments with other organic substances.

Keywords: Cytogenetic analysis, comet assay, genotoxic effects, lignans.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CLASSES GERAIS DE LIGNANAS.....	18
FIGURA 2. FÓRMULAS QUÍMICAS DAS LIGNANAS ISOLADAS DE FRUTOS DE <i>P. CUBEBA</i> : ETILCUBEBA, METILCUBINA, HINOQUININA, CUBEBA E DIHIDROCUBEBA.	24
FIGURA 3. CLASSE DE DANOS CELULARES.....	29
FIGURA 4. ÍNDICE DE DANOS NOS LINFÓCITOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS CN, DM, C, D, E E H EM DIFERENTES TEMPOS DE TRATAMENTO (4H, 24H, 48H, 72H).....	32
FIGURA 5. ÍNDICES DE DANOS CELULARES (ID) DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS NOS TEMPOS DE CULTURA DE 4H, 24H, 48H E 72H	33

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Linfócitos.....	13
3. Os diferentes mecanismos de danos ao DNA celular.....	14
3.1. Citotoxicidade.....	14
3.2. Clastogênese	14
3.3. Genotoxicidade e mutagenicidade	15
3.4. Apoptose.....	15
4. A Ciclofosfamida como indutor de danos ao DNA celular	15
5. A estrutura química das lignanas e suas propriedades	17
6. Os mecanismos de ação do extrato total, extrato etanólico e de lignanas isoladas da <i>Piper cubeba</i>	18
6.1. Atividade anti-inflamatória, analgésica e anti-histamínica dos extratos etanólicos da <i>P. Cubeba</i>	18
6.2. Ação antibacteriana e tripanomicida dos extratos brutos, lignanas e compostos semissintéticos extraídos de espécies do gênero <i>Piper</i>	19
6.3. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos da <i>P. cubeba</i>	20
6.4. Ação hepatoprotetora dos extratos PCEE de <i>P. Cubeba</i>	22
6.5. Ação anticancerígena dos extratos PCEE de <i>P. cubeba</i>	23
6.6. Ação clastogênica do extrato de sementes de <i>P. cubeba</i> em sistema celular in vivo.....	24
7. Objetivos.....	25
8. Materiais e métodos	25
8.1. Material Biológico e compostos químicos	25
8.2. Bioensaio e Teste Cometa	26
8.3. Controle das variações no ensaio cometa	27
8.4. Análise microscópica e estatística dos resultados	28

8.5. Premissas para o uso dos testes estatísticos adequados.....	30
9. Resultados.....	31
9.1. Análise da variação no índice de danos celulares	31
10. DISCUSSÃO	33
11. Conclusões.....	36
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
Apêndice A – Testes Kruskal-Wallis.....	45
Apêndice B – Teste ANOVA	51
Apêndice C - Diferentes tempos de cultura dos grupos experimentais	52
ANEXO A	60
ANEXO B	68
ANEXO C	73
ANEXO D	74

1. Introdução

O uso de plantas com fins medicinais vem se tornando algo presente na medicina tradicional, porém existem poucas pesquisas sobre os efeitos genotóxicos que muitas dessas plantas apresentam ao organismo. A planta *Piper cubeba* (*P. cubeba*), nativa das Ilhas de Java e Sumatra na Ásia, comumente conhecida como pimenta-de-Java, vem sendo pesquisada principalmente em relação as suas lignanas isoladas das sementes secas e possuem propriedades químicas únicas (Figura 1). As propriedades da espécie *P. cubeba* estão relacionadas as suas lignanas como a hinoquinina, dihidrocubebina e o próprio extrato total de *Piper cubeba*, assim, as lignanas desse estudo são de interesse pois já existem outros pesquisadores do laboratório de biotecnologia da UNESP-Ilha Solteira, as usando em outros ramos de pesquisa, além disso, esses compostos já estavam disponíveis no departamento de química e física da universidade. Ao mesmo tempo, esses compostos vêm sendo utilizados no tratamento fitoterápico de gonorreia, desinteria, sífilis, dores abdominais, enterite, asma e tumores em geral (SASTROAMIDJOJO, 1997).

Os linfócitos são um tipo de célula branca do sangue produzida na medula óssea vermelha. Essas células desempenham um papel central na defesa do organismo contra agentes infecciosos, fornecendo respostas imunológicas logo após o reconhecimento de patógenos específicos, tanto dentro das células quanto em outras partes do organismo, como tecidos e sangue (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). Os linfócitos podem atuar como um sistema sentinela para substâncias genotóxicas caso ocorram danos nas células sanguíneas ou em outras partes do organismo (NORDESON ET ALII, 1984).

O Teste do Cometa (Single Cell Gel Assay) é utilizado em estudos de citogenética e permite quantificar lesões e detectar os efeitos de reparo no DNA de células em nível individual. Assim, esse teste é de grande relevância devido ao seu potencial em fornecer resultados e informações sobre os efeitos genotóxicos (GONTIJO; TICE, 2003). Assim, o objetivo desse estudo é estabelecer uma padronização do Teste do Cometa para linfócitos humanos cultivados afim de se avaliar o potencial genotóxico das lignanas: cubebina, hinoquinina, dihidrocubebina e etilcubebina de *Piper cubeba*, em diferentes tempos (4h, 24h, 48h e 72h).

2. Linfócitos

Os linfócitos são células brancas presentes no sangue (leucócitos) com papel crucial no sistema imunológico, importantes na resposta imune inata e adquirida dos organismos, identificando e combatendo patógenos, como bactérias, vírus, fungos e células cancerígenas e mantendo a homeostase imunológica.

O equilíbrio entre diferentes subpopulações de linfócitos é crucial para uma resposta imune eficaz, evitando doenças autoimunes (COHN, L.; HAWRYLOWICZ, C.; et. al., 2013). Sendo assim, mesmo possuindo vários subtipos, eles atuam de maneira semelhante em diferentes vias metabólicas, sendo assim, são um tipo celular de interesse para analisar com um organismo reage a ação das lignanas de interesse nesse estudo.

Para compreender como eles se dividem e funcionam é necessário entender que eles não são agentes que atuam isolados, mas sim em conjunto, com ações autorregulatórias e codependentes uns dos outros e de condições intra e extracelulares. Desse modo, os diferentes meios intra e extracelulares interferem direta e indiretamente na ação de diferentes compostos naturais ou sintéticos que são testados em diferentes estudos científicos com diferentes protocolos de avaliação (BAUSINGER et. al., 2015).

Especificamente falando dos linfócitos, é importante ressaltar que, estudos que obtiveram análises via ensaios cometas, que utilizaram diferentes tipos de amostras sanguíneas (amostras de sangue total e amostras de sangue periférico) resultaram em dados distintos, pois as amostras possuíam populações celulares distintas, com diferentes estágios de vida e morte celular programada. Assim, é interessante salientar a importância dos estudos de linfócitos no dano ao DNA induzido em amostras de sangue humano medidas pelo ensaio cometa.

Bausinger et al. (2016) demonstra como o sangue periférico (sendo um material abundante) pode conter diversos tipos celulares em grandes quantidades, dentre esses tipos estão as células nucleadas presentes no sangue total do organismo, sendo elas expressivamente os neutrófilos (60-75%) e os linfócitos (20-30%), que são as células mononucleadas mais abundantes no sangue periférico (98%).

Assim, de modo geral, os linfócitos refletem o estado fisiológico do seu portador, sendo possível mensurar os níveis de danos mutagênicos ocasionados por

diferentes agentes genotóxicos pela análise dos danos que esses agentes ocasionam aos linfócitos expostos a eles.

Devido ao tempo transcorrido até o isolamento total da célula, os linfócitos possuem a capacidade de reparar os danos induzidos ao seu DNA, dependendo obviamente do tipo de mutação, embora essa capacidade seja mínima em células não estimuladas, essa variável se mostrou relevante.

Ao analisar agentes mutagênicos de diferentes naturezas, foi abrangido o máximo de tipos de alterações ao DNA existentes e detectáveis pelo ensaio cometa alcalino, sendo eles: os agentes alquilantes metil metanossulfonato (MMS) e N-etil-N nitrosourea (ENU) que induzem a efeitos de formação de sítios lábeis alcalinos, a irradiação gama γ que leva a quebra de cadeia de DNA, o Bromato de potássio ($KBrO_3$) visando a indução de danos oxidativos à base de DNA e o anti benzo [a] pireno-7,8-di-hidrodiol 9, O 10-epóxido (BPDE) composto que induz incisão de nucleotídeos durante o reparo do DNA (NER).

Os resultados dessas análises demonstraram baixos níveis de danos nas células expostas, tal efeito pode ser reflexo de mecanismos de reparo celular intrínseco desse tipo celular (um exemplo disso é o mecanismo celular de reparação dos danos nas fitas de DNA induzidos pela irradiação γ), indicando que os danos no DNA do tipo locais álcalis e lábeis, respectivamente ocasionados por radiações alquilantes e ionizantes, são significativamente menores em células linfocitárias.

3. Os diferentes mecanismos de danos ao DNA celular

3.1. Citotoxicidade

Segundo HORTON, N, C.; MATHEW, P, A. (2015) citotoxicidade é a capacidade que uma substância endógena ou exógena possui de inibir a proliferação celular ou causar danos e lesões a elas, que acarretem em morte celular por diminuição da capacidade de autorreparação de um tecido ou por degeneração pela morte celular, que pode ocorrer por diversos fatores agrupados em duas classes morfológicas, a necrose celular e a apoptose.

3.2. Clastogênese

Já a clastogênese refere-se à indução de danos aos cromossomos, resultando em quebras cromossômicas ou alterações em suas estruturas. Os agentes clastogênicos são substâncias com a capacidade de causar esses danos

cromossômicos, tais agentes podem incluir radiações ionizantes, produtos químicos e algumas classes de medicamentos (LARRAMENDY, M; SOLONESKI, S, 2019).

3.3. Genotoxicidade e mutagenicidade

A genotoxicidade diz respeito à habilidade algumas substâncias químicas em danificar a informação genética no interior celular, resultando em mutações, provocando alterações na sequência nucleotídica ou na estrutura em dupla hélice do DNA celular (SIZENANDO, J, A. J. et. al, 2008).

É comum a confusão entre os termos genotoxicidade e mutagenicidade, esta última refere-se às mutações que impactam a sequência dos nucleotídeos do material genético, onde as mutações podem ser originadas por erros na replicação do DNA durante a divisão celular, exposição a radiações ultravioleta ou ionizantes, substâncias químicas mutagênicas ou vírus. Sendo assim, é importante ressaltar que todos os agentes mutagênicos são genotóxicos, mas nem toda a substância genotóxica é necessariamente mutagênica (SILVA J, S, 2011).

3.4. Apoptose

Segundo Grivicich, I; Regner, A. et. al. (2007) a apoptose é conhecida como mecanismos de morte celular programada, sendo vital e importante para eliminar células desnecessárias ou defeituosas. Durante esse processo, as células passam por mudanças morfológicas, como retração, perda de aderência, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos e as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas são cruciais no controle dessa via.

A apoptose está relacionada a diversas doenças, incluindo o câncer (Gusson-Zanetoni, J. P. et. al, 2022) e compreender como os mecanismos apoptóticos funcionam levou o desenvolvimento de estratégias inovadoras para o tratamento contra tumores, ao induzir a morte de células tumorais e aumentar a eficácia dos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos (Gusson-Zanetoni, J. P. et. al, 2022).

4. A Ciclofosfamida como indutor de danos ao DNA celular

Quando lidamos com o sistema imune, também lidamos com o próprio metabolismo celular, visto que um não funciona sem o outro. Em relação a metabolização dos compostos radioativos e muitos produtos químicos que interagem

com nosso sistema, há presença de diferentes tipos de células imune visto que esses compostos acarretam em inflamações em maior ou menor grau.

Já em relação aos químicos, há ampla escala, existem as drogas de aplicação antitumorais, que podem acarretar impactos citotóxicos tanto nas células cancerígenas quanto nas células saudáveis próximas, devido a suas ações químicas diretas ou indiretas, através da formação dos metabólitos que se originam da metabolização do fármaco pelo organismo, a ciclofosfamida é um desses fármacos, sendo utilizada para o tratamento de diferentes tipos de tumores (EL-HALAWANY, A. M. et al., 2014).

Segundo diversos estudos realizados ao longo dos anos por Chamorro Cevallos et al. (2008); Viswanatha Swamy et al. (2013); Amien et al. (2015) e Li et al. (2015), a dose terapêutica desse quimioterápico acarreta em imunotoxicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e por fim mutagenicidade; devido a formação de diversos metabólitos citotóxicos que culminam em lesões oxidativas, principalmente no sistema hepático.

Assim, para atuar no organismo como um quimioterápico ou agente mutagênico, a ciclofosfamida precisa ser pelo sistema de oxidases funcionalmente misto presente no citocromo microssômico P450 dentro do sistema hepático (CEDERBAUM, I., 2015).

Dessa maneira, os constituintes farmacodinâmicos das ervas naturais em plantas complementares e a medicina alternativa tem sido considerada o principal alvo entre o combate ao dano hepático induzidos por quimioterápicos tradicionais (YIN, S. et. al., 2013).

A metabolização dos compostos químicos potencialmente perigosos aos organismos pelo citocromo P450 ocorre em duas fases, no geral, na primeira estão envolvidas reações oxidativas, redutivas e hidrólise, sendo todos esses processos mediados por diversas enzimas, as mais relevantes dentre elas são as *CYPs*.

Já na segunda etapa do processo, ocorrem reações catalisadoras de conjugação de substâncias lipofílicas com cofatores de natureza endógena com sulfatos, glutationas, ácido glucurônico ou acetatos (acetil-CoA), tais reações de conjugação podem ocorrer independentemente da fase anterior, entretanto, o produto hidroxilado, resultante da primeira fase pode ser conjugado enzimaticamente com compostos mais solúveis, tornando a excreção mais fácil. Porém, é frequente que as duas fases metabólicas atuem em conjunto para eliminar os xenobióticos.

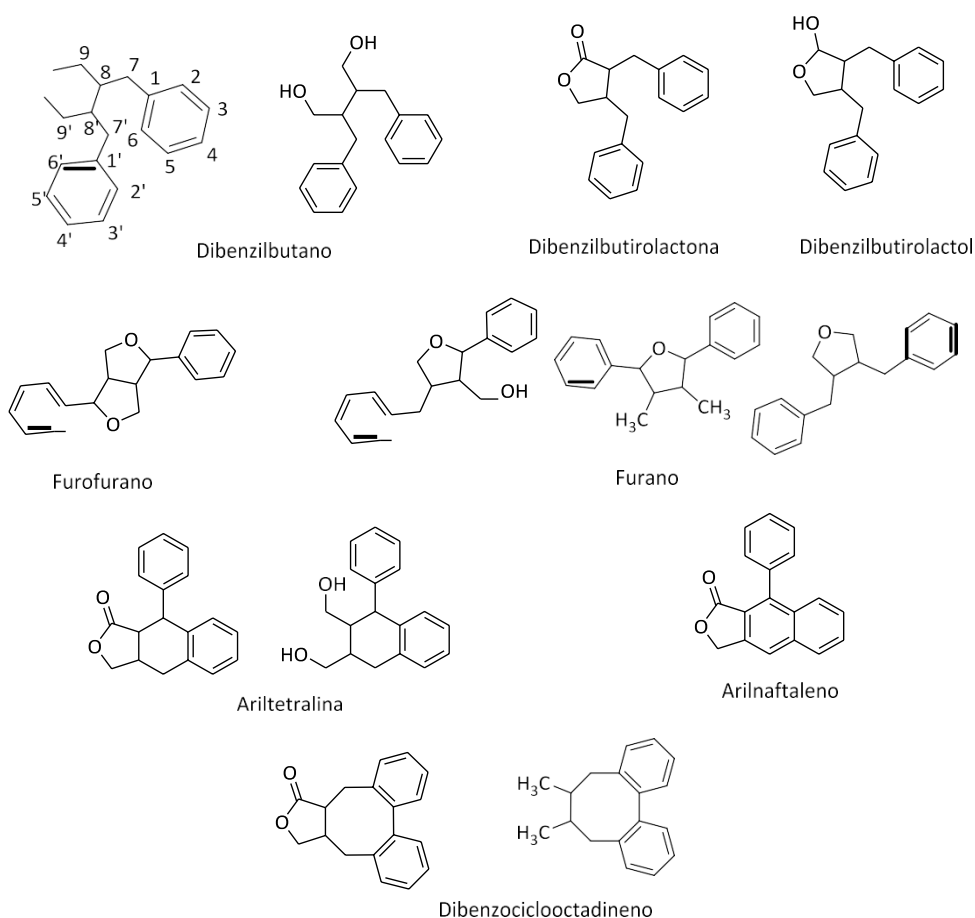
Devido essa especificidade e potencialidade do sistema de funcionalidade mista das enzimas oxidases do citocromo P450 em transformar compostos xenobióticos em substâncias ainda mais tóxicas e carcinogênicas, se tornou extremamente necessário buscar alternativas viáveis para conter e mitigar tais danos, causados inclusive pela ciclofosfamida, um quimioterápico amplamente utilizado, uma das alternativas para tal problema se encontra na vasta atuação já comprovada dos farmacodinâmicos dos compostos de origem vegetal (YIN, S. et al., 2013).

5. A estrutura química das lignanas e suas propriedades

Segundo Pissurno, et. al. (2017) as lignanas são uma das classes de metabólitos secundários de origem vegetal, que possuem um aspecto muito amplo de propriedades biológicas que estão intimamente correlacionados ao seu nível de oxidação, as propriedades dos seus anéis aromáticos e a sua estereoquímica, entretanto, suas propriedades possuem ações semelhantes que atuam por mecanismos diferentes em vias distintas no organismo.

A diversidade de lignanas ocorre devido ao processo de condensação de duas unidades de diastereisômeros ou epímeros, essas estruturas químicas diferem em somente um carbono quiral, sendo estruturas químicas com isomeria espacial e estrutural em forma de anel, que apesar de possuir propriedades físicas e químicas semelhantes, tais como pontos de fusão e ebulição semelhantes, possuem efeitos fisiológicos distintos e desviam a luz polarizada de modo diferente. Assim, as lignanas de modo genérico são fenilpropanóides de origem vegetal sintetizadas a partir do aminoácido fenilalanina, que pela ligação ao carbono C8 de cada unidade e dependendo do padrão de ciclização dos anéis e níveis oxidativos do esqueleto de carbono formam diferentes compostos.

Desse modo, para Marcotullio et al. (2014) elas são classificadas em 8 subgrupos distintos (Figura1), dependendo do padrão bioquímico de seu fenilpropanóide, tendo uma grande variedade estrutural de lignanas já identificadas em diversas plantas ao longo das últimas décadas.

Figura 1. Classes gerais de lignanas

Fonte: MARCOTULLIO et al.,2014.

6. Os mecanismos de ação do extrato total, extrato etanólico e de lignanas isoladas da *Piper cubeba*

Antes de descrever as ações dessas substâncias, é importante destacar que apesar das inúmeras atividades atribuídas a elas, as vias de atuação dessas substâncias são semelhantes no combate a patógenos e agentes mutagênicos em diferentes vias metabólicas.

6.1. Atividade anti-inflamatória, analgésica e anti-histamínica dos extratos etanólicos da *P. Cubeba*

As lignanas do gênero *Piper* possuem diversas funções, dentre elas está a função anti-inflamatória (CHOI E, M. HWANG J, K., 2013). Neste contexto, Tonini (2009) analisou o extrato de metanol e etanólico extraídos dos frutos da *P. cubeba* (PCEE) a fim de investigar suas influências dentro do sistema imune em organismos modelo. As análises da pesquisa demonstraram uma grande interação desse extrato

com o sistema imune, em duas vias principais: uma inibidora e outra estimuladora; ambas atuando para amenizar a resposta inflamatória.

Esse extrato agiu regulando negativamente a atividade de citocinas pró-inflamatórias que expressam por exemplo a interleucina 6 (IL-6) secretada por linfócitos T, macrófagos e fator de necrose tumoral (TNF- α), secretado principalmente por células naturais Killers (NK), macrófagos e linfócitos T (TONINI, G., 2009).

Concomitantemente, o PCEE regula positivamente a expressão de genes protetores HO-1, *iNOS* e da interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória e imunossupressora, que inibem a síntese de citocinas humanas que suprimem macrófagos, células naturais Killers (NK) e linfócitos T, sendo sintetizada principalmente por: mastócitos, linfócitos citotóxicos CD8+, linfócitos B e linfócitos T do tipo auxiliares (GOODEN, M.; G., LEFFERS, N. et al., 2011).

6.2. Ação antibacteriana e tripanomicida dos extratos brutos, lignanas e compostos semissintéticos extraídos de espécies do gênero *Piper*

Além da atividade anti-inflamatória dos extratos obtidos do gênero *Piper*, existem estudos que procuram compreender a ação antimicrobiana contra uma gama extensa de bactérias, fungos e parasitas. Sobre tais propriedades Silva, et al. (2007) buscou averiguar diferentes substâncias estudando o extrato bruto de sementes de *P. cubeba*, as lignanas cubebina e hinoquinina e o O-benzil cubebina (derivado semissintético da cubebina), avaliando suas atuações contra patógenos orais, obtendo diferentes resultados promissores.

Ao longo desse trabalho foi possível observar que o extrato bruto de etanol na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ foi mais eficaz contra *Streptococcus salivarius*, e a lignana cubebina demonstrou maior eficiência em valores variáveis de 0,20 mm para *Streptococcus mitis* a 0,35 mm para *Enterococcus faecalis*. Entretanto, a hinoquinina (um derivado semi-sintético da cubebina) e o extrato bruto exibiram aptidão bacteriostática em todas as concentrações analisadas (SILVA, et al., 2007).

Todavia, outro resultado promissor obtido por Silva, et al. (2007), influi que as amidas 5a-5e da (-)-cubebina então oxidadas e derivadas de succinimida correspondentes as amidas 6a-6e, teve sua citotoxicidade analisadas, destes compostos este é o primeiro relatório sobre a síntese de derivados de succinimida e ao comparar os valores de IC50 verificou-se que algumas das amidas sintéticas derivadas têm maior atividade do que os compostos originais cubebina e hinoquinina,

assim, a presença de carbonilas ligadas aos carbonos nove das cubebinas associadas a introdução de grupamentos polares nos anéis aromáticos otimiza a função antimicrobiana das succinimida semissintéticas.

Para buscar compreender os diferentes mecanismos de atuação antimicrobiana desses compostos, Magalhaes, et al. (2012) extraiu a partir do óleo essencial de *P. cubeba* extratos e os colocou em meio de cultura com cercarias e vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, avaliando a citotoxicidade do óleo essencial (PC-EO). Desse modo, verificaram que o PC-EO possui citotoxicidade significativa somente na concentração de 200 µg/ml e após 24h de incubação.

Entretanto, os resultados obtidos por essa pesquisa são importantes porque revelam o tipo de ação do PC-EO, apontando seus efeitos contra cercarias e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* ao diminuir a viabilidade desses microrganismos por prejudicar a síntese de ovos e por influenciar no desacoplamento dos vermes adultos.

Já em outro estudo, executado por Bodiwala, et al. (2007) os extratos: acetato de etila, metanol, n-hexano e acetona obtidos de duas espécies do gênero *Piper* (*P. cubeba* e *P. retrofractum*) foram avaliados afim de investigar seus potenciais mecanismos contra promastigotas de *Leishmania donovani* em ambiente *in vitro*. Tais resultados indicaram que todos os compostos possuíam ação significativa na concentração 100µg/ml.

Em uma etapa posterior, dois compostos foram extraídos, a cubebina e a piperina afim de testar sua ação anti-leishmanial, revelando que essas substâncias possuem ação potencialmente maior que as demais testadas na etapa anterior, na concentração de 100µM *in vitro*. Em uma terceira etapa, essas duas substâncias foram testadas *in vivo* em hamsters com leishmaniose visceral e os resultados demonstraram que a piperina possui ação eficaz superior na concentração 30mg/kg. Sendo assim esses autores trouxeram o primeiro relato da ação anti-leishmanial de duas plantas do gênero *Piper* e seus extratos isolados.

6.3. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos da *P. cubeba*

Ao interagir positivamente na síntese dos genes protetores *HO-1* e *iNOS*, Rodriguez (2007) observou efeitos antioxidantes do extrato de metanol etanólico (PCEE) obtidos de sementes da *P. cubeba*. Falando especificamente do gene *HO-1*, um dos principais responsáveis pela expressão da enzima Heme oxigenase, que age na clivagem do ferro livre e catabolismo do grupo heme das hemácias em biliverdina

(composto intermediário da bilirrubina), o déficit dessa enzima acarreta em inflamações agudas e até morte celular prematura. Portanto, quando PCEE aumenta a expressão do *HO-1* as respostas anti-inflamatórias e antioxidantes são potencialmente maiores.

Entrementes, Rodriguez (2007) também comprovou que quando o PCEE estimula a síntese do gene *iNOS*, há um aumento nos processos antioxidantes. Segundo Servato (2016), esse gene regula positivamente a síntese da enzima óxido nítrico sintase induzível que participa de diversos processos inflamatórios, estando então relacionado a resposta imunológica e também a mecanismos de regulação cardiovascular e neurológicos, pois atua no desenvolvimento de vasos sanguíneos e neurônios e na regulação positiva do crescimento celular.

Portanto, pode-se alegar que o gene *iNOS* está incluído entre os mediadores intracelulares que induzem a expressão de moléculas reguladoras do crescimento celular (SERVATO, 2016). Porém, a funcionalidade desse gene depende da sua concentração, duração de exposição e sensibilidade intrínseca das células, assim ao estimular positivamente o *iNOS*, o PCEE age indiretamente na antioxidação e proliferação celular.

Concomitantemente, Aboul-Enein, et al (2011) ao estudar outros tipos de compostos isolados de *P. cubeba*, os CNCs, comprovou uma alta capacidade de eliminação direta de radicais livres. Ao testar os CNCs de acordo com sua capacidade em eliminar diferentes formas reativas de oxigênio como hidroxilas (OH), radicais aniônicos superóxidos (O) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) – um radical livre estável; presentes em diferentes sistemas, pelos métodos de quimioluminescência, ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido, (DMPO).

Foi evidenciado por meio de reações de Fenton (íons Fe^{2+} provenientes do reagente ferrozina) a inibição da formação de 5% a 57% dos radicais do tipo DMPO-OH na concentração 1,25 mmol/L. Do mesmo modo, os CNCs também demonstraram alta atividade antirradical do tipo DPPH variando de 15% a 99% na concentração de 5 mmol/L.

Desse modo, o estudo executado por Aboul-Enein, et al. (2011) corrobora com a existência de compostos de *P. cubeba* isolados que possuem aptidão para executar atividades catalíticas de conversão de radicais superóxidos gerados em sistemas potássio/éter, tendo uma atuação análoga à enzima superóxido dismutase (SOD), a

responsável por converter radicais superóxidos em peróxidos de hidrogênio e oxigênio, sendo crucial para evitar o estresse oxidativo celular excessivo.

6.4. Ação hepatoprotetora dos extratos PCEE de *P. Cubeba*

Outras funcionalidades dos extratos de *P. cubeba* também foram comprovadas por outras pesquisas. Entre esses estudos, destaca-se o de Amol et al. (2013), que ao avaliar os extratos aquosos e metanólicos dos frutos de *P. cubeba* descobriu efeitos inibitórios contra o vírus da hepatite C.

Especificamente, o extrato etanólico foi considerado eficiente na prevenção de danos hepáticos induzidos pela droga tetracloreto de carbono (CCl_4) em ratos, demonstrando que o tratamento com extrato de metanol e etanólico (PCEE) dose-dependente impediu o aumento nos níveis séricos de enzimas hepáticas ocasionados por essa droga.

Além disso, o extrato etanólico diminuiu expressivamente a peroxidação lipídica no tecido hepático, restaurando a ação enzimática antioxidante de defesa NP SHandCAT. Tais propriedades do PCEE são atribuídas à sua capacidade de regular negativamente citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e a interleucina *IL-6*, e regulação positiva da expressão dos genes protetores *iNOS* e *HO-1* e de interleucina *IL-10*, capacidades já descritas em estudos anteriores como os estudos de ABOUL-ENEIN, A. et al. (2011); AMOL, et al. (2013); BODIWALA, et al. (2007); CHOI, E. M. et al. (2013); GOODEN, M. G. et al. (2011); RODRIGUEZ (2007); SERVATO, (2016); SILVA, et al. (2007); TONINI, G. (2009).

Concomitantemente, em outro estudo sobre essas mesmas propriedades Tamadher (2013), por meio de histopatologia comprovou que o PCEE e a silimarina, um fármaco usado como protetor hepático, extraído do fruto da *Silybum marianum* e comercializado na forma de extrato seco, são capazes de prevenir danos hepáticos também induzidos por CCl_4 nos hepatócitos de ratos.

Enquanto o CCl_4 alterou expressivamente os níveis de enzimas séricas e proteínas totais, o PCEE atenuou tais níveis por meio de processos antioxidativos. As lâminas histológicas das seções do tecido hepático tratados com extratos aquoso, alcoólico, acetônico e clorofórmio o PCEE, mostrou a ausência de necrose tecidual e infiltração de lipídeos, além de cordões hepáticos normais, evidenciando as propriedades hepatoprotetoras do PCEE.

Desse modo, ambos os estudos corroboram entre si, comprovando que o extrato de metanol e etanólico (PCEE) dos frutos da *P. cubeba* atuam respectivamente, inibindo o vírus da hepatite C, prevenindo danos nos hepatócitos de ratos ocasionados por drogas como o CCl₄ e ciclofosfamida (CP), reduzindo os níveis de enzimas séricas e proteínas totais e também diminui significativamente a peroxidação lipídica, além de reparar as funções enzimáticas antioxidantes que previnem danos nos hepatócitos.

6.5. Ação anticancerígena dos extratos PCEE de *P. cubeba*

Gusson-Zanetoni, J, P. et. al (2022) descreve as lignanas cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, metilcubebina e hinoquinina extraídas da *P. cubeba* com diferenças estruturais somente em relação ao anel de 4 membros (Figura 2). Na cubebina este anel é um lactol, uma estrutura cíclica formado a partir da reação de um álcool com uma carbonila ou uma hidroxila, na hinoquinina esse anel é uma lactona, um éster também cíclico formado a partir da condensação de um álcool a um hidroxiácido sujeito a esterificação.

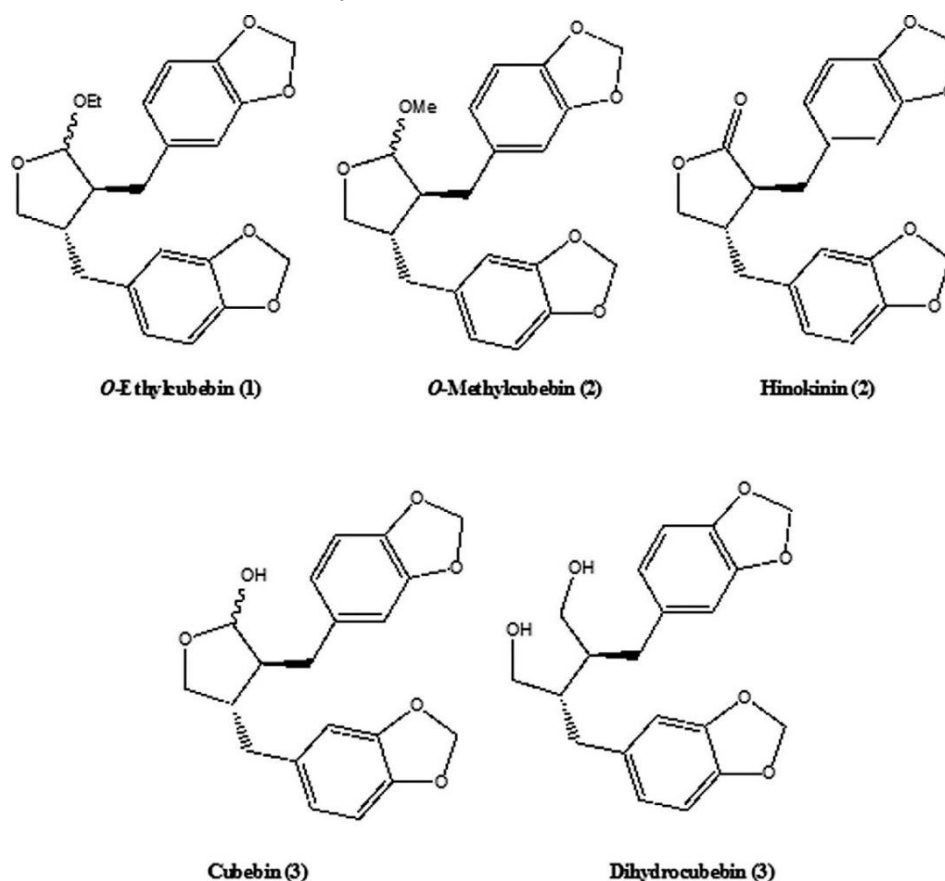
Já na dihidrocubebina há uma ligação CH₂OH aos carbonos onde o anel se conecta aos outros anéis da estrutura, enquanto que na metilcubebina e etilcubebina o anel é um acetal, que são formados e conversíveis em aldeídos ou cetonas, tendo o mesmo estado de oxidação no carbono central, mas com estabilidade química e reatividade substancialmente diferente em comparação com os compostos carbonílicos.

Portanto, tais diferenças estruturais e químicas influenciam na taxa de solubilidade, na maior ou menor rigidez molecular e no modo como esses compostos interagem no meio extra e intracelular, acarretando em semelhanças ou diferenças nas suas propriedades biológicas.

Desse modo, de acordo com Gusson-Zanetoni, et. al. (2022) é possível dizer que as lignanas isoladas (cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, podofilotoxina, metilcubebina e hinoquinina) não mudaram a morfologia celular, mais atenuaram a proliferação e migração celular, sendo pouco citotóxico, mas com efeitos genotóxicos, possivelmente pela atividade moduladora na expressão de genes e proteínas ligados a processos inflamatórios. É possível dizer também que as lignanas cubebina e metilcubebina exercem maior ação antiproliferativa, anti-migratória e genotóxica sobre

células tumorogênicas orais e de laringe, tendo potencial para o desenvolvimento de novas terapias medicinais para esses tipos de tumores.

Figura 2. Fórmulas químicas das lignanas isoladas de frutos de *P. cubeba*: etilcubebina, metilcubina, hinoquinina, cubebina e dihidrocubebina.



Fonte: GUSSON-ZANETONI, 2022

6.6. Ação clastogênica do extrato de sementes de *P. cubeba* em sistema celular *in vivo*

Concomitantemente, ao Junqueira et al. (2007) examinar os resultados sobre às aneuploidias e clastogenicidade do extrato retirado das sementes de *P. cubeba*, estados por ensaios com micronúcleos e ensaio cometa, os dados obtidos entre ambos os testes corroboraram parcialmente.

Na comparação do controle negativo com o extrato da semente de *P. cubeba* houve um aumento do número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados e de células da medula óssea coletadas após 48hs e 72hs de tratamento, como

esperado, esse resultado é semelhante ao de amostras tratadas com N nitroso-N-etiluréia (ENU), um agente mutagênico amplamente conhecido.

Porém, mesmo que em comparação com o controle negativo tenha havido um aumento relevante no número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados, a proporção de eritrócitos policromáticos e de eritrócitos normocromáticos entre as cobaias tratadas com N nitroso-N-etiluréia (ENU) e com extrato das sementes de *P. cubeba* não mostrou diferenças estatísticas em relação ao controle negativo (JUNQUEIRA et al., 2007).

Sendo assim, Junqueira et al. (2007) concluiu que os extratos das sementes de *P. cubeba* nas condições descritas acima, não apresentaram propriedades citotóxicas *in vivo*. Entretanto, quando administrados em altas doses, há um aumento significativo na média de células com danos ao DNA e aumento no número de micronúcleos, indicando que os extratos possuem toxicidade genética moderada.

7. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram padronizar o Teste do Cometa para linfócitos humanos cultivados e avaliar o potencial genotóxico de lignanas de *Piper cubeba* por meio da quantificação de danos ao DNA realizada pelo Teste Cometa neste tipo celular.

8. Materiais e métodos

8.1. Material Biológico e compostos químicos

Para a obtenção dos linfócitos humanos, foi coletada uma amostra de sangue de um voluntário, com o devido termo de consentimento assinado. Essas células foram expostas a vários grupos de tratamentos com diferentes lignanas: cubebina, hinoquinina, dihidrocubebina e etilcubebina de *Piper cubeba* (todas diluídas em DMSO), cedidas na forma concentrada pela Prof^a Dr^a Rosângela da Silva Laurentiz, do Departamento de Físico-Química da FEIS/UNESP e depois diluídas em laboratório (Anexo B).

Foram utilizados também dois tipos de controle positivo indutores de danos ao DNA: a ciclofosfamida em duas concentrações diferentes 50 µg/ml (CP1) e 100 µg/ml (CP2) e o dimetilsulfóxido (DM), um solvente universal amplamente utilizado, na concentração de 50 µg/ml. Todos os compostos foram testados por 4h, 24h, 48h e 72 horas na concentração de 50 µg/ml, exceto o controle positivo ciclofosfamida (CP1 e

CP2), que foram testados somente no tempo de 72 horas, pois em estudo prévio executado por BARBOZA (2018) o composto não demonstrou ser um controle positivo efetivo, sendo necessário ajustar as dosagens e o tempo de coleta das amostras.

8.2. Bioensaio e Teste Cometa

O protocolo escolhido para avaliar esses danos foi o ensaio cometa, visto que esse método é amplamente utilizado em diferentes modalidades de monitoramento de danos celulares, sendo possível mensurar danos no DNA a um nível celular individual.

Além disso, é um método que apresenta simplicidade e facilidade de execução, permitindo uma boa medição de danos em células expostas a agentes genotóxicos, os procedimentos e medidas utilizadas se encontram descritos nos Anexos A, B e C.

Foram utilizados 8 tratamentos: um controle negativo (sem qualquer tipo de tratamento-CN), um grupo controle do solvente dimetilsulfóxido (DM) - utilizado para a diluição das lignanas, um controle positivo (CP), ciclofosfamida em duas concentrações diferentes (CP1 e CP2) e quatro tratamentos com 50 µg/ml de cada uma das seguintes lignanas: cubebina (C), dihidrocubebina (D), etilcubebina (E) e hinoquinina (H).

Cada tratamento foi avaliado em diferentes tempos de cultura: 4h, 24h, 48h e 72h, exceto os tratamentos CP, que foram avaliados somente no tempo de 72h. A concentração de 50 µg/ml foi escolhida para todos os grupos experimentais, (exceto o CP2), com base no trabalho “Investigação da Proliferação Celular pelo Efeito das Lignanas Extraídas da *Piper cubeba* no Câncer do Colo do Útero” (GUSSON-ZANETONI et al., 2022)

Para a realização das culturas celulares, foram coletados 20mL de sangue periférico de um doador voluntário. A coleta foi realizada com seringa estéril descartável, por profissional qualificado. As culturas de linfócitos foram desenvolvidas por 72 horas, segundo a técnica de Moorhead et al. (1960), com modificações, de acordo com protocolo utilizado pelo Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

Para cada um dos tempos de tratamento (4h, 24h, 48h e 72 horas) de cada um dos grupos experimentais, foi preparado um frasco de cultura, no qual foram adicionados 3mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 20% de soro fetal

bovino, antibiótico (penicilina) (100U/ml) e fito-hemaglutinina (PHA-Gibco 0,2mL/5ml de meio).

Decorrido o tempo de cultura, o conteúdo de cada frasco foi transferido para um tubo de ensaio e submetido à centrifugação de 900 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado com o auxílio de bomba a vácuo e as células foram delicadamente ressuspensas antes de serem utilizadas para o Teste do Cometa, os procedimentos dessas etapas do ensaio estão descritos nos Anexos C e D.

O potencial genotóxico de lignanas de *Piper cubeba*, foi avaliado por meio da quantificação de danos do DNA realizada através do Teste do Cometa nos grupos experimentais. Foram utilizadas lâminas de extremidades foscas mergulhadas em uma mistura de PBS (*Phosphate Buffer Solution*) e agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Agarose* - NMP) para que ficasse uma fina película do composto sobre a lâmina. Com a amostra celular, foi misturada agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Temperature Agarose* - LMP).

Após esse procedimento, a etapa de lise foi aplicada para que as membranas das células fossem rompidas e, na sequência, realizou-se a eletroforese. Em seguida, foi executado o processo de neutralização das lâminas e a fixação com álcool etílico 100% (Anexos A e B).

8.3. Controle das variações no ensaio cometa

O Teste do Cometa (Single Cell Gel Assay), é utilizado em estudos de citogenética e, por meio dessa técnica, é possível quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA de células em nível individual. Assim, o teste é de grande relevância pelo seu potencial em resultados e em informações sobre os efeitos genotóxicos (GONTIJO, A, M, M, C. et. al.,2013).

A variabilidade nos resultados obtidos pelo ensaio cometa é uma questão crucial, quer seja em experimentos diferentes que utilizem essa técnica, quer seja em experimentos semelhantes dentro do mesmo laboratório ou entre laboratórios diferentes.

De acordo com Collins et.al. (2014) as etapas críticas, com maior índice de variação durante a execução do ensaio cometa são: determinação da concentração de agarose, tempo de incubação alcalina e as condições durante o processo de eletroforese (tempo, temperatura e gradiente de tensão).

Entretanto, mesmo controlando essas etapas, pode persistir níveis diferentes de variações experimentais, obtidas no mesmo laboratório ao longo de muitos experimentos, em experimentos com as mesmas amostras e em laboratórios diferentes, com resultados obtidos por pessoas diferentes com o mesmo tipo de amostra (variações intraindividuais), entre amostras diferentes e entre amostras iguais (ERSSON et. al., 2011).

Assim, para diminuir drasticamente as fontes e etapas críticas que ocasionam variações nos resultados interlaboratoriais, intralaboratoriais, interindividuais, intraindividuais e as variações residuais, foi estritamente importante padronizar e normalizar o protocolo cometa, pois, variações pequenas são inevitáveis, sendo abarcadas no que chamamos coeficiente de variação (CV), sendo plausível utilizar os padrões de referência para melhorar a precisão dos resultados amostrais (FORCHHAMMER, L et al., 2010).

Afim de minimizar tais variações, foi incluído no experimento grupos padrões de referência de um único lote, ou seja, lâminas que possuem células com uma quantidade de danos no DNA previamente conhecidos, sendo denominadas controles positivos (CP) e lâminas cuja as células não foram tratadas, denominadas assim de controle negativo (CN).

No caso desse experimento, foi utilizado dois controles positivos diferentes, a ciclofosfamida (CP) em duas concentrações (CP1) e (CP2) e o dimetilsulfóxido (DM), um solvente amplamente utilizado, afim de descobrir se tal substância poderia acarretar em danos mutagênicos e como controle negativo (CN), foi utilizado linfócitos sem nenhum tipo de tratamento.

Os padrões de referência são de extrema importância, especialmente em experimentos de longos períodos, como por exemplo, em análises de uma grande quantidade de amostras de linfócitos, em um ensaio de biomonitoramento humano ou em experimentos repetitivos, auxiliando na correção de resultados muito anômalos durante o processamento amostral, principalmente quando o número de amostras for muito elevado e o experimento prolongado, dando maior confiabilidade e solidez ao estudo (AZQUETA et. al., 2013).

8.4. Análise microscópica e estatística dos resultados

As lâminas, depois de fixadas, foram coradas com uma solução de *Gel Red* diluída 10.000x em NaCl 1M e água destilada, depois foram estudadas em

microscópio de fluorescência em aumento de 400x. Foram analisadas 2.000 células por grupo experimental.

Os núcleos celulares foram classificados em uma classe de dano que é determinada de acordo com a intensidade e tamanho da cauda do cometa (Figura 3) (KOBAYASHI, 1995).

Classe 0 – sem danos aparente;

Classe 1 – cauda curta, menor que o diâmetro do núcleo;

Classe 2 – comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo;

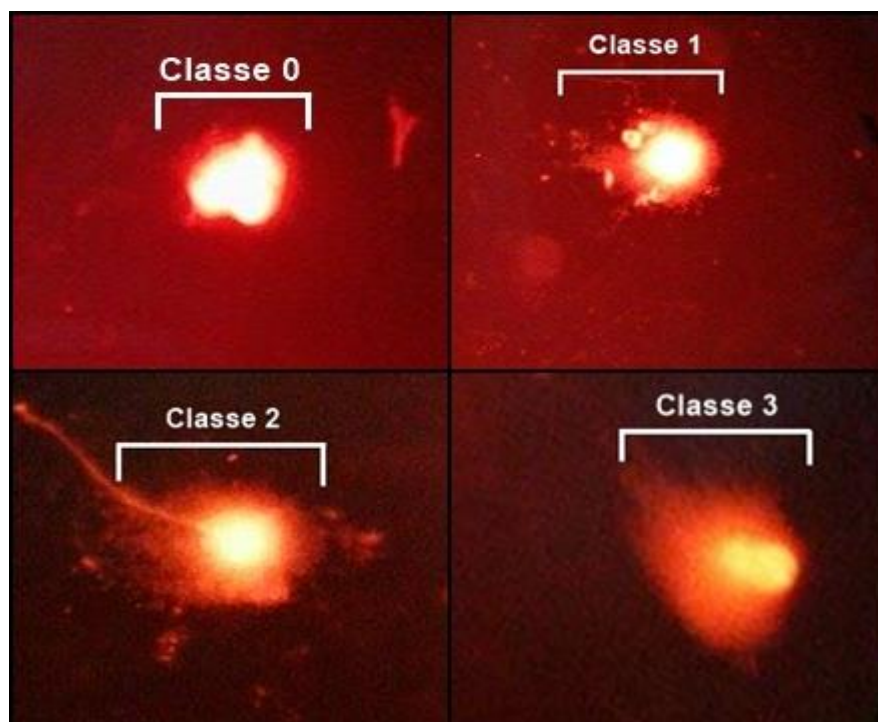
Classe 3 – comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo.

A estatística dos dados foi baseada no teste de Shapiro-Wilk e análise de variância (teste F) onde resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

O Índice total de danos (ID total) foi calculado pela fórmula abaixo, onde n refere-se ao número de células de cada classe de danos:

$$ID_{TOTAL} = 0 \times (n \text{ Classe } 0) + 1 \times (n \text{ Classe } 1) + 2 \times (n \text{ Classe } 2) + 3 \times (n \text{ Classe } 3).$$

Figura 3. Classe de danos celulares



Fonte: dados do próprio autor

8.5. Premissas para o uso dos testes estatísticos adequados

Para avaliar estatisticamente esses grupos com variáveis independentes que possuem uma relação variável dependente de ordem contínua, o teste estatístico Kruskal – Wallis, também conhecido como análise de variância unilateral do tipo não paramétrico, juntamente com o teste ANOVA two way bidirecional com medidas repetidas foram os mais adequados.

Para realizar uma avaliação estatística correta usando o teste Kruskal – Wallis, algumas premissas foram seguidas, elas são: a variável dependente precisa ser analisada em níveis contínuos, especificamente em intervalos de tempo de 4h, 24h, 48h e 72h, a variável independente é composta por oito grupos distintos (CN, DM, CP1, CP2, C, D, E e H) categorizados em score de dano celular alto, médio e baixo, atendendo à exigência de ter duas ou mais categorias independentes.

Garantiu-se a independência nas observações, com análises independentes asseguradas pela codificação das lâminas, teste cego e pela presença de substâncias diferentes em cada grupo, embora essa premissa seja mais relacionada ao desenho do estudo, ela foi rigorosamente mantida para garantir a integridade dos resultados.

A interpretação correta dos resultados estatísticos também é necessária, determinando se as distribuições em cada grupo tinham a mesma forma e variabilidade, se as distribuições eram iguais e se as medianas da variável dependente podiam ser comparadas entre os grupos, porém se as distribuições fossem diferentes, apenas as classificações das médias poderiam ser comparadas.

Entretanto, ao realizar o teste Kruskal-Wallis é necessário ter em mente que não é possível especificar qual ou quais grupos e suas variáveis independentes possuem diferenças estatísticas significativas, sendo apenas possível aferir se existe no mínimo dois grupos estatisticamente diferentes.

Porém, pode haver um número superior a isso, assim, para determinar quantos e quais grupos poderiam ser estatisticamente distintos, foi necessário executar outro teste estatístico e de acordo com a natureza dos dados dessa pesquisa o melhor teste designado foi o ANOVA two – way bidirecional com medidas repetidas executado no programa GraphPad Prism10.

Para Ribeiro, L. (2020) o ANOVA two – way bidirecional com medidas repetidas é uma técnica estatística que avalia o impacto de duas variáveis independentes (fatores) em uma variável dependente contínua, onde uma delas é temporal e a outra categórica, onde o principal objetivo é compreender como cada

variável independente ou fatores afetam as variáveis dependentes e se existe ou não interação entre elas, tal interação ocorrerá quando o efeito de um fator variar de acordo com os níveis da outra variável.

Esse teste também verifica se existe variabilidade entre os sujeitos da amostra e se isso afeta nos resultados, buscando evidências de que os fatores influenciam as variáveis dependentes, levando em conta as interações e a influência da variabilidade entre os sujeitos. A hipótese nula assume que essas influências não existem, já a hipótese principal considera que pelo menos uma delas influencia significativamente as variáveis dependentes.

Para Ribeiro, L. (2020) se o valor de F for significativamente diferente do valor previsto no intervalo de confiança, no caso desse estudo é de 95%, indica que há uma influência do fator nas variáveis dependentes em pelo menos um grupo de dados, o contrário também é válido.

Entrementes, para tais comprovações, é necessário que algumas considerações sejam respeitadas, elas são: o número de grupos deve ser quatro ou mais; os fatores envolvidos devem ser dois, sendo um deles sempre temporal; o número de amostras deve ser duas ou mais; e cada amostra deve ser medida pelo menos duas vezes em momentos diferentes.

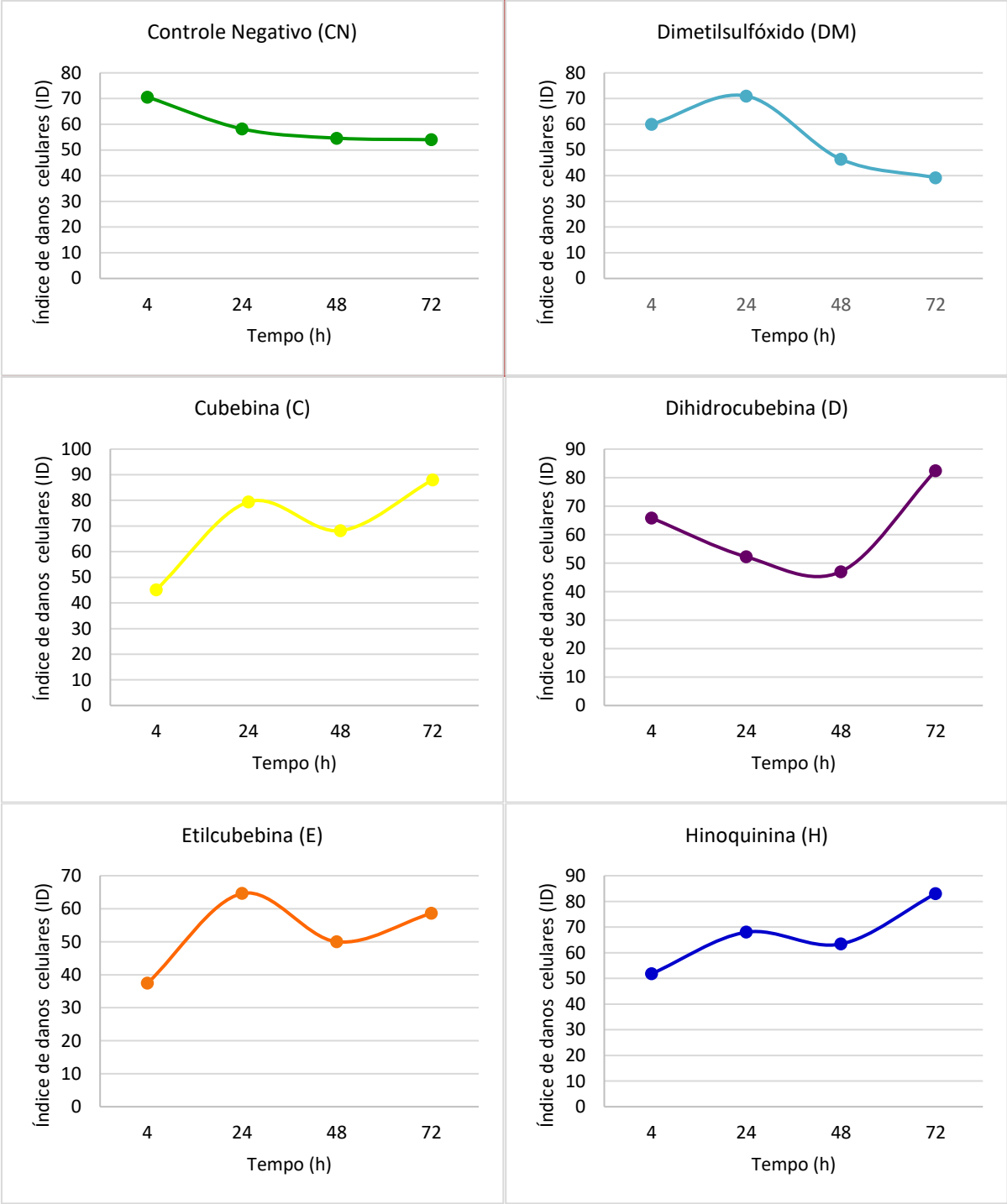
Desse modo, as análises estatísticas aplicadas possibilitaram avaliar quantitativamente a relação entre o resultado do experimento e a distribuição esperada para o fenômeno e testar se o conjunto de amostras tinha origem na mesma distribuição, avaliando a hipótese nula de que todas as populações possuíam funções de distribuição iguais contra a hipótese principal de que ao menos duas das populações possuíam funções de distribuição diferentes avaliadas pelo teste Kruskal-Wallis não paramétrico, apêndice A.

9. Resultados

9.1. Análise da variação no índice de danos celulares

Foi analisada a variação no índice de danos celulares (ID) em cada grupo experimental nos tempos de 4h, 24h, 48h, 72h de cultura celular (Figura 4) e para o grupo ciclofosfamida (CP) nas duas concentrações CP1 e CP2 foi analisada a variação no índice de danos celulares (ID) somente no tempo de 72h.

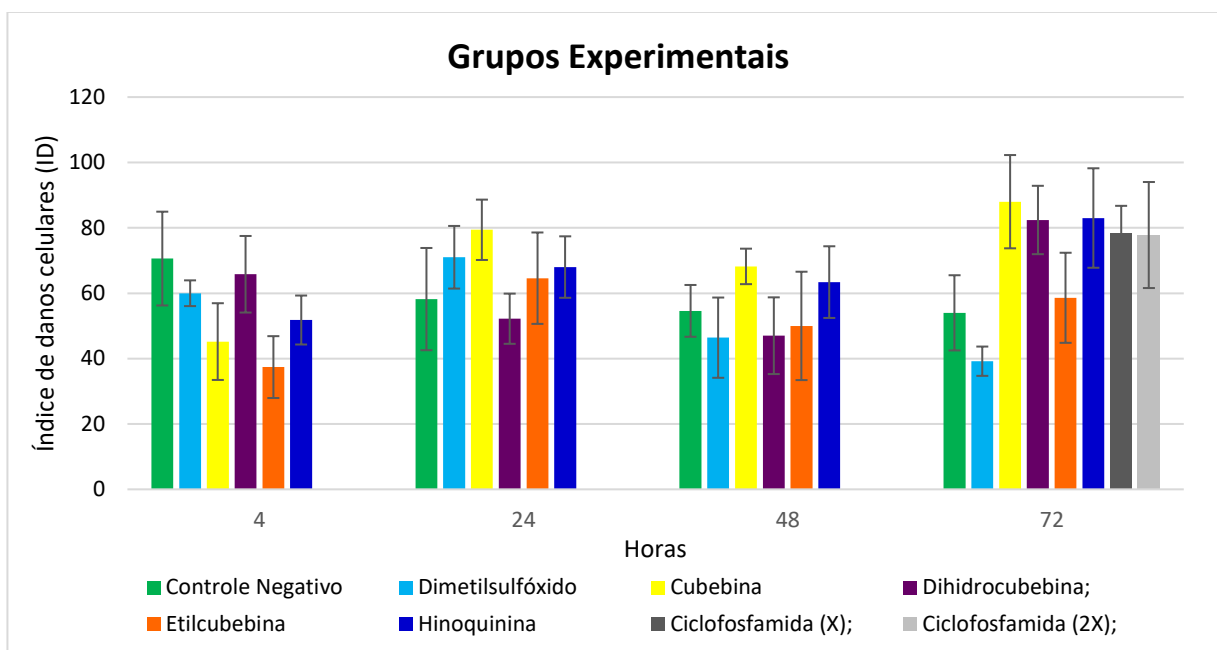
Figura 4. Índice de danos nos linfócitos dos grupos experimentais CN, DM, C, D, E e H em diferentes tempos de tratamento (4h, 24h, 48h, 72h)



Fonte: Dados do próprio autor

Também foram comparados os índices de danos celulares dos grupos experimentais dentro de cada tempo de tratamento (Figura 5), apêndice C, e não foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos considerando cada tempo de cultura utilizado.

Figura 5. Índices de danos celulares (ID) dos grupos experimentais nos tempos de cultura de 4h, 24h, 48h e 72h



Fontes: dados do próprio autor

10. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram considerados oito tratamentos avaliados em diferentes tempos: 4h, 24h, 48h e 72h. O teste cometa permitiu avaliar se existiam ou não diferenças estatísticas entre os intervalos dentro de um mesmo tratamento e entre tratamentos distintos.

De modo geral, a figura demonstra que neste estudo o erro padrão, métrica fundamental para avaliar a precisão da média dos tratamentos e determinar se ela representa adequadamente a média real da população, de todos os tratamentos é considerado muito alto em relação à média amostral. Isso indica que há uma elevada variação das médias amostrais em relação à média populacional, resultando em uma dispersão significativa dos dados o que, de certa forma, justificaria as ausências de diferenças significativas entre os tratamentos e tempos.

Esse alto nível de variabilidade pode ser atribuído a alguns cenários, tais como: um problema na representatividade das amostras, uma alta variabilidade intrínseca das células ou distribuição não normal dos dados. Essas informações destacam a importância de considerar as especificidades dessas amostras ao interpretar os resultados estatísticos desse estudo, essas especificidades estão relacionadas ao tipo celular avaliado, a escolha do agente mutagênico, as especificidades das próprias lignanas e também as limitações do próprio método de avaliação.

Os linfócitos não atuam de modo isolado, eles possuem ações autorreguladoras e codependentes dentro e fora do meio celular. Sendo assim, mesmo que esse estudo avalie esse tipo celular de maneira global, quando coletado vários tipos diferentes de linfócitos em diferentes fases de desenvolvimento que estavam presentes no sangue periférico do doador, cada tipo específico de linfócito reage de maneira própria na presença dos compostos químicos usados, isso pode ter modulado os resultados.

Concomitantemente, esse tipo celular possui uma característica diferencial, a capacidade de reparação celular diante de danos induzidos ao seu DNA, dependendo obviamente do tipo de mutação lábil e álcalis que os afetam. Todavia, mesmo essa capacidade sendo mínima em células não estimuladas, é uma característica muito relevante para compreender os resultados dessa pesquisa, pois os dados demonstram baixos níveis de danos celular, podendo ser ou não reflexo desse mecanismo de reparo.

Ao mesmo tempo, os compostos que essa pesquisa avalia são metabólitos secundários de origem vegetal, com uma gama funcional variada nas plantas que os sintetizam, tais como defesa e regulação fisiológica e suas funções estão intimamente correlacionadas ao: nível de oxidação, propriedade dos seus anéis aromáticos e sua estereoquímica. As lignanas cubebina, dihidrocubebina, etilcubebina, metilcubebina e hinoquinina possuem diferenças estruturais somente em relação ao anel de 4 membros, sendo estruturas isoméricas.

Todavia, mesmo que essas diferenças pareçam sutis, elas fazem com que esses compostos tenham propriedades funcionais específicas, isso faz com que elas interajam de maneira própria no meio de cultura, sendo assim, sua solubilidade, acidez e rigidez molecular se alteram de acordo com suas características particulares e isso

ocasiona em semelhanças ou diferenças em suas propriedades e funções biológicas nas células linfocitárias.

Sendo assim, é possível entender que, mesmo não sendo evidenciado um dano ou reparo celular por meio da avaliação do ensaio cometa, não é prudente dizer que não houve interação mutagênica entre os linfócitos e as lignanas, visto que, em outros estudos realizados por ABOUL-ENEIN, et al. (2011), AMOL, et al. (2013); BAUSINGER et. al. (2015); BODIWALA, et al. (2007); CEDERBAUM, I. (2015); CHOI E, M. HWANG J, K. (2013); GOODEN, M.; G., LEFFERS, N. et al. (2011); GUSSON-ZANETONI, J, P. et. al. (2022); JUNQUEIRA et al. (2007); MAGALHAES, et al. (2012); RODRIGUES, P. M. A. (2007); SASTROAMIDJOJO, S. (1997); SERVATO, J. P. S. (2016); SILVA, et al. (2007); TAMADHER M, K. et al. (2013); TONINI, G. (2009); YIN, S. et al. (2013) corroboram que há uma atenuação na proliferação e migração celular desses compostos avaliados por outros métodos diferentes desse estudo.

Não obstante, é crível analisar o próprio método utilizado para avaliação de danos; mesmo tendo suas etapas críticas controladas, pode haver níveis diferentes de variações experimentais, obtidas no mesmo laboratório ao longo de muitos experimentos, em experimentos com as mesmas amostras em laboratórios diferentes, em experimentos executados por pessoas diferentes com o mesmo tipo de amostra, entre amostras diferentes e entre amostras iguais.

De tal modo, procura-se atenuar tais variações, incluindo grupos de padrões de referência que possuem células com uma quantidade de danos no DNA previamente conhecidos, o CN e CP.

Entretanto, a existência de pequenas variações é esperado, denominadas coeficiente de variação, sendo pequenas variações residuais inevitáveis, sendo crível que tais variações possam ter colaborado para os resultados da pesquisa, visto que esse coeficiente é observado em diversos estudos intra e inter laboratorial que utilizam o teste do cometa, já a padronização plena do protocolo é extremamente problemática, devido ao acesso dos pesquisadores aos diversos tipos de insumos e também a natureza das diferentes células analisadas nas pesquisas que se valem desse método.

Quanto ao controle positivo utilizado, era esperado que a ciclofosfamida, um agente mutagênico conhecido, resultasse em altos índices de danos celulares. No entanto, os resultados não mostraram um impacto substancial nas células linfocitárias. Embora a ciclofosfamida tenha a capacidade de interagir com as células do sistema

imunológico e desencadear processos inflamatórios, o que pode levar a mutações devido à formação de metabólitos citotóxicos, é possível que as doses aplicadas nas amostras não tenham sido suficientes para causar as mutações ou as células podem ter sofrido apoptose.

Entretanto, nesse trabalho não foi avaliado possíveis danos apoptóticos as células, levando em conta danos até a classe 3, seguindo os critérios de Kobayashi, (1995), assim, algumas indagações são pertinentes.

A primeira é que o método de avaliação não foi efetivo na detecção de danos, por não contabilizar as células apoptóticas. Outro possível motivo dos resultados obtidos está no fato da falta de repetição experimental, afim de averiguar por exemplo se a ineficiência do controle positivo, que era inesperada, se limita a somente esse experimento ou se ele é realmente um controle inadequado.

Por fim, se o uso dobrado da concentração da ciclofosfamida a 100 µg/ ml, pode ter sido muito citotóxico e levou a morte das células por apoptose e o método não detectou tais danos, sendo assim, seria vantajoso adicionar ao experimento um grupo controle com concentração intermediária, de 75 µg/ml.

Todavia, quando comparamos os resultados entre os dois grupos controle positivo CP1 e CP2 no tempo de 72 horas, é possível observar uma variância significativa no erro padrão, onde o tratamento com o dobro de concentração apresenta um intervalo muito amplo no índice de danos, mesmo que a média padrão de danos seja semelhante ao controle positivo de concentração menor, isso pode significar que entre esses dois tratamentos houve diferença, porém, não significativa estatisticamente usando esse método de avaliação.

Porém, todo esse conjunto de informações não invalida os resultados obtidos pelo estudo, mesmo que os tratamentos não se diferenciem estatisticamente ao longo dos tempos de 4h, 24h, 48h e 72h, há um resultado positivo ao se constatar que nenhuma lignana apresenta potencial genotóxico para esse tipo celular específico, avaliado pelo ensaio cometa, visto que esses compostos são amplamente utilizados na medicina popular.

11. Conclusões

Em suma, os testes estatísticos usados não demonstraram diferenças no Índice de danos entre os diferentes tempos de cultura dentro de cada grupo experimental e entre cada um deles. Os dados obtidos evidenciaram que as lignanas

testadas não apresentaram qualquer influência genotóxica nas células de linfócitos cultivadas em nenhum dos tempos coletados, porém, como discutido na discussão, o trabalho apresentou algumas dificuldades ao longo de sua execução.

Tais resultados podem indicar que essas substâncias, presentes nas plantas do gênero *Piper* podem ser potencialmente usadas em tratamentos médicos de modo geral, pois, a princípio, não causaram danos ao DNA às células ou os dados obtidos não refletem a realidade, devido as dificuldades experimentais descritas anteriormente.

Além disso, outra descoberta importante foi que o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DM) não demonstrou nenhuma influência genotóxica nas células de linfócitos cultivadas e avaliadas pelo Teste do Cometa, tal informação é crucial, pois o solvente é frequentemente utilizado em experimentos que envolvem substâncias bioativas.

Contudo, os dados obtidos fornecem insights valiosos para o desenvolvimento de futuros tratamentos, abrindo o caminho para futuras investigações sobre os efeitos positivos e a segurança da utilização das lignanas provenientes da *Piper cubeba*.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H, Y; KRUK, I. **Radical scavenging ability of some compounds isolated from *Piper Cubeba* towards free radicals**. Luminescence, vol. 26 n. 3 p. 202-207, 2011 Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21681910#maincontent>>

AMIEN, A. I., FAHMY, S. R., ABD-ELGLEEL, F. M., ELASKALANY, S. M. **Renoprotective effect of *Mangifera indica* polysaccharides and silymarin against cyclophosphamide toxicity in rats**. The Journal of Basic & Applied Zoology, v.72, p.154–162. 2015. Disponível em < <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.09.006> >

AMOL, P, P; TUSHAR, A, D. **Antioxidant and hepatoprotective activity of an ethanol extract of piper cubeba fruits**. International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences vol.2 n. 2 p.321-329, 2013. Disponível em <<https://www.omicsonline.org/open-access/antioxidant-and-hepatoprotective-activity-of-an-ethanol-extract-of-pipercubeba-fruits-.pdf>>

AZQUETA A, GUTZKOW K. B, PRIESTLEY, C.C, et al. **A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays**. Toxicology in Vitro, v.27 n.2, p.768-773, 2013. Disponível em <[10.1016/j.tiv.2012.12.006](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.006)>

BARBOZA, K., C. **Danos no DNA de linfócitos humanos avaliados pelo ensaio cometa na presença da lignana cubebina extraída da *Piper cubeba***. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Ilha Solteira, 2018.

BAUSINGER J., SCHUTZ P., PIBERGER A.L., SPEIT G. **Further characterization of benzo[a]pyrene diol-epoxide (BPDE)-induced comet assay effects**. Mutagenesis. 2016;31(2):161–169. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26346062/>>

BAUSINGER J., SPEIT G. **DNA repair capacity of cultured human lymphocytes exposed to mutagens measured by the comet assay and array expression analysis.** *Mutagenesis*, v.30 , p.811 – 820, 2015. Disponível em < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26001752/> >

BODIWALA, H.S., SINGH, G., SINGH, R.; et al. **Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*.** *Journal of Natural Medicine*, v.61, p.481-482. 2007. Disponível em < <https://doi.org/10.1007/s11418-007-0159-2> >

CEDERBAUM, I. **Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications.** *Redox Biology*, v.4, p.60–73, 2015. DOI: [10.1016/j.redox.2014.11.008](https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.11.008)

COHN, L.; HAWRYLOWICZ, C.; et. al. **Biology of Lymphocytes.** Middleton's Allergy (Eighth Edition), W.B. Saunders. V. 1, p. 203-214, 2013. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323085939000139?via%3DiHub>>

COLLINS, A, R; NAUALE EL, Y; LORENZO, Y; SHAPOSHINIKOV, S. **Controlling variation in the comet assay.** *Journal frontiers in Genetics*. v. 5, article 359. Oslo, 2014. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368630> >

ELFAHMI , KOMAR RUSLAN , SIEB BATTERMAN , REIN BOS , OLIVER KAYSER , HERMAN J. WOERDENBAG ,WIM J. QUAX. **Lignan profile of *Piper cubeba*, an Indonesian medicinal plant** *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 397-402, 2007.

EL-HALAWANY, A. M., SALAH EL DINE, R., EL SAYED, N. S., HATTORI, M. **Protective effect of *Aframomum melegueta* phenolics against CCl₄-induced rat hepatocytes damage; role of apoptosis and pro-inflammatory cytokines inhibition.** *Scientific Reports*, v.4, 5880, 2014. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5376205/> >

ERSSON, C., MÖLLER, L. **The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments.** *Mutagenesis*, v.26, n.6, p.689–695. 2011. Disponível em < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21778357/> >

FORCHHAMMER, L; JOHANSSON, C. et al. **Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial.** *Mutagenesis*, v. 25, n. 2, p. 113-123. Oxford, 2010. Disponível em <<https://academic.oup.com/mutage/article/25/2/113/1020210> >

GRIVICICH, I; REGNER, A.; ROCHA, A, B. **A Morte Celular por Apoptose.** *Revista Brasileira Cancerologia*, v. 53, n.3, p.335-43, 2007. Disponível em: < <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1801> >

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. **Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas.** In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003.

GOODEN, M.; G., LEFFERS, N. *et al.* **The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis.** *Journal Britânico of Cancer*. n.105, pag.93-103, 2011. Disponível em < <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.189> >

GUSSON-ZANETONI, J, P. et. al. **Effect of Piper cubeba total extract and isolated lignans on head and neck cancer cell lines and normal fibroblastos.** *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 128, p. 93 – 102. São José do Rio Preto, São Paulo, 2022.

HORTON, Nathan C.; MATHEW, P, A. **NKp44 and natural cytotoxicity receptors as damage-associated molecular pattern recognition receptors.** *Frontiers in immunology*, v. 6, p. 31, 2015.

JUNQUEIRA, A; PERAZZO, F. et al. **Clastogenicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) seed extract in an in vivo mammalian cell system.** Genetics and Molecular Biology, v. 30, n. 3, p. 656-663. São Paulo, 2007. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v30n3/25.pdf>>

KLAUDE, M; ERIKSSON, S; NYGREN, J; AHNSTRÖM, G. **The comet assay: mechanisms and technical considerations.** Mutation Research/DNA Repair, V. 363, n. 2, p. 89-86, 1996. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/0921-8777\(95\)00063-1](https://doi.org/10.1016/0921-8777(95)00063-1)>

LARRAMENDY, M; SOLONESKI, S. **Toxicology - new aspects to this scientific conundrum, preface.** Ed. Intech publisher, p.7-8. Croácia, 2019.

LI, X.; LI, B.; JIA, Y. **The hepatoprotective effect of Haoqin Qingdan decoction against liver injury induced by a chemotherapeutic drug cyclophosphamide.** Evid Based Complementary and Alternat Med., v.7, p.1–8, 2015. Disponível <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/978219/>>

MAGALHAES, L, G. et al. **In vitro efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*.** Parasitology Research. New York: Springer, v. 110, n. 5, p. 1747-1754, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/10109>>.

MOORHEAD PS et al. **Chromosome preparations of leukocytes cultures from human peripheral blood.** Exp Cell Res. Sep, 1960.

MARCOTULLIO, M.C.; PELOSI, A.; CURINI, M. **Hinokinin, an Emerging Bioactive Lignan.** Journal Molecules, v.19, n.9, p.14862–14878, set. 2014. DOI: [10.3390/molecules190914862](https://doi.org/10.3390/molecules190914862)

NORDENSON I., BECKMAN, LIDÉN, S., STJERNBERG N.1984. **Chromosomal aberrations and cancer risk.** Hum. Hered 34: 76-81.

PISSURNO, A. P. R.; LAURENTIZ, R. S. **Cubebina: uma pequena molécula com grande potencial.** Rev. Virtual de Química, v.9, n.2, p.656 -671, 2017. DOI: [10.21577/1984-6835.20170039](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170039)

RAMSDORF, W.A.; GUIMARÃES, F.S.F.; FERRARO, M.V.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; CESTARI, M.M. **Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2009.

RIBEIRO, L. **ANOVA two-way simples e com medidas repetidas.** Youtube, 04 set. 2020. Disponível em <https://www.youtube.com/watch?v=AGu7lv_uijs>

RODRIGUES, P. M. A. 93f. **Heme oxigenase-1 como um alvo terapêutico na sepse o papel da biliverdina.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2007. Disponível em <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/12864>>

ROITT, Ivan; BROSTOFF, Jonathan; MALE, David. **IMUNOLOGIA.** 6. ed. Barueri: Manole, 2003. 481 p.

SASTROAMIDJOJO, S. In Obat Asli Indonesia; Tjokronegoro, A., Ed.; Dian Rakyat: Indonesia; p 171, 1997.

SERVATO, J. P. S. 2016. **Efeitos da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas bucal experimental e humano.** Dissertação (Doutorado em Biomedicina) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2016. Disponível em <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17835/1/EfeitosEnzimaOxido.pdf> >

SILVA J, S. **Efeitos genotóxicos em tétrades de Tradescantia pallida induzidos por poluentes atmosféricos na cidade do Salvador-Ba.** Monografia (TCC) Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana – BA, dez. 2011.

SILVA, M. L. A; COÍMBRA, H. S. et al. **Evaluation of *Piper cubeba* extract, (-)-cubebin and its semi-synthetic derivatives against oral pathogens.** Phytotherapy Research, v. 21, n.5, p. 420-422, 2007. Disponível em <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ptr.2088#>>

SINGH, N, P; MCCOY, M, T; TICE, R, R; SCHNEIDER, E, L.A **simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Experimental Cell Research, V. 175, n. 1, p. 184-191, 1988. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0) >

SIZENANDO, J, A. J. et. al. **Micronúcleos em tetrades de Tradescantia pallida (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom: alterações genéticas decorrentes de poluição aérea urbana.** The Free Library - Science and Technology, jul. 2008.

TAMADHER, M, K. et al. **Antibacterial activity of *Piper cubeba* linn. fruit extracts against selected bacterial pathogens in basrah city Bas.** Journal of Veterinary Research, v.12, n.1, p.142-151, Iraque, 2013. Disponível em <<https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&ald=76184> >

TONINI, G. **Polimorfismo no gene da interleucina 10 (IL-10) em mulheres infectadas pelo papilomavírus humano (HPV).** 2009. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/19086/000735224.pdf?sequence=1>>

VISWANATHA-SWAMY, A. H., PATEL, U. M., KOTI, B. C., GADAD, P. C., PATEL, N. L., THIPPESWAMY, A. H. **Cardioprotective effect of *Saraca indica* against cyclophosphamide induced cardiotoxicity in rats: A biochemical, electrocardiographic and histopathological study.** Indian Journal Pharmacol., v. 45 n.1, p.44-48, 2013. DOI: [0.4103/0253-7613.106434](https://doi.org/10.4103/0253-7613.106434)

YIN, S., WEI, W., JIAN, F., YANG, N. **Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients.** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v.1, ID: 302426, 2013. Disponível em <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/302426/>>

Apêndice A – Testes Kruskal-Wallis

Table Analyzed	Controle Negativo (CN)
Kruskal-Wallis test	
P value	0,6982
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	1,431
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	20

Number of families	1
Number of comparisons per family	6
Alpha	0,05

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
4 horas vs. 24 horas	3,200	No	ns	>0,9999	A-B	
4 horas vs. 48 horas	3,800	No	ns	>0,9999	A-C	
4 horas vs. 72 horas	3,800	No	ns	>0,9999	A-D	
24 horas vs. 48 horas	0,6000	No	ns	>0,9999	B-C	
24 horas vs. 72 horas	0,6000	No	ns	>0,9999	B-D	
48 horas vs. 72 horas	0,000	No	ns	>0,9999	C-D	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
4 horas vs. 24 horas	13,20	10,00	3,200	5	5	0,8578
4 horas vs. 48 horas	13,20	9,400	3,800	5	5	1,019
4 horas vs. 72 horas	13,20	9,400	3,800	5	5	1,019
24 horas vs. 48 horas	10,00	9,400	0,6000	5	5	0,1608
24 horas vs. 72 horas	10,00	9,400	0,6000	5	5	0,1608
48 horas vs. 72 horas	9,400	9,400	0,000	5	5	0,000

Table Analyzed	Dimetilsulfóxido (DM)
Kruskal-Wallis test	
P value	0,0631
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	7,295
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	20

Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0,05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
4 horas vs. 24 horas	-4,200	No	ns	>0,9999	A-B	
4 horas vs. 48 horas	2,800	No	ns	>0,9999	A-C	
4 horas vs. 72 horas	5,400	No	ns	0,8837	A-D	
24 horas vs. 48 horas	7,000	No	ns	0,3618	B-C	
24 horas vs. 72 horas	9,600	No	ns	0,0599	B-D	
48 horas vs. 72 horas	2,600	No	ns	>0,9999	C-D	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
4 horas vs. 24 horas	11,50	15,70	-4,200	5	5	1,127
4 horas vs. 48 horas	11,50	8,700	2,800	5	5	0,7514
4 horas vs. 72 horas	11,50	6,100	5,400	5	5	1,449
24 horas vs. 48 horas	15,70	8,700	7,000	5	5	1,879
24 horas vs. 72 horas	15,70	6,100	9,600	5	5	2,576
48 horas vs. 72 horas	8,700	6,100	2,600	5	5	0,6978

Table Analyzed	Cubebina (C)
Kruskal-Wallis test	
P value	0,1253
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	5,734
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	20

Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0,05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
4 horas vs. 24 horas	-6,600	No	ns	0,4638	A-B	
4 horas vs. 48 horas	-4,500	No	ns	>0,9999	A-C	
4 horas vs. 72 horas	-8,500	No	ns	0,1374	A-D	
24 horas vs. 48 horas	2,100	No	ns	>0,9999	B-C	
24 horas vs. 72 horas	-1,900	No	ns	>0,9999	B-D	
48 horas vs. 72 horas	-4,000	No	ns	>0,9999	C-D	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
4 horas vs. 24 horas	5,600	12,20	-6,600	5	5	1,767
4 horas vs. 48 horas	5,600	10,10	-4,500	5	5	1,204
4 horas vs. 72 horas	5,600	14,10	-8,500	5	5	2,275
24 horas vs. 48 horas	12,20	10,10	2,100	5	5	0,5621
24 horas vs. 72 horas	12,20	14,10	-1,900	5	5	0,5086
48 horas vs. 72 horas	10,10	14,10	-4,000	5	5	1,071

Table Analyzed	Dihidrocubebina (D)
Kruskal-Wallis test	
P value	0,1715
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	5,004
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	20

Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0,05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
4 horas vs. 24 horas	3,000	No	ns	>0,9999	A-B	
4 horas vs. 48 horas	4,100	No	ns	>0,9999	A-C	
4 horas vs. 72 horas	-3,500	No	ns	>0,9999	A-D	
24 horas vs. 48 horas	1,100	No	ns	>0,9999	B-C	
24 horas vs. 72 horas	-6,500	No	ns	0,4886	B-D	
48 horas vs. 72 horas	-7,600	No	ns	0,2497	C-D	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
4 horas vs. 24 horas	11,40	8,400	3,000	5	5	0,8042
4 horas vs. 48 horas	11,40	7,300	4,100	5	5	1,099
4 horas vs. 72 horas	11,40	14,90	-3,500	5	5	0,9382
24 horas vs. 48 horas	8,400	7,300	1,100	5	5	0,2949
24 horas vs. 72 horas	8,400	14,90	-6,500	5	5	1,742
48 horas vs. 72 horas	7,300	14,90	-7,600	5	5	2,037

Table Analyzed	Etilcubebina (E)
Kruskal-Wallis test	
P value	0,3733
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	3,121
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	20

Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0,05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
4 horas vs. 24 horas	-6,200	No	ns	0,5828	A-B	
4 horas vs. 48 horas	-2,400	No	ns	>0,9999	A-C	
4 horas vs. 72 horas	-4,600	No	ns	>0,9999	A-D	
24 horas vs. 48 horas	3,800	No	ns	>0,9999	B-C	
24 horas vs. 72 horas	1,600	No	ns	>0,9999	B-D	
48 horas vs. 72 horas	-2,200	No	ns	>0,9999	C-D	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
4 horas vs. 24 horas	7,200	13,40	-6,200	5	5	1,659
4 horas vs. 48 horas	7,200	9,600	-2,400	5	5	0,6422
4 horas vs. 72 horas	7,200	11,80	-4,600	5	5	1,231
24 horas vs. 48 horas	13,40	9,600	3,800	5	5	1,017
24 horas vs. 72 horas	13,40	11,80	1,600	5	5	0,4281
48 horas vs. 72 horas	9,600	11,80	-2,200	5	5	0,5886

Table Analyzed	Hinoquinina (H)
Kruskal-Wallis test	
P value	0,2910
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	3,740
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	20

Number of families	1
Number of comparisons per family	6
Alpha	0,05

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
4 horas vs. 24 horas	-4,000	No	ns	>0,9999	A-B	
4 horas vs. 48 horas	-3,600	No	ns	>0,9999	A-C	
4 horas vs. 72 horas	-7,200	No	ns	0,3221	A-D	
24 horas vs. 48 horas	0,4000	No	ns	>0,9999	B-C	
24 horas vs. 72 horas	-3,200	No	ns	>0,9999	B-D	
48 horas vs. 72 horas	-3,600	No	ns	>0,9999	C-D	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
4 horas vs. 24 horas	6,800	10,80	-4,000	5	5	1,072
4 horas vs. 48 horas	6,800	10,40	-3,600	5	5	0,9647
4 horas vs. 72 horas	6,800	14,00	-7,200	5	5	1,929
24 horas vs. 48 horas	10,80	10,40	0,4000	5	5	0,1072
24 horas vs. 72 horas	10,80	14,00	-3,200	5	5	0,8575
48 horas vs. 72 horas	10,40	14,00	-3,600	5	5	0,9647

Apêndice B – Teste ANOVA

Table Analyzed	Liginanas				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Tempo x Liginanas	16,01	0,2326	ns	No	
Tempo	4,837	0,1342	ns	No	0,9388
Liginanas	5,637	0,1219	ns	No	
Subject	13,82	0,8405	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tempo x Liginanas	13366	15	891,1	F (15, 72) = 1,288	P=0,2326
Tempo	4038	3	1346	F (2,817, 67,60) = 1,945	P=0,1342
Liginanas	4705	5	941,1	F (5, 24) = 1,957	P=0,1219
Subject	11539	24	480,8	F (24, 72) = 0,6947	P=0,8405
Residual	49829	72	692,1		
Data summary					
Number of columns (Liginanas)	6				
Number of rows (Tempo)	4				
Number of subjects (Subject)	30				
Number of missing values	0				

Apêndice C - Diferentes tempos de cultura dos grupos experimentais

Within each column, compare rows (simple effects within columns)

Number of families 6

Number of comparisons per family 6

Alpha 0,05

Tukey's multiple comparisons test

	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controle Negativo (CN)					
4 horas vs. 24 horas	12,40	-89,77 to 114,6	No	ns	0,9563
4 horas vs. 48 horas	16,00	-24,05 to 56,05	No	ns	0,4580
4 horas vs. 72 horas	16,60	-29,14 to 62,34	No	ns	0,5235
24 horas vs. 48 horas	3,600	-84,98 to 92,18	No	ns	0,9981
24 horas vs. 72 horas	4,200	-91,85 to 100,3	No	ns	0,9977
48 horas vs. 72 horas	0,6000	-38,29 to 39,49	No	ns	0,9999
Dimetilsulfóxido (DM)					
4 horas vs. 24 horas	-11,00	-53,31 to 31,31	No	ns	0,7295
4 horas vs. 48 horas	13,60	-27,63 to 54,83	No	ns	0,5871
4 horas vs. 72 horas	20,80	8,095 to 33,50	Yes	**	0,0091
24 horas vs. 48 horas	24,60	-50,76 to 99,96	No	ns	0,5939
24 horas vs. 72 horas	31,80	-5,162 to 68,76	No	ns	0,0798
48 horas vs. 72 horas	7,200	-43,47 to 57,87	No	ns	0,9336
Cubebina (C)					
4 horas vs. 24 horas	-34,20	-107,0 to 38,65	No	ns	0,3506
4 horas vs. 48 horas	-23,00	-80,18 to 34,18	No	ns	0,4534
4 horas vs. 72 horas	-42,80	-115,8 to 30,21	No	ns	0,2217
24 horas vs. 48 horas	11,20	-33,31 to 55,71	No	ns	0,7465
24 horas vs. 72 horas	-8,600	-99,51 to 82,31	No	ns	0,9781
48 horas vs. 72 horas	-19,80	-84,40 to 44,80	No	ns	0,6342
Dihidrocubebina (D)					
4 horas vs. 24 horas	13,60	-49,22 to 76,42	No	ns	0,8155
4 horas vs. 48 horas	18,80	-56,17 to 93,77	No	ns	0,7483
4 horas vs. 72 horas	-16,60	-63,11 to 29,91	No	ns	0,5348

24 horas vs. 48 horas	5,200	-39,72 to 50,12	No	ns	0,9616
24 horas vs. 72 horas	-30,20	-65,11 to 4,710	No	ns	0,0785
48 horas vs. 72 horas	-35,40	-98,71 to 27,91	No	ns	0,2465
Etilcubebina (E)					
4 horas vs. 24 horas	-27,20	-106,3 to 51,90	No	ns	0,5597
4 horas vs. 48 horas	-12,60	-108,2 to 82,96	No	ns	0,9455
4 horas vs. 72 horas	-21,20	-108,0 to 65,63	No	ns	0,7616
24 horas vs. 48 horas	14,60	-63,46 to 92,66	No	ns	0,8680
24 horas vs. 72 horas	6,000	-67,31 to 79,31	No	ns	0,9855
48 horas vs. 72 horas	-8,600	-100,3 to 83,14	No	ns	0,9786
Hinoquinina (H)					
4 horas vs. 24 horas	-16,20	-77,57 to 45,17	No	ns	0,7214
4 horas vs. 48 horas	-11,60	-64,17 to 40,97	No	ns	0,8076
4 horas vs. 72 horas	-31,20	-101,2 to 38,76	No	ns	0,3840
24 horas vs. 48 horas	4,600	-32,75 to 41,95	No	ns	0,9546
24 horas vs. 72 horas	-15,00	-104,5 to 74,53	No	ns	0,8990
48 horas vs. 72 horas	-19,60	-110,3 to 71,09	No	ns	0,8161
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1
Controle Negativo (CN)					
4 horas vs. 24 horas	70,60	58,20	12,40	25,10	5
4 horas vs. 48 horas	70,60	54,60	16,00	9,839	5
4 horas vs. 72 horas	70,60	54,00	16,60	11,24	5
24 horas vs. 48 horas	58,20	54,60	3,600	21,76	5
24 horas vs. 72 horas	58,20	54,00	4,200	23,60	5
48 horas vs. 72 horas	54,60	54,00	0,6000	9,553	5
Dimetilsulfóxido (DM)					
4 horas vs. 24 horas	60,00	71,00	-11,00	10,39	5
4 horas vs. 48 horas	60,00	46,40	13,60	10,13	5
4 horas vs. 72 horas	60,00	39,20	20,80	3,121	5
24 horas vs. 48 horas	71,00	46,40	24,60	18,51	5
24 horas vs. 72 horas	71,00	39,20	31,80	9,080	5
48 horas vs. 72 horas	46,40	39,20	7,200	12,45	5
Cubebina (C)					
4 horas vs. 24 horas	45,20	79,40	-34,20	17,90	5
4 horas vs. 48 horas	45,20	68,20	-23,00	14,05	5
4 horas vs. 72 horas	45,20	88,00	-42,80	17,93	5

24 horas vs. 48 horas	79,40	68,20	11,20	10,93	5	5	1,449	4,000
24 horas vs. 72 horas	79,40	88,00	-8,600	22,33	5	5	0,5446	4,000
48 horas vs. 72 horas	68,20	88,00	-19,80	15,87	5	5	1,764	4,000
Dihidrocubebina (D)								
4 horas vs. 24 horas	65,80	52,20	13,60	15,43	5	5	1,246	4,000
4 horas vs. 48 horas	65,80	47,00	18,80	18,42	5	5	1,444	4,000
4 horas vs. 72 horas	65,80	82,40	-16,60	11,43	5	5	2,055	4,000
24 horas vs. 48 horas	52,20	47,00	5,200	11,03	5	5	0,6665	4,000
24 horas vs. 72 horas	52,20	82,40	-30,20	8,576	5	5	4,980	4,000
48 horas vs. 72 horas	47,00	82,40	-35,40	15,55	5	5	3,219	4,000
Etilcubebina (E)								
4 horas vs. 24 horas	37,40	64,60	-27,20	19,43	5	5	1,980	4,000
4 horas vs. 48 horas	37,40	50,00	-12,60	23,47	5	5	0,7591	4,000
4 horas vs. 72 horas	37,40	58,60	-21,20	21,33	5	5	1,406	4,000
24 horas vs. 48 horas	64,60	50,00	14,60	19,17	5	5	1,077	4,000
24 horas vs. 72 horas	64,60	58,60	6,000	18,01	5	5	0,4712	4,000
48 horas vs. 72 horas	50,00	58,60	-8,600	22,54	5	5	0,5397	4,000
Hinoquinina (H)								
4 horas vs. 24 horas	51,80	68,00	-16,20	15,07	5	5	1,520	4,000
4 horas vs. 48 horas	51,80	63,40	-11,60	12,91	5	5	1,270	4,000
4 horas vs. 72 horas	51,80	83,00	-31,20	17,19	5	5	2,567	4,000
24 horas vs. 48 horas	68,00	63,40	4,600	9,174	5	5	0,7091	4,000
24 horas vs. 72 horas	68,00	83,00	-15,00	21,99	5	5	0,9645	4,000
48 horas vs. 72 horas	63,40	83,00	-19,60	22,28	5	5	1,244	4,000

Within each row, compare columns (simple effects within rows)

Number of families 4
 Number of comparisons per family 15
 Alpha 0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
4 horas					
Controle Negativo (CN) vs. Dimetilsulfóxido (DM)	10,60	-55,22 to 76,42	No	ns	0,9713
Controle Negativo (CN) vs. Cubebina (C)	25,40	-43,00 to 93,80	No	ns	0,7426
Controle Negativo (CN) vs. Dihidrocubebina (D)	4,800	-63,56 to 73,16	No	ns	0,9998
Controle Negativo (CN) vs. Etilcubebina (E)	33,20	-32,12 to 98,52	No	ns	0,4560
Controle Negativo (CN) vs. Hinoquinina (H)	18,80	-45,49 to 83,09	No	ns	0,8402
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Cubebina (C)	14,80	-38,51 to 68,11	No	ns	0,8236
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Dihidrocubebina (D)	-5,800	-59,01 to 47,41	No	ns	0,9954
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Etilcubebina (E)	22,60	-19,96 to 65,16	No	ns	0,3623
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Hinoquinina (H)	8,200	-25,39 to 41,79	No	ns	0,9128
Cubebina (C) vs. Dihidrocubebina (D)	-20,60	-81,19 to 39,99	No	ns	0,8063
Cubebina (C) vs. Etilcubebina (E)	7,800	-47,92 to 63,52	No	ns	0,9938
Cubebina (C) vs. Hinoquinina (H)	-6,600	-59,83 to 46,63	No	ns	0,9957
Dihidrocubebina (D) vs. Etilcubebina (E)	28,40	-27,25 to 84,05	No	ns	0,4727
Dihidrocubebina (D) vs. Hinoquinina (H)	14,00	-39,14 to 67,14	No	ns	0,9016
Etilcubebina (E) vs. Hinoquinina (H)	-14,40	-59,10 to 30,30	No	ns	0,8286
24 horas					
Controle Negativo (CN) vs. Dimetilsulfóxido (DM)	-12,80	-83,43 to 57,83	No	ns	0,9760
Controle Negativo (CN) vs. Cubebina (C)	-21,20	-91,63 to 49,23	No	ns	0,8385
Controle Negativo (CN) vs. Dihidrocubebina (D)	6,000	-64,07 to 76,07	No	ns	0,9990
Controle Negativo (CN) vs. Etilcubebina (E)	-6,400	-83,28 to 70,48	No	ns	0,9995
Controle Negativo (CN) vs. Hinoquinina (H)	-9,800	-80,33 to 60,73	No	ns	0,9923
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Cubebina (C)	-8,400	-57,02 to 40,22	No	ns	0,9850
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Dihidrocubebina (D)	18,80	-26,59 to 64,19	No	ns	0,6575

Dimetilsulfóxido (DM) vs. Etilcubebina (E)	6,400	-57,61 to 70,41	No	ns	0,9985
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Hinoquinina (H)	3,000	-46,04 to 52,04	No	ns	0,9999
Cubebina (C) vs. Dihidrocubebina (D)	27,20	-17,05 to 71,45	No	ns	0,3088
Cubebina (C) vs. Etilcubebina (E)	14,80	-48,87 to 78,47	No	ns	0,9391
Cubebina (C) vs. Hinoquinina (H)	11,40	-36,75 to 59,55	No	ns	0,9450
Dihidrocubebina (D) vs. Etilcubebina (E)	-12,40	-75,14 to 50,34	No	ns	0,9622
Dihidrocubebina (D) vs. Hinoquinina (H)	-15,80	-60,60 to 29,00	No	ns	0,7773
Etilcubebina (E) vs. Hinoquinina (H)	-3,400	-67,24 to 60,44	No	ns	>0,9999
48 horas					
Controle Negativo (CN) vs. Dimetilsulfóxido (DM)	8,200	-47,54 to 63,94	No	ns	0,9907
Controle Negativo (CN) vs. Cubebina (C)	-13,60	-49,87 to 22,67	No	ns	0,7191
Controle Negativo (CN) vs. Dihidrocubebina (D)	7,600	-46,01 to 61,21	No	ns	0,9925
Controle Negativo (CN) vs. Etilcubebina (E)	4,600	-69,70 to 78,90	No	ns	0,9998
Controle Negativo (CN) vs. Hinoquinina (H)	-8,800	-59,47 to 41,87	No	ns	0,9826
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Cubebina (C)	-21,80	-76,89 to 33,29	No	ns	0,6159
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Dihidrocubebina (D)	-0,6000	-62,68 to 61,48	No	ns	>0,9999
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Etilcubebina (E)	-3,600	-80,63 to 73,43	No	ns	>0,9999
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Hinoquinina (H)	-17,00	-77,32 to 43,32	No	ns	0,8940
Cubebina (C) vs. Dihidrocubebina (D)	21,20	-31,41 to 73,81	No	ns	0,6075
Cubebina (C) vs. Etilcubebina (E)	18,20	-57,21 to 93,61	No	ns	0,8845
Cubebina (C) vs. Hinoquinina (H)	4,800	-44,31 to 53,91	No	ns	0,9981
Dihidrocubebina (D) vs. Etilcubebina (E)	-3,000	-79,34 to 73,34	No	ns	>0,9999
Dihidrocubebina (D) vs. Hinoquinina (H)	-16,40	-75,14 to 42,34	No	ns	0,8982
Etilcubebina (E) vs. Hinoquinina (H)	-13,40	-88,92 to 62,12	No	ns	0,9795
72 horas					
Controle Negativo (CN) vs. Dimetilsulfóxido (DM)	14,80	-37,07 to 66,67	No	ns	0,8226
Controle Negativo (CN) vs. Cubebina (C)	-34,00	-101,7 to 33,73	No	ns	0,4877
Controle Negativo (CN) vs. Dihidrocubebina (D)	-28,40	-85,33 to 28,53	No	ns	0,5005
Controle Negativo (CN) vs. Etilcubebina (E)	-4,600	-70,70 to 61,50	No	ns	0,9998
Controle Negativo (CN) vs. Hinoquinina (H)	-29,00	-100,0 to 42,03	No	ns	0,6640
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Cubebina (C)	-48,80	-113,8 to 16,22	No	ns	0,1337

Dimetilsulfóxido (DM) vs. Dihidrocubebina (D)	-43,20	-90,19 to 3,786	No	ns	0,0693			
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Etilcubebina (E)	-19,40	-82,08 to 43,28	No	ns	0,7581			
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Hinoquinina (H)	-43,80	-113,4 to 25,80	No	ns	0,2200			
Cubebina (C) vs. Dihidrocubebina (D)	5,600	-60,54 to 71,74	No	ns	0,9994			
Cubebina (C) vs. Etilcubebina (E)	29,40	-43,08 to 101,9	No	ns	0,6834			
Cubebina (C) vs. Hinoquinina (H)	5,000	-71,29 to 81,29	No	ns	0,9998			
Dihidrocubebina (D) vs. Etilcubebina (E)	23,80	-40,57 to 88,17	No	ns	0,7397			
Dihidrocubebina (D) vs. Hinoquinina (H)	-0,6000	-70,32 to 69,12	No	ns	>0,9999			
Etilcubebina (E) vs. Hinoquinina (H)	-24,40	-99,59 to 50,79	No	ns	0,8309			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
4 horas								
Controle Negativo (CN) vs. Dimetilsulfóxido (DM)	70,60	60,00	10,60	14,87	5	5	1,008	4,599
Controle Negativo (CN) vs. Cubebina (C)	70,60	45,20	25,40	18,53	5	5	1,938	7,698
Controle Negativo (CN) vs. Dihidrocubebina (D)	70,60	65,80	4,800	18,52	5	5	0,3665	7,693
Controle Negativo (CN) vs. Etilcubebina (E)	70,60	37,40	33,20	17,18	5	5	2,732	6,927
Controle Negativo (CN) vs. Hinoquinina (H)	70,60	51,80	18,80	16,18	5	5	1,643	6,032
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Cubebina (C)	60,00	45,20	14,80	12,38	5	5	1,691	4,889
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Dihidrocubebina (D)	60,00	65,80	-5,800	12,36	5	5	0,6637	4,892
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Etilcubebina (E)	60,00	37,40	22,60	10,25	5	5	3,118	5,344
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Hinoquinina (H)	60,00	51,80	8,200	8,464	5	5	1,370	6,052
Cubebina (C) vs. Dihidrocubebina (D)	45,20	65,80	-20,60	16,58	5	5	1,757	8,000
Cubebina (C) vs. Etilcubebina (E)	45,20	37,40	7,800	15,08	5	5	0,7317	7,656
Cubebina (C) vs. Hinoquinina (H)	45,20	51,80	-6,600	13,92	5	5	0,6703	6,796
Dihidrocubebina (D) vs. Etilcubebina (E)	65,80	37,40	28,40	15,06	5	5	2,667	7,661
Dihidrocubebina (D) vs. Hinoquinina (H)	65,80	51,80	14,00	13,91	5	5	1,424	6,803
Etilcubebina (E) vs. Hinoquinina (H)	37,40	51,80	-14,40	12,07	5	5	1,687	7,600
24 horas								
Controle Negativo (CN) vs. Dimetilsulfóxido (DM)	58,20	71,00	-12,80	18,34	5	5	0,9872	6,630
Controle Negativo (CN) vs. Cubebina (C)	58,20	79,40	-21,20	18,16	5	5	1,651	6,487
Controle Negativo (CN) vs. Dihidrocubebina (D)	58,20	52,20	6,000	17,42	5	5	0,4871	5,822
Controle Negativo (CN) vs. Etilcubebina (E)	58,20	64,60	-6,400	20,98	5	5	0,4315	7,902

Controle Negativo (CN) vs. Hinoquinina (H)	58,20	68,00	-9,800	18,25	5	5	0,7596	6,558
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Cubebina (C)	71,00	79,40	-8,400	13,30	5	5	0,8930	7,989
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Dihidrocubebina (D)	71,00	52,20	18,80	12,27	5	5	2,166	7,639
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Etilcubebina (E)	71,00	64,60	6,400	16,95	5	5	0,5341	7,076
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Hinoquinina (H)	71,00	68,00	3,000	13,42	5	5	0,3161	7,997
Cubebina (C) vs. Dihidrocubebina (D)	79,40	52,20	27,20	12,01	5	5	3,203	7,742
Cubebina (C) vs. Etilcubebina (E)	79,40	64,60	14,80	16,75	5	5	1,249	6,932
Cubebina (C) vs. Hinoquinina (H)	79,40	68,00	11,40	13,18	5	5	1,223	7,997
Dihidrocubebina (D) vs. Etilcubebina (E)	52,20	64,60	-12,40	15,95	5	5	1,099	6,211
Dihidrocubebina (D) vs. Hinoquinina (H)	52,20	68,00	-15,80	12,14	5	5	1,841	7,692
Etilcubebina (E) vs. Hinoquinina (H)	64,60	68,00	-3,400	16,85	5	5	0,2854	7,004
48 horas								
Controle Negativo (CN) vs. Dimetilsulfóxido (DM)	54,60	46,40	8,200	14,61	5	5	0,7938	6,840
Controle Negativo (CN) vs. Cubebina (C)	54,60	68,20	-13,60	9,602	5	5	2,003	7,076
Controle Negativo (CN) vs. Dihidrocubebina (D)	54,60	47,00	7,600	14,16	5	5	0,7591	7,019
Controle Negativo (CN) vs. Etilcubebina (E)	54,60	50,00	4,600	18,38	5	5	0,3540	5,736
Controle Negativo (CN) vs. Hinoquinina (H)	54,60	63,40	-8,800	13,52	5	5	0,9202	7,283
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Cubebina (C)	46,40	68,20	-21,80	13,42	5	5	2,297	5,506
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Dihidrocubebina (D)	46,40	47,00	-0,6000	16,98	5	5	0,04997	7,984
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Etilcubebina (E)	46,40	50,00	-3,600	20,63	5	5	0,2468	7,372
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Hinoquinina (H)	46,40	63,40	-17,00	16,46	5	5	1,461	7,900
Cubebina (C) vs. Dihidrocubebina (D)	68,20	47,00	21,20	12,93	5	5	2,319	5,636
Cubebina (C) vs. Etilcubebina (E)	68,20	50,00	18,20	17,45	5	5	1,475	4,847
Cubebina (C) vs. Hinoquinina (H)	68,20	63,40	4,800	12,23	5	5	0,5550	5,849
Dihidrocubebina (D) vs. Etilcubebina (E)	47,00	50,00	-3,000	20,31	5	5	0,2089	7,203
Dihidrocubebina (D) vs. Hinoquinina (H)	47,00	63,40	-16,40	16,06	5	5	1,444	7,963
Etilcubebina (E) vs. Hinoquinina (H)	50,00	63,40	-13,40	19,88	5	5	0,9534	6,936
72 horas								
Controle Negativo (CN) vs. Dimetilsulfóxido (DM)	54,00	39,20	14,80	12,34	5	5	1,696	5,185
Controle Negativo (CN) vs. Cubebina (C)	54,00	88,00	-34,00	18,32	5	5	2,624	7,656
Controle Negativo (CN) vs. Dihidrocubebina (D)	54,00	82,40	-28,40	15,55	5	5	2,584	7,929

Controle Negativo (CN) vs. Etilcubebina (E)	54,00	58,60	-4,600	17,95	5	5	0,3625	7,753
Controle Negativo (CN) vs. Hinoquinina (H)	54,00	83,00	-29,00	19,08	5	5	2,150	7,446
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Cubebina (C)	39,20	88,00	-48,80	14,95	5	5	4,616	4,780
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Dihidrocubebina (D)	39,20	82,40	-43,20	11,38	5	5	5,371	5,418
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Etilcubebina (E)	39,20	58,60	-19,40	14,48	5	5	1,894	4,836
Dimetilsulfóxido (DM) vs. Hinoquinina (H)	39,20	83,00	-43,80	15,86	5	5	3,905	4,687
Cubebina (C) vs. Dihidrocubebina (D)	88,00	82,40	5,600	17,69	5	5	0,4477	7,336
Cubebina (C) vs. Etilcubebina (E)	88,00	58,60	29,40	19,83	5	5	2,097	7,990
Cubebina (C) vs. Hinoquinina (H)	88,00	83,00	5,000	20,86	5	5	0,3390	7,967
Dihidrocubebina (D) vs. Etilcubebina (E)	82,40	58,60	23,80	17,30	5	5	1,946	7,461
Dihidrocubebina (D) vs. Hinoquinina (H)	82,40	83,00	-0,6000	18,47	5	5	0,04595	7,089
Etilcubebina (E) vs. Hinoquinina (H)	58,60	83,00	-24,40	20,53	5	5	1,681	7,922

ANEXO A

ENSAIO DE COMETA (SCGE)

PROTOCOLO: O propósito deste protocolo é fornecer instrução do ensaio do cometa versão alcalina para detecção de danos do DNA de eucariotos obtidas de estudos in vitro e in vivo - de acordo com Singh et al. (1988) Exp.Cell.Res.175, 184-192 e Klaude et al. (1996), com adaptações para o tipo celular escolhido.

MATERIAIS

DMSO (dimetilsulfóxido). HCl (ácido clorídrico) concentrado NaCl (cloreto de sódio) NaOH (Hidróxido de sódio) PBS (Tampão Fosfato - livre de Ca^{++} e Mg^{++}) Gel Red Tris - HCl EDTA	Triton X-100 Agarose com baixo ponto de fusão (LMP); Agarose com ponto de fusão normal (NMP); Lâminas (extremidade fosca); Lamínulas (24X60mm); Micropipetas, ponteiras e microtubos.
---	--

PREPARO DOS REAGENTES:

SOLUÇÃO DE LISE - Para 1000ml - Pesquisar todos os reagentes separadamente e nesta ordem:

2,5M NaCl	146,1 g
100mM EDTA	37,2 g
10mM Tris	1,2 g

1. Em um Becker (já marcado para o volume de 1000 ml), adicionar os reagentes e completar com aproximadamente 850 ml de água destilada;
2. Depois de adicionar a água, iniciar a medida do pH;
3. Ir adicionando NaOH (em FLOCOS) aos poucos, até que o pH fique próximo de 9,8;
4. Completar com o restante de água para 1000ml, sem interromper a medida do pH;
5. Após completar a água, terminar de acertar o pH para 10, com o mesmo NaOH.
6. Deixar em temperatura ambiente (identificado)
7. Não colocar a colher molhada no pote de NaOH, pois hidrata muito rápido.

SOLUÇÃO DE USO - Para 100 ml (a solução deve ser feita no dia do teste e misturada à solução estoque, previamente preparada) - Com função de Rompimento da Membrana Celular.

Colocar na sequência:

Triton X-100	1 ml
DMSO	10 ml
Solução de Lise – estoque	Qsp. 100 ml

1. Solubilizar aos poucos no agitador magnético e então refrigerar (4°C) durante 60 minutos antes da adição às lâminas;
2. Em cada cuba cabem 18 lâminas e são necessários 100 ml para preenche-la, calculando a quantidade desta solução a ser feita pela quantidade de lâminas.

TAMPÃO DE ELETROFORESE:

300mM NaOH/1mM EDTA

Calcular a quantidade a ser utilizada de acordo com a quantidade de lâminas do teste; De acordo com a quantidade de solução de uso a ser utilizada, calcular a quantidade de solução estoque a ser feita, previamente (sempre calcular uma quantidade maior).

SOLUÇÕES ESTOQUE:

NaOH 10N - para 500 ml

NaOH	200g
Água destilada	Qps. 500 ml

1. Em um becker (marcado para 500ml), adicionar o NaOH pesado;
2. **Completar** com água destilada (q.s.p 500ml);
3. Dissolver no agitador magnético;
4. Estocar em temperatura ambiente em frasco identificado.

ATENÇÃO: a solução fica muito quente, devido sua natureza exotérmica.

Validade: 15 dias.

EDTA: 200mM - para 200 ml

EDTA	14,89 g
Água destilada	Q.s.p. 200ml

1. Em um becker (marcado para 200ml) pesar o EDTA e colocar aproximadamente 150 ml de água destilada;
2. Acertar o pH, no agitador, para próximo de 9,5 com aproximadamente 3g de NaOH (ir adicionando com muito cuidado, sempre esperando dissolver bem para verificar o pH);
3. Completar com 200 ml de água;
4. Conferir o pH e ajustá-lo para 10 com NaOH;
5. Descartar a solução caso o pH ultrapasse 10;
6. Armazenar em temperatura ambiente.

ATENÇÃO: solução não tem validade, usar até acabar

Solução de Uso: Para 1000 ml **Obs:** fazer no dia de uso!

EDTA	5 ml
NaOH	30 ml
Água destilada	Q.s.p. 1000 ml

1. Verificar se o pH desta solução está superior a 13;
2. Se não estiver, descarte e refaça as soluções;
3. Esta solução deve ser preparada no dia do USO e colocada na GELADEIRA para que esteja a aproximadamente 4°C na hora do uso;
4. Deve-se trocar esta solução a cada corrida de eletroforese;
5. O volume total de tampão depende da capacidade da cuba de eletroforese.

TAMPÃO DE NEUTRALIZAÇÃO - para 1000ml

Tris 0,4M	48.5 g
Água destilada	Q.s.p 1000 ml

1. Em um becker (marcado para 1000ml), adicionar o Tris e completar com cerca de 850 ml de água;
2. Acertar o pH para 7,7 usando HCl concentrado (60%)
3. Após esta etapa, completar com o restante de água, checar o pH e se necessário ajustá-lo até que chegue em 7,5.

Atenção: validade de 6 meses.

PBS - para 1000 ml (Para agarose NMP)

KCl (PM=74,55) 2,68mM	0,2g
KH ₂ PO ₄ (PM = 136,09) 1,47mM	0,2g
NaCl (PM=58,44) 136,89mM	8,0g
Na ₂ HPO ₄ Anidro (PM=141,96) 8,10mM	1,15g
Água destilada	Q.s.p 1000 ml

1. Pesar os sais e adicioná-los separadamente em um becker com aproximadamente 950 ml de água destilada;
2. Em seguida, acertar o pH para 7,4 e completar para 1000 ml;
3. Após completar, se necessário, ajustar o pH com HCl;
4. Estocar no refrigerador

COLORAÇÃO:

1. Adicionar a solução GelRed - 15 µl de GelRed diluído com 45 ml de água destilada e 5ml de NaCl 1M;
2. 50 µl de solução de GelRed por lâmina;
3. Espalhar pela lâmina toda;
4. Cobrir com lamínula
5. Para cada 5ml de NaCl 1M:
 - ✓ 0,2922g de NaCl (PM: 58,44).
 - ✓ 5ml de água destilada.

Atenção: faça o preparo do corante e somente o adicione nas lâminas no dia que for realizar a análise no microscópio de fluorescência, pois como o corante reage ao entrar em contato com a luz, ele irá oxidar a longo prazo e não será mais possível visualizar o material no microscópio.

PREPARO DE LÂMINAS:

AGAROSE LOW MELTING (LMP): O gel deve ser preparado com uma agarose de baixo de fusão ou *lowmelting*.

1. Este deve ser a concentração de 0,5% (0.1g de agarose para 20 ml de PBS);
2. Depois de pesar a agarose, adicionar o PBS e fundi-la no microondas (apertar 1 minuto e ir verificando se está dissolvendo a cada 20 segundos; mexer com bastão de vidro)
3. Armazenar na geladeira;
4. Na hora do uso, fundi-la novamente em microondas (sem deixar ferver) e colocar em banho maria a 37°C.

AGAROSE DE PONTO DE FUSÃO NORMAL (NMP): Esta agarose deve ter a concentração de 1,5 % (0.3 g de agarose para 20 ml de PBS);

1. Pesar a agarose e fundi-la com PBS no microondas (apertar 1 minuto e ir verificando com cuidado se está dissolvendo e a cada 30 segundos mexer com o bastão de vidro);
2. Agitar antes de fundi-la (por cerca de 2 horas).
3. Em seguida ferver por aproximadamente 1 minuto (após verificar se ficou transparente e bem homogêneo ferver por 1 minuto, olhando e mexendo a cada 15 segundos);
4. Deixar a agarose esfriar e solidificar (em temperatura ambiente - picar e ferver, repetir mais 2 vezes);
5. Após esfriar bem, pode colocar na geladeira para estocar;
6. Mergulhar a lâmina na agarose quente (60°C), retirar a agarose de um lado das lâminas com papel e colocar em posição horizontal para secar *overnight* em temperatura ambiente. Estas lâminas podem ser estocadas na geladeira e usadas por várias semanas.

PROCEDIMENTO

É importante que do início do procedimento até o final da etapa de eletroforese, manter as células **SEM CONTATO COM A LUZ**, para evitar que danos no DNA sejam gerados. As etapas devem ser realizadas em sala escura.

COLETA SANGUIENA E PREPARO DAS LÂMINAS:

1. Retirar o sangue com o auxílio de uma seringa heparinizada;
2. Adicionar 10 µl sangue a 1000 µl de solução salina;
3. Adicionar este microtubo em um suporte para tubos em gelo (obs: os microtubos não devem estar em contato com o gelo, mas sim em um suporte que esteja em contato com o gelo);
4. Ligar banho maria a 37°C
5. Pegar a agarose *low melting* na geladeira, quebrar com bastão de vidro e pôr no microondas para derreter.
NÃO DEIXAR FERVER em hipótese alguma deixando a agarose escurecer;
6. Marcar 1 minuto e ir abrindo aos poucos e mexendo com o bastão (cerca de 5 em 5 segundos);
7. Deixá-la bem transparente e colocá-la em banho maria à 37°C;
8. Adicionar em um microtubo 10µl da solução salina/sangue e 120µl de agarose *low melting*;
9. Homogeneizar suavemente com auxílio de um micropipetador e depois espalhar 3 gotas nas duas lâminas (é necessário fazer uma duplicata com cada amostra), previamente preparadas com agarose normal;
10. Em seguida cobrir com uma lamínula;
11. Levar lâminas na geladeira por cerca de 30 minutos para solidificar a agarose *low melting*;
12. Em seguida, retirar com cuidado (fazendo movimento circular para um dos lados) as lamínulas e acondicionar as lâminas em uma cuba de vidro para a etapa de lise.

ETAPA DE LISE:

1. Depois de acondicionar as lâminas em uma cuba de vidro para lise, adicionar à solução (no lado fosco das lâminas) de uso GELADA até cobrir a cuba;
2. Cobrir a cuba com papel alumínio;
3. Acondicionar em geladeira por no mínimo 1 hora, dentro de um outro recipiente pois a solução pode vazar;
4. No caso do material ser sêmen, pode ser que o tempo necessário para a lise varie e aumente o período de 1 hora.

ELETROFORESE:

1. Retirar as lâminas da solução de lise e acondicioná-las em uma cuba de eletroforese.
2. Esta cuba, deve estar condicionada em um recipiente com gelo, uma vez que esta etapa deve ocorrer em temperaturas baixas (a cuba deve estar RETA para que a solução fique homogênea/uniforme);
3. Acondicionar as lâminas lado a lado, de forma que não haja espaços entre elas. Se nas laterais da cuba "sobrar" espaço, preencher com lâminas esmerilhadas;
4. Adicionar o tampão de eletroforese (de modo que não caia direto nas lâminas) para uso gelado até cobrir as lâminas (apenas o suficiente);
5. Ajustar a fonte para eletroforese a 25V e a 300mA. Se necessário, ajustar as condições tirando ou colocando tampão.

mA	Abaixar	Retirar
mA	Aumentar	Colocar
V	Abaixar	Colocar
V	aumentar	Retirar

Atenção: Antes de iniciar a eletroforese, deixe as lâminas nesta solução por 30 minutos **(NO ESCURO)** e transcorrido esse tempo, realize a eletroforese por 20 minutos (de preferência, coloque a numeração para o lado negativo para que a corrente elétrica vá da esquerda para a direita - do preto pro vermelho).

NEUTRALIZAÇÃO:

1. Após a etapa da eletroforese, colocar as lâminas sobre uma bandeja ou "grelha" e adicionar cerca de 5 ml de solução de neutralização;
2. Deixar agir por cerca de 5 minutos.
3. Repita essa etapa 3 vezes. (escorrer a cada final de etapa);
4. Coloque para secar.

FIXAÇÃO

1. Depois de neutralizar as lâminas, deixá-las secar e em seguida acondicioná-las novamente em uma cuba de vidro;
2. Completar a cuba com etanol 100% e deixar por 10 minutos;

3. Transcorrido este tempo, retirar as lâminas do etanol e deixá-las secarem posição inclinada em temperatura ambiente;
4. Depois de secas, acondicioná-las em caixas plásticas e guarde na geladeira.

ANÁLISE DOS DADOS.

- Analisar em microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de 510-560nm e um filtro de barreira de 590nm, em aumento de 400X;
- Contar 100 células por lâmina (de acordo com a estatística definida no projeto);
- As células serão classificadas em uma classe de dano que é determinada de acordo com a intensidade e tamanho da cauda.

CLASSE	DANO
0	Não danificada
1	Pouco dano
2	Dano médio
3	Dano grande

- Classe 0 = sem danos aparentes;
- Classe 1 = cauda curta menor que diâmetro do núcleo;
- Classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo;
- Classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo.

Deve ser feito um escore da seguinte maneira por indivíduo:

Número de células classe 0X0
Número de células classe 1X1
Número de células classe 2X2
Número de células classe 3X3

*Depois disso, soma-se as escores de todos os indivíduos de um determinado grupo e divide-se pelo número de indivíduos obtendo assim um escore médio.

ANEXO B

Ensaio do cometa – Medidas utilizadas

SOLUÇÃO DE LISE:ESTOQUE

NaCl 2,5 M	146,1 g
EDTA 100mM	37,2g
Tris 10mM	1,2g
Lauril	10g
NAOH	Aproxima. 8g (ver abaixo)

1. Pesar todos os reagentes;
2. Adicionar os reagentes em um becker com aproximadamente 850 ml de água destilada;
3. Depois de colocar os reagentes, iniciar a medida do pH;
4. Adicionar aproximadamente 8g de NaOH em flocos até o pH ficar próximo de 9,8;
5. Complete com o restante da água (q.s.p.) para 1000ml sem interromper a medida do pH;
6. Depois de completar a água termine de acertar o pH para 10 com o mesmo NaOH.

VALIDADE: 6 meses

SOLUÇÃO DE USO:

Triton X-100	1ml
DMSO	10 ml
Solução de lise ESTOQUE	89 ml (q.s.p. 100mL)

Atenção: cada cuba de eletroforese tem a capacidade de acondicionar 18 lâminas, sendo necessários 100 ml para preenchê-la.

Em uma proveta adicionar o Triton, seguido pelo DMSO e por fim a solução de lise, então armazene.

TAMPÃO DE ELETROFORESE (300mM NaOH, 1mM EDTA)

SOLUÇÕES ESTOQUE - NaOH 10N

NaOH	200g
Água destilada	q.s.p. para 500 ml

Em um becker pesar 200g de NaOH e Adicione cerca de 500ml da água;

ATENÇÃO: Solução fica muito quente, devido à natureza exotérmica da reação, cuidado ao manusear.

VALIDADE: 15 dias

EDTA 200mM

EDTA	14,89g
Água destilada	q.s.p. 200ml

1. Em um becker, pesar o EDTA e coloque aproximadamente 150 ml da água;
2. Acerte o pH para próximo 9,5 com aproximadamente 3,0 g de NaOH;
3. Complete para 200 ml com água;
4. Confira o pH e ajuste-o para 10 com NaOH.

ATENÇÃO: Essa solução não tem validade, pode ser usada até acabar se armazenada na geladeira.

SOLUÇÃO DE USO:

EDTA 200Mm	5ml
NaOH 10N	30ml
Água destilada	q.s.p 1000ml

1. Verificar se o pH desta solução está superior a 13
2. Esta solução deve ser preparada no dia do Uso, e colocada na geladeira para que esteja em aproximadamente 4 graus na hora do uso.
3. Deve-se trocar esta solução à cada corrida de eletroforese.

TAMPÃO DE NEUTRALIZAÇÃO

Tris 0,4 M	48,5 g
Água destilada	q.s.p 1000ml

1. Em um becker pesar o tris e adicionar cerca de 850 ml da água;
2. Acertar o pH para 7,7 usando HCl concentrado (60%), usando aproximadamente 45ml;
3. Após esta etapa, completar com o restante da água e checar o pH, se necessário ajustar o pH até que este fique em 7,5.

ATENÇÃO: VALIDADE 6 meses

PBS

KCl (PM= 74,55) 2,68mM	0,2 g
KH ₂ PO ₄ (PM= 136,09) 1,47mM	0,2 g
NaCl (PM= 58,44) 136,89mM	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ ANIDRO (PM= 141,96) 8,10mM	1,15 g
Água destilada	q.s.p 1000 ml

1. Pesar os sais, e adicioná-los separadamente em um becker com aproximadamente 900 ml da água;
2. Em seguida acertar o pH para 7,4 e completar com a água, se necessário após completar a água ajustar o pH com (HCl)

PREPARO DA AGAROSE *LOW MELTING* (BAIXO PONTO DE FUSÃO)

O gel deve ser preparado com uma agarose de baixo ponto de fusão ou *low melting*, este gel deve ter a concentração de 0,5% (100mg (0,1g) de agarose para 20 ml de PBS). Depois de pesar a agarose, adicionar o PBS e por fim fundi-la no microondas

PREPARO DA AGAROSE DE PONTO DE FUSÃO NORMAL PARA LÂMINAS

Esta agarose deve ter a concentração de 1,5% (300mg (0,3g) de agarose para 20 ml de PBS).

1. Pesar a agarose e fundi-la com o PBS em microondas;
2. Em seguida fervê-la por aproximadamente 1 min;
3. Deixar a agarose esfriar e solidificar;
4. Refundi-la e em seguida fervê-la por 1 min (2 vezes).

Após a terceira fervida a agarose já pode ser usada para preparar as lâminas

PREPARO DE LÂMINAS COM A AGAROSE NORMAL

Depois de preparar a agarose normal como indicado anteriormente a agarose já pode ser usada, e se necessário acondicionada em geladeira, porém antes de usá-la para fazer as lâminas, deve-se:

1. fervê-la novamente e em seguida;
2. Colocá-la em banho maria com temperatura superior a 60°C;
3. Mergulhar a lâmina na agarose, em seguida limpa-se a superfície inferior da lâmina retirando-se o excesso;

4. Deixar as lâminas secando e depois guardá-las em geladeira

IMPORTANTE: enumere as lâminas, marque-as e separe as duplicatas na etapa da eletroforese. de modo que cada lâmina corra em uma cuba.

Obs: se necessário pode-se deixá-las secando “*over night*”.

Preparo das lâminas

1. Adicionar em um microtubo 10 μ l da solução (sangue/substância a ser analisada) e 120 μ l de agarose *Low Melting* (acondicionada em banho maria 37 °C);
2. Homogeneizar SUAVEMENTE com o auxílio de um micropipetador e depois colocar 3 gotas sobre uma lâmina previamente prepara da com agarose Normal;
3. Em seguida cobrir com uma lamínula (esta quantidade é suficiente para fazer 2 lâminas para cada indivíduo)
4. Levar estas lâminas para a geladeira por cerca de 30 minutos para solidificar a agarose *Low Melting*;
5. Em seguida retirar as lamínulas e acondicionar as lâminas em uma cuba de vidro para a etapa de lise (cada cuba acondiciona 18 lâminas).

Etapa de Lise

1. Depois de acondicionar as lâminas nas cubas de vidro para lise, adicionar a solução de lise de USO (GELADA) até encher a cuba;
2. Cubra a cuba com papel alumínio e acondicionar em geladeira por no mínimo 1 hora.

ELETROFORESE

1. Retirar as lâminas da solução de lise e acondicioná-las em uma cuba para eletroforese. Esta cuba deve estar acondicionada em um recipiente com gelo, uma vez que esta etapa deve ocorrer em temperaturas baixas.
2. É IMPORTANTE anotar respectivamente as lâminas que foram acondicionadas nas cubas enumeradas (1, 2 e 3), com seus respectivos cabos e fonte.

3. Acondicionar as lâminas lado a lado, de forma que não haja espaços entre as lâminas, se nas laterais das cubas “sobrar” espaço preencher com lâminas esmerilhadas;
4. Adicionar o tampão de eletroforese para USO gelado até cobrir as lâminas;
5. Ajustar a fonte para uma eletroforese a 25V e 300mA, se necessário ajustar estas condições tirando ou colocando tampão.

mAV	Abaixar	Retirar
	Aumentar	Colocar
	Abaixar	Colocar
	Aumentar	Retirar

6. Antes de iniciar a eletroforese, deixar as lâminas nesta solução por 30 minutos;
7. Transcorrido este tempo, realizar uma eletroforese por 20 minutos.

Neutralização

1. Após a etapa da eletroforese, colocar as lâminas sobre uma bandeja ou “grelha”
2. E adicionar cerca de 4 ml de solução de neutralização;
3. Deixar agir por cerca de 5 minutos e repetir esta etapa 3 vezes.

Fixação

1. Depois de neutralizar as lâminas, deixá-las secar e em seguida acondicioná-las novamente em uma cuba de vidro;
2. Completar a cuba com Etanol 100% e deixar por 10 minutos;
3. Transcorrido este tempo, retirar as lâminas do Etanol e deixá-las secar;
4. Depois de secas, guardá-las na geladeira.

Coloração:

Adicionar sobre cada lâmina 100µl de solução de coloração para USO e cobrir com lamínula, após 5 minutos já podem ser analisadas.

ANEXO C

As concentrações das lignanas

HINOQUININA – 8,4mg

8,4mg = 8.400µg/ml DMSO

Para 1ml de MC final (meio + SFB + fitohemaglutinina + linfócitos): 50µg de hinoquinina

8.400µg hinoquinina/1.000µl DMSO 50µg/ x

x = 5,952µl hinoquinina/ml MC final

ETILCUBEBA – 6,5mg

6,5mg = 6.500µg/ml DMSO

Para 1ml de MC final (meio + SFB + fitohemaglutinina + linfócitos): 50µg de etilcubebina

6.500µg etilcubebina/1.000µl DMSO 50µg/ x

x = 7,692µl etilcubebina/ml MC final

DIIDROCUBEBA – 9,8mg

9,8mg = 9.800µg/ml DMSO

Para 1ml de MC final (meio + SFB + fitohemaglutinina + linfócitos): 50µg de diidrocubebina

9.800µg diidrocubebina/1.000µl DMSO 50µg/ x

x = 5,102µl diidrocubebina/ml MC final

CUBEBA – 6,7mg

6,7mg = 6.700µg/ml DMSO

Para 1ml de MC final (meio + SFB + fitohemaglutinina + linfócitos): 50µg de cubebina

6.700µg cubebina/1.000µl DMSO 50µg/ x

x = 7,462µl cubebina/ml MC final

DMSO – usar o mesmo volume final calculado para a etilcubebina.

CICLOFOSFAMIDA

Solução-mãe:

06g ciclofosfamida/10ml solução fisiológica 60mg ciclofosfamida/1.000µl solução fisiológica

Concentração final:

0,4g ciclofosfamida/kg peso vivo 0,4g ciclofosfamida/L MC final 0,4mg ciclofosfamida/ml MC final

Para 1ml de MC final: 0,4mg ciclofosfamida:

60mg ciclofosfamida/1.000µl sol. fisiológica 0,4mg/ x

x = 6,666µl sol. mãe da ciclofosfamida/ml MC final.

ANEXO D

SEMEADURA DA CULTURA DE LINFÓCITOS

ANTES DA CULTURA: Realizar todas as etapas com jaleco, luvas descartáveis e máscara.

1. Retirar 130 ml de meio RPMI, 26 ml de SFB, heparina, 1,56ml de fito-hemaglutinina e 195µl de antibiótico da geladeira/freezer e deixar atingir 37° C em banho-maria;
2. Fazer a assepsia da câmara de fluxo com álcool 70%;
3. Etiquetar os 42 frascos de cultura:

	CN	CP 1X	CP 2X	DM	H	E	D	C
3ml	CN4K			DM4K	H4K	E4K	D4K	C4K
3ml	CN24K			DM24K	H24K	E24K	D24K	C24K
3ml	CN48K			DM48K	H48K	E48K	D48K	C48K
3ml	CN72K	CP72K1	CP72K2	DM72K	H72K	E72K	D72K	C72K
5ml	CN72A	CP72A1	CP72A2	DM72A	H72A	E72A	D72A	C72A
5ml	CN72T	CP72T1	CP72T2	DM72T	H72T	E72T	D72T	C72T
	22 ml	13 ml	13 ml	22 ml	22 ml	22 ml	22 ml	22 ml

4. Colocar os frascos e demais materiais que serão usados na câmara de fluxo;
5. Ligar o fluxo e acender a luz UV de esterilização pelo período pré-programado;
6. Heparinizar o embolo de 4 seringas de 10ml;
7. Após trocar a agulha, coletar cerca de 10ml de sangue do doador em cada uma das 4 seringas;
8. Inverter as seringas algumas vezes e deixar em repouso por cerca de 30min a 1h para separar soro da parte figurada do sangue.

DURANTE A CULTURA: Os passos seguintes devem ser realizados na câmara de fluxo com apenas o fluxo e a luz comum ligados e flambando o material a cada passo executado.

9. Em um frasco estéril de 200ml: acrescentar 26ml de soro fetal bovino (SFB) em 130ml de meio de cultura RPMI 1640 e acrescentar 0,195ml (195 µl) de antibiótico, agitar suavemente;

10. Acrescentar: 1,56 ml de fito-hemaglutinina. Dobrar a ponta da agulha de cada seringa com o sangue usando uma pinça e desprezar o soro em um tubo de centrífuga;
11. Colocar no meio de cultura cerca de 2 ml da parte intermediária entre o soro e a parte figurada do sangue (anel leucocitário) de cada seringa.
12. Aliquotar 3ml do MC final nos frascos CN4K, CN24K, CN48K e CN72K, flambar e fechar a boca dos frascos com tampa;
13. Vedar com parafilm e colocar na estufa a 37° C e anotar o horário de início da cultura ____.
14. Aliquotar 5ml do MC final nos frascos CP72A1 e CP72T1, flambar e fechar a boca dos frascos com tampa;
15. Vedar com parafilm e colocar na estufa a 37° C e anotar o horário do início da cultura ____.
16. Aliquotar 13 ml do MC final nos frascos CP72K1 e CP72K2.
17. No frasco CP72K1, colocar 99,996 µl da solução-mãe de ciclofosfamida (solução-mãe: 0,06g CP/ml; concentração final no MC: 0,4mg CP/ml).
18. Agitar suavemente;
19. Aliquotar 5ml do frasco CP72K1 nos frascos CP72A1 e CP72T1, flambar e fechar a boca dos frascos com tampa;
20. Vedar com parafilm e colocar na estufa a 37° C e anotar o horário de início da cultura ____.
21. No frasco CP72K2, colocar 199,992 µl da solução-mãe de ciclofosfamida (solução-mãe: 0,06g CP/ml; concentração final no MC: 0,4mg CP/ml);
22. Aliquotar 5 ml do frasco CP72K2 nos frascos CP72A2 e CP72T2. Flambar e fechar a boca dos frascos com tampa;
23. Vedar com parafilm e colocar na estufa a 37° C e anotar o horário de início da cultura ____.
24. Aliquotar 22 ml do MC final nos frascos DM4K, H4K, E4K, D4K e C4K;
25. No frasco DM4K, colocar 169,224 µl de DMSO e agitar suavemente;
26. Aliquotar 3 ml do frasco DM4K nos frascos DM24K, DM48K e DM72K e 5 ml nos frascos DM72A e DM72T, flambar e fechar a boca dos frascos com tampa,
27. Vedar com parafilm e colocar na estufa a 37° C. Anotar o horário de início da cultura ____.
28. No frasco H4K, colocar 130,944 µl de Hinoquinina e agitar suavemente;

29. Aliquotar 3 ml do frasco H4K nos frascos H24K, H48K e H72K e 5 ml nos frascos H72A e H72T, flambar e fechar os frascos com tampa;
30. Vedar com parafilm e colocar na estufa a 37° C. Anotar o horário de início da cultura ____.
31. No frasco E4K, colocar 169,224 µl de Etilcubebina e agitar suavemente;
32. Aliquotar 3 ml do frasco E4K nos frascos E24K, E48K e E72K e 5 ml nos frascos E72A e E72T. Flambar e fechar os frascos com tampa;
33. Vedar com parafilm e colocar na estufa a 37° C. Anotar o horário de início da cultura ____.
34. No frasco D4K, colocar 112,244 µl de Dihidrocubebina e agitar suavemente;
35. Aliquotar 3 ml do frasco D4K nos frascos D24K, D48K e D72K e 5 ml nos frascos D72A e D72T, flambar e fechar os frascos com tampa.
36. Vedar com parafilm e colocar na estufa a 37° C. Anotar o horário de início da cultura ____.
37. No frasco C4K, colocar 164,164 µl de Cubebina e agitar suavemente;
38. Aliquotar 3 ml do frasco C4K nos frascos C24K, C48K e C72K e 5 ml nos frascos C72A e C72T, flambar e fechar os frascos com tampa;
39. Vedar com parafilm e colocar na estufa a 37° C. Anotar o horário de início da cultura ____.