

Denigência Armando

**Avaliação Comparativa da Citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea* em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) por Microscopia e Citometria de fluxo**

Licenciatura em Ensino de Biologia com habilitações em Gestão de Laboratórios

Universidade Pedagógica de Maputo  
Maputo  
2024

Denigência Armando

**Avaliação Comparativa da Citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea* em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) por Microscopia e Citometria de fluxo**

Licenciatura em Ensino de Biologia com habilitações em Gestão de Laboratórios

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências Naturais e Matemática da Universidade Pedagógica de Maputo para obtenção do grau de Licenciatura em Biologia com habilitações em Gestão de Laboratórios

Orientador: Prof. Dr. Felisberto Lobo

Orientadora: Dra. Raquel Matavele Chissumba

Universidade Pedagógica de Maputo  
Maputo  
2024

## Índice

Índice de Figuras.....	V
Índice de Tabelas .....	VI
Declaração de honra.....	VII
Dedicatória .....	VIII
Resumo.....	X
Abstract .....	XI
Lista de abreviaturas .....	XII
1 Introdução.....	1
1.1 Objectivos .....	2
1.1.1 Geral:.....	2
1.1.2 Específicos.....	2
1.2 Problematização .....	3
1.3 Justificativa .....	4
1.4 Questões científicas .....	5
1.5 Hipóteses.....	5
2 Revisão de literatura.....	6
2.1 Aspectos taxonómicos da <i>Terminalia sericea</i> .....	6
2.1.1 Família <i>Combretaceae</i> .....	6
2.1.2 Género <i>Terminalia</i> .....	6
2.1.3 Descrição botânica da planta <i>Terminalia sericea</i> .....	7
2.1.4 Ocorrência .....	7
2.1.5 Descrição farmacológica .....	7
2.2 Metabolitos Secundários de plantas.....	8
2.2.1 Terpenos .....	9
2.2.2 Alcaloides.....	9
2.2.3 Compostos Fenólicos .....	10
2.2.4 Flavonoides .....	10
2.2.5 Taninos.....	11
2.2.6 Cumarinas.....	11
2.3 Definições .....	12
2.4 Técnicas de mensuração de Citotoxicidade .....	12
2.4.1 Citometria de fluxo .....	12
2.4.2 Princípio Básico.....	13
2.4.3 Microscopia com hemocitómetro .....	14
2.4.4 Princípio básico .....	15

3	Metodologia.....	17
3.1	Caracterização da área de estudo.....	17
3.2	Tipo de pesquisa.....	18
3.3	População/amostra.....	18
3.4	Material e Métodos.....	18
3.5	Obtenção do extrato das folhas.....	19
3.6	Considerações éticas, colecta de sangue e isolamento das células PBMC.....	19
3.7	Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da <i>Terminalia sericea</i> pela microscopia e citometria de fluxo.....	20
3.7.1	Cultura de células.....	20
3.7.2	Ensaio de citotoxicidade.....	20
3.7.3	Mensuração da citotoxicidade por Microscopia.....	23
3.7.4	Mensuração da Citotoxicidade por Citometria de fluxo.....	25
3.8	Análise Estatística.....	26
4	Resultados.....	27
4.1	Análise da Normalidade.....	27
4.2	Determinação da citotoxicidade por microscopia e por citometria.....	27
4.3	Análise da correlação dos resultados entre os métodos microscopia e citometria de fluxo.....	28
4.4	Comparação entre citotoxicidade mensurada por microscopia e citometria de fluxo.....	29
5	Discussão dos resultados.....	30
5.1	Análise da Normalidade.....	30
5.2	Determinação da citotoxicidade por microscopia e por citometria.....	30
5.3	Análise da correlação dos resultados entre os métodos microscopia e citometria de fluxo.....	31
5.4	Comparação entre citotoxicidade mensurada por microscopia e citometria de fluxo.....	32
6	Conclusão.....	34
7	Limitações.....	35
8	Recomendações.....	36
9	Referências Bibliográficas.....	37
10	Anexos.....	44
10.1	Anexo I- Formulário de contagem de células pela microscopia.....	44
10.2	Anexo II- Ilustração do processo de determinação da citotoxicidade através dos dois métodos: citometria de fluxo e microscopia.....	45
10.3	Anexo III- Análises estatísticas.....	47

## Índice de Figuras

Figura 1: Terminalia sericea, Planta (A) e Folhas e fruto (B) .....	8
Figura 2: Estrutura básica dos terpenos .....	9
Figura 3: Estrutura química de alguns alcaloides .....	10
Figura 4: Estruturas básica de Flavonoides .....	11
Figura 5: Taninos hidrolisáveis (a) e Condensados (b) .....	11
Figura 6: Estrutura básica das cumarinas .....	12
Figura 7: Citômetro de fluxo (BD FACS Canto II) .....	14
Figura 8: Microscópio óptico e Camara de Neubauer/ hemocitómetro .....	16
Figura 9: Representação da área de estudo .....	17
Figura 10: Esquema resumido do isolamento de células PBMC's .....	20
Figura 11: Esquema resumido do ensaio de citotoxicidade.....	26
Figura 12: Efeito citotóxico do extrato das folhas de Terminalia sericea em PBMCs mensurada por microscopia e Citometria.....	28
Figura 13: Gráfico de correlação da citotoxicidade do extrato de folhas de Terminalia sericea mensurada por citometria de fluxo (eixo Y) versus citotoxicidade do extrato de folhas de Terminalia sericea mensurada por microscopia (eixo X) com IC de 95% .....	28
Figura 14: Gráfico de Bland-Altman comparando a citotoxicidade medida por microscopia e citometria .....	29
Figura 15: Determinação da citotoxicidade observada através da citometria, gating das populações de células viveis (Live) e células não viáveis (Dead).....	45
Figura 16: Determinação da citotoxicidade observada através da microscopia. As células mortas são indicadas pelas setas laranjas e as células vivas pelas setas amarelas.....	45

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Lista dos materiais usados .....	18
Tabela 2: Análise da normalidade dos dados da citotoxicidade de <i>Terminalia sericea</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Tabela 3: Analise Estatística 1- Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos dados da citotoxicidade de <i>T. sericea</i> .....	47
Tabela 4: Analise Estatística - Teste de regressão não linear para verificar a citotoxicidade <i>T. sericea</i> mensurada por Microscopia .....	49
Tabela 5: Analise Estatística 3-Teste de regressão não linear para verificar a citotoxicidade <i>T. sericea</i> mensurada por Citometria .....	50
Tabela 6: Analise Estatística 4- Teste de Correlação de Spearman para verificar a correlação entre os métodos na mensuração da citotoxicidade de <i>T. sericea</i> .....	51
Tabela 7: Analise Estatística 5-Teste Bland-Altman para verificar os limites de concordância entre os dois métodos de avaliação da citotoxicidade .....	51

**Declaração de honra**

Eu, **Denigência Armando Comé**, declaro por minha honra que este trabalho com tema “ Avaliação Comparativa da Citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea* em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) por Microscopia e Citometria de fluxo” nunca foi apresentado na sua essência para quaisquer fins e é resultado da minha pesquisa e dedicação, estando indicadas, ao longo do texto e no capítulo de referências bibliográficas, todas as fontes por mim consultadas.

Maputo, Abril de 2024

.....

Denigência Armando Comé

**Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, Luísa Ricardo Siteo (*in memoriam*) e Armando Manuel Comé e aos meus avós Augusto Auze Pale e Eugenia Miguel Pale por terem-me ensinado que o estudo é o bem mais poderoso de um ser humano;

Às minhas tias Dercia, Liliana, Mirela e Maura Pale pelo incentivo e pela contribuição na minha formação.

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida, pela saúde, por ter permitido a realização deste trabalho e me ajudar a ultrapassar as dificuldades que enfrentei durante a realização do mesmo.

Aos meus supervisores: Prof. Dr. Felisberto Lobo e Dra. Raquel Matavele Chissumba pela paciência e orientação, e por me mostrarem o caminho da ciência, sendo pacientes e compreensivos, pelo apoio na revisão, análise e discussão de aspectos científicos do presente trabalho.

A todo corpo docente da FCNM que por meio do entusiasmo de suas aulas contribuíram para a minha formação técnico-científica.

A equipa do laboratório do Centro de Investigação e Treino em Saúde do Polana Caniço (CISPOC) em especial aos biólogos do MOVID pela ajuda na realização dos testes citotoxicidade.

A dra. Teresa Babetine, por ter-me ensinado, com muita paciência, todos os procedimentos e técnicas para a realização do ensaio de citotoxicidade.

Ao Técnico do Laboratório de Biologia Mestre Salvador Mesa, por ajudar na supervisão do material usado durante a pesquisa.

Aos meus colegas e amigos do curso de Licenciatura em Biologia com habilitações em Gestão de Laboratórios, pelo companheirinho em toda a nossa jornada da formação. Em especial á Rosa Alfai, Chineida Cumbana, Marta Zavale e Cintia Mussa pelo carinho, palavras de incentivo e amizade.

Enfim, agradeço a todos que participaram para o meu crescimento profissional e pessoal em diversos e inúmeros momentos da minha vida, e que ajudaram a construir este trabalho directa e indirectamente.

**Muito Obrigada!**

**Resumo**

A garantia de mensuração da citotoxicidade constitui um parâmetro crucial no uso de plantas medicinais. Este estudo avaliou a atividade citotóxica *in vitro* de extratos de folhas *Terminalia sericea* em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) por dois métodos citometria e microscopia. As PBMCs de doadores saudáveis foram expostas a concentrações variadas (1.95, 3.91, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml) por 24 horas. Foi usado o corante azul de tripano para a microscopia e Corante de Viabilidade Fixável (FVS) para a citometria a fim de determinar a viabilidade e inviabilidade das PBMCs humanas após o tratamento com os extratos. O extrato de *Terminalia sericea* apresentou baixa citotoxicidade para ambos os métodos a microscopia (LC50=2,4) e citometria (LC50=2,2). Houve uma correlação positiva e forte entre ambos os métodos submetidos na mensuração da citotoxicidade de *Terminalia sericea* ( $r=0,97$ ;  $p=0,001$ ) e uma boa concordância na mensuração da citotoxicidade pela citometria e microscopia ( $p=0,262$ ; viés=-0,9).

**Palavras-chave:** Citotoxicidade, *Terminalia sericea*, PBMCs, Citometria, Microscopia

**Abstract**

Ensuring cytotoxicity measurement is a crucial parameter in the use of medicinal plants. This study evaluated the in vitro cytotoxic activity of *Terminalia sericea* leaf extracts on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by two methods cytometry and microscopy. PBMCs from high donors were exposed to varying concentrations (1.95, 3.91, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours. Trypan blue dye was used for microscopy and Fixable Viability Dye (FVS) for cytometry to determine the directiveness and nonviability of human PBMCs after isolation. The *Terminalia sericea* extract showed the lowest level of cytotoxicity for microscopy ( $\text{LC}_{50}=2.4$ ) and cytometry ( $\text{LC}_{50}=2.2$ ). There was a positive and strong testimony between both methods submitted in measuring the cytotoxicity of *Terminalia sericea* ( $r=0.97$ ;  $p=0.001$ ) and a good agreement in measuring cytotoxicity by cytometry and microscopy ( $p=0.262$ ; bias=-0, 9).

**Keywords:** Cytotoxicity, *Terminalia sericea*, PBMCs, Cytometry, Microscopy

**Lista de abreviaturas**

**FCNM**- Faculdade de Ciências Naturais e Matemática

**CISPOC**- Centro de Investigação e Treino em Saúde do Polana Caniço

**CIDE**- Centro de Investigação e Desenvolvimento em Etnobotânica

**OMS**- Organização Mundial de Saúde

**FDA**- Administração Federal de Drogas

**PBMC**- Mononuclear cells from peripheral blood /Células Mononucleares de Sangue Periférico

**DMSO**- Dimetilsulfóxido

**FBS**- Fetal Bovine Serum/Soro Fetal Bovino

**PBS**- Phosphate-Buffered Saline/Tampão fosfato-salino

**FVS**- Fixable Viability Stain/ Corante de Viabilidade Fixável

**RPMI**- Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute;

**µg**- Micrograma

**µL**- Microlitro

**mL**- Mililitro

**EtOH**- Etanol

**CO<sub>2</sub>**- Dióxido de carbono

**°C** - grau Celsius

**h** - Hora

**pH**- Potencial hidrogeniónico

**LC50**– Concentração letal de 50%

## 1 Introdução

Desde tempos antigos, a população humana tem utilizado as plantas medicinais como agentes terapêuticos.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Kale et al., (2019), actualmente cerca de 80% da população mundial usa remédios extraídos de plantas medicinais. Portanto, a avaliação da citotoxicidade desempenha um papel fundamental na pesquisa farmacológica e na descoberta de novas terapias, fornecendo informações cruciais sobre os efeitos potenciais de compostos em células vivas. Assim como, garantir contagens precisas de células é fundamental para a administração de dosagens adequadas, evitando à ineficácia ou respostas autoimunes indesejados em pacientes submetidos a tratamentos terapêuticos, (ABRAHAM et al.,2021;HUANG et al.,2021).

O Congresso dos Estados Unidos reconheceu-se a importância da padronização dos métodos, conforme destacado no 21st Century Cures Act em 2016, para agilizar o desenvolvimento, garantir a qualidade e facilitar a aprovação regulatória de produtos de terapia celular e genética, (SARATA, 2016). O workshop “Synergizing Efforts in Standards Development for Cellular Therapies and Regenerative Medicine Products” realizado pela FDA em 31 de março de 2014, identificou a contagem de células e a garantia de medição de viabilidade foram identificadas como oportunidades para o desenvolvimento de padrões, (JUDITH et al.,2018; LIN-GIBSON et al.,2018). Desde então, a ISO publicou dois padrões de contagem de células, “ISO 20391-1:2018 Biotechnology – Cell Counting – Part 1: General Guidance on Cell Counting Methods” e “ISO 20391-2:2019 Biotechnology – Cell Counting – Part 2: Experimental Design and Statistical Analysis to Quantify Counting Method Performance”, que servem como orientação para pesquisadores que trabalham na área de imunoterapia e terapia celular adotiva, onde medições precisas, robustas e de alta qualidade de contagem de células são essenciais para produtos biológicos e celulares.

Embora a literatura ainda seja escassa em relação a estudos sobre a validação de métodos de contagem de células em Moçambique, uma pesquisa entre 400 pesquisadores que trabalham com culturas de células animais revelou que 71% usam câmaras de contagem, também conhecidas como hemacitômetros e microscópio, para realizar cálculos de densidade celular viável e não viável, (CAMACHO-FERNÁNDEZ et al.,2018).

Neste estudo, concentramo-nos em comparar a avaliação da citotoxicidade *in vitro* da *Terminalia sericea* por meio de dois métodos principais: o método manual, que envolve a observação direta e contagem manual de células, e a citometria de fluxo, uma técnica automatizada que oferece análises rápidas e quantitativas. Busca-se também avaliar se ambos os métodos são igualmente eficazes na detecção de efeitos citotóxicos da *Terminalia sericea*, além disso, busca-se quantificar a concordância entre os resultados obtidos por ambos os métodos e considerar as implicações práticas dessas descobertas para a pesquisa farmacológica e a avaliação da citotoxicidade.

## **1.1 Objectivos**

### **1.1.1 Geral:**

- ✚ Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea* utilizando os métodos Microscopia e citometria de fluxo

### **1.1.2 Específicos**

- ✚ Determinar a citotoxicidade *in vitro* da *Terminalia sericea* pela microscopia e citometria de fluxo;
- ✚ Correlacionar os resultados da microscopia e citometria de fluxo na mensuração da citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea*;
- ✚ Verificar a concordância entre a microscopia e citometria de fluxo na mensuração de citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea*.

## 1.2 Problematização

De acordo com Herrera et al., (2015) e ISO 20391-2 (2019), a mensuração da inviabilidade/viabilidade celular é um parâmetro crucial para estudos baseados em células. Esses estudos podem ser para diversos propósitos, como a citotoxicidade, o gerenciamento de culturas de células em pesquisa biológica, avaliação da potência e eficácia da terapia baseada em células e controles em processo ou bioprocessos industriais. Os avanços na instrumentação resultaram em uma ampla gama de técnicas e instrumentos de contagem de células, tanto para contagens totais e/ou diferenciais de forma precisa.

Dentre as técnicas de contagem de células viáveis e inviáveis desenvolvidos até o momento no âmbito da citotoxicidade, a contagem manual com microscópio óptico tem sido a técnica mais utilizada devido ao seu baixo custo e versatilidade. No entanto, a contagem de células com essa técnica é considerada sujeita à variação inter-observador. As razões para tal variação podem incluir, contar poucos quadrados e poucas células, distribuição desigual de células na amostra ou nas câmaras do hemacitômetro (erro de amostragem), Rubeai et al., (1997).

Nos últimos tempos no mundo, com o surgimento de terapias baseadas em células aumentou a necessidade da qualidade, robustez e validade das medições da inviabilidade/viabilidade celular, (LIN-GIBSON, SARKAR & ELLIOTT,2018). Sob essa óptica, a ISO 20391-2 (2019), assinala a necessidade de determinar a precisão e a exatidão de uma técnica utilizando uma abordagem de comparabilidade com uma técnica mais estabelecida, padrão.

Em Mocambique, relativamente a microscopia, não existe uma informação específica (estudo) sobre a validação dessa técnica para a mensuração de células no âmbito da citotoxicidade. Dentro desta perspectiva surge a seguinte questão: *Será que a técnica de microscopia é tão eficaz quanto a técnica de citometria de fluxo no que concerne ao teste de citotoxicidade in vitro?*

### 1.3 Justificativa

Considerando a relevância da contagem precisa do número de células viáveis e não viáveis na citotoxicidade *in vitro*, este trabalho tem o intuito de se aprofundar no tema e gerar informações relevantes para os ensaios da citotoxicidade. Em países em desenvolvimento, como Moçambique, recursos limitados podem dificultar o acesso a tecnologias mais avançadas, como a citometria de fluxo. Portanto, a adoção de técnicas de contagem celular mais acessíveis e de baixo custo, como a contagem por microscopia, pode ser crucial para incentivar e viabilizar a realização de estudos de citotoxicidade.

Ao validar a medição de citotoxicidade por microscopia, este estudo contribuirá para a consolidação de métodos alternativos, isso é especialmente relevante em regiões onde a disponibilidade de recursos e tecnologias de ponta é limitada, podendo fornecer uma abordagem eficaz para identificar plantas medicinais potencialmente tóxicas garantindo a segurança e a eficácia da medicina tradicional em comunidades onde o uso de plantas medicinais é difundido.

Esta pesquisa desempenha um papel importante na otimização dos métodos de avaliação de citotoxicidade e contribuindo para o avanço da pesquisa científica em áreas como biologia celular, farmacologia e medicina tradicional, assim como informações e percepções importantes para o desenvolvimento de terapias mais seguras e eficazes.

Ao mensurar a citotoxicidade de *Terminalia sericea*, é fundamental para geração de informações importantes sobre uso seguro e consequente validação do uso tradicional com base em evidências científicas contanto o seu amplo uso pela população em adulta e em crianças como remédio de lua.

#### 1.4 Questões científicas

- ✚ Existe correlação entre microscopia e citometria de fluxo na mensuração da citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea*?
- ✚ Será que existe concordância entre microscopia e citometria de fluxo na citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea*?

#### 1.5 Hipóteses

**H<sub>1</sub>**: Existe alguma correlação entre a microscopia e citometria de fluxo na mensuração da citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea*

**H<sub>0</sub>**: Não existe nenhuma correlação entre a microscopia e citometria de fluxo na mensuração da citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea*

**H<sub>1</sub>**: Existe alguma concordância entre a microscopia e citometria de fluxo na mensuração da citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea*

**H<sub>0</sub>**: Não existe nenhuma concordância entre a microscopia e citometria de fluxo na mensuração da citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea*

## 2 Revisão de literatura

### 2.1 Aspectos taxonômicos da *Terminalia sericea*

#### 2.1.1 Família *Combretaceae*

*Combretaceae* é uma família botânica da ordem *Myrtales*, que ocorre predominantemente em áreas tropicais e subtropicais. A família apresenta uma ampla distribuição das espécies incluindo árvores, arbustos e lianas distribuídas em aproximadamente 20 gêneros, dos quais o *Combretum* e *Terminalia* são mais comumente distribuídas nas regiões de África e Ásia, (SOUSA,2010; BATISTA, 2011; DUARTE,2021). Essa família, apresenta folhas opostas, simples, estipulas ou vestigiais, margem inteira, penínervas, frequentemente concentrados no ápice dos ramos, ocasionalmente nectários extra-florais. Inflorescência racemosa e geralmente espiga. Apresenta também flores geralmente pouco vistosas e bissexuadas, actinomorfas, mono ou declamídeas, geralmente com disco nectarífero, (SOUSA,2010).

Em países dos continentes Africano e Asiático muitas espécies da família *Combretaceae* pertencentes relativamente aos gêneros *Combretum* e *Terminalia* são usadas na medicina popular para combater diversas doenças como malária, infecções, tosse, feridas, diarreia, inflamações, e disenteria, (SOUSA,2010; SANTOS,2012; HAÏDARA et al.,2022).

#### 2.1.2 Gênero *Terminalia*

O gênero *Terminalia* é o segundo maior gênero da família *Combretaceae* após o *Combretum*, com cerca de 200 espécies de árvores e arbustos, sendo amplamente distribuídas nas regiões tropicais do mundo, (FAHMY, AL-SAYED e SINGAB,2015;NAIR, ANJUM e TRIPATHI, 2018; RIBEIRO, LOIOLA e SALES,2018). O nome genérico do gênero *Terminalia* é derivado do latim *Terminus*, que significa “ limite” referindo-se ao fato de as folhas aparecem nas pontas dos brotos. As espécies desse gênero variam de arbustos a grandes árvores florestais decíduas chegando em altura até 75 m de altura.

Conforme referência de FAHMY, AL-SAYED E SINGAB (2015) os membros do gênero *Terminalia* são amplamente utilizados na medicina tradicional em vários continentes do mundo para o tratamento de inúmeras doenças incluindo distúrbios abdominais, infecções bacterianas, resfriados, dores de garganta, conjuntivite, diarreia, disenteria, febre, úlceras gástricas, dores de cabeça, Doenças cardíacas, ancilumbante,

hipertensão, icterícia, hanseníase, sangramento nasal, edema, pneumonia e doenças de pele.

### **2.1.3 Descrição botânica da planta *Terminalia sericea***

*T. sericea* (Fig.1) é uma espécie conhecida popularmente em Maputo como Gonono, Miputua e Nkonola. Essa espécie é comum como arbusto ou árvore decídua, com cacho de folhas prateadas crescendo até uma altura de cerca de 9 m na floresta, mas isoladamente pode atingir 23m de altura, com casca marrom acinzentada que se desprende em tiras, (VIRIATO,2013).

Conforme referência de NAIR, ANJUM e TRIPATHI (2018) e ORWA et al., (2009), as folhas são verde-azuladas, simples e alternadas, estritamente elípticas a estreitamente abovadas-elípticas, dispostas em espirais ou cachos. Paralelamente são ovais com margens inteiras e ambas as superfícies revestidas de pêlos prateados. A floração ocorre principalmente em setembro-janeiro, colapsando com frutos com uma cápsula achatada de duas asas, de cor rosada ou marrom-purpura, com cheiro desagradável.

### **2.1.4 Ocorrência**

Segundo ORWA et al., (2009), a *Terminalia sericea* é endêmico na África, cresce em floresta aberta mista e em solos arenosos e distribui-se desde a Tanzânia e República Democrática do Congo ao sul da África do Sul, Namíbia, Botswana, Zimbabué, Angola, Moçambique, Zâmbia, Malawi e Tanzânia.

Em Moçambique é distribuída em todo o território do Rovuma a Maputo, (VIRIATO,2013).

### **2.1.5 Descrição farmacológica**

Em muitas partes de África, as raízes, casca de caule e folhas da *Terminalia sericea* são amplamente aplicados no sistema tradicional de medicamentos. É relatado que diferentes partes da planta são utilizadas para vários fins terapêuticos. Informações etnomédicas revelaram que a planta é comumente usada para o tratamento de tosse, infecções de pele, diabetes, diarreia e gonorreia, venéreas, disenteria, cólica, pneumonia, tosse, nariz entupido e insônia, tuberculose, esquistossomose, ciclo menstrual, problemas de infertilidade e inflamações, (ORWA et al. 2009; NAIR, ANJUM E TRIPATHI, 2018).

A triagem da literatura disponível sobre a *T. sericea* revelou numerosas atividades biológicas em vários modelos *in vivo* e *in vitro*. As atividades biológicas incluíram atividades antidiabética, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, (FAHMY, AL-SAYED E SINGAB,2015).

Nome científico: *Terminalia sericea* (Nkonola)

### **Classificação Sistemática**

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

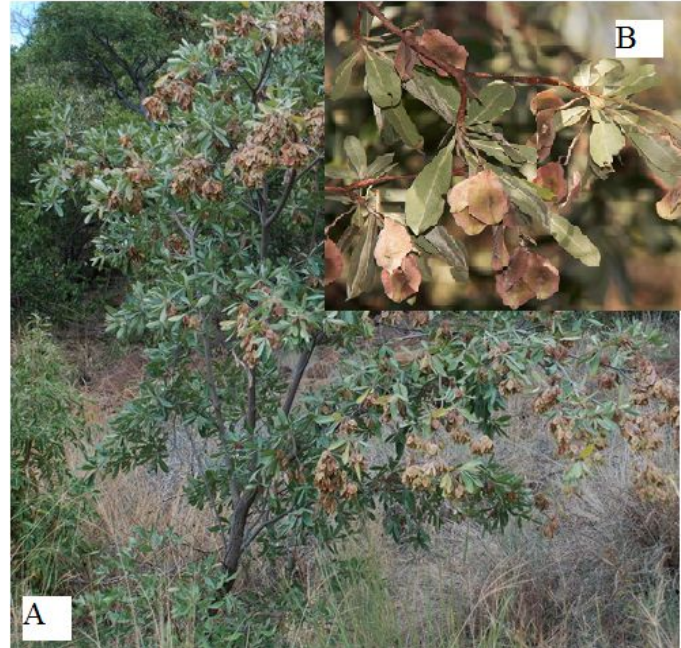
Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Myrtales*

Família: *Combretaceae*

Género: *Terminalia*

Espécie: *Terminalia sericea*



**Figura 1:** Terminalia sericea, Planta (A) e Folhas e fruto (B).

**Fonte:** <https://wildflownursery.co.za/indigenous-plant-database/terminalia-sericea/>

## **2.2 Metabolitos Secundários de plantas**

As plantas produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que parecem não desempenhar um papel vital para crescimento e desenvolvimento, mas sim são importantes na interação entre a planta e seu ambiente, sendo conhecidas como Metabolitos secundários, (LIMA,2015).

Metabolismo secundário de plantas é o conjunto de processos metabólicos que originam compostos que não possuem distribuição universal nos vegetais, por não serem necessários a todas as plantas. Assim sendo, são responsáveis pelas relações entre o indivíduo e o ambiente onde eles encontram-se actuando como agentes:

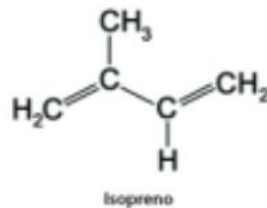
- ✚ De defesa para combate de organismos patogénicos, insectos fitófagos e herbívoros predadores;
- ✚ Capazes de atrair animais polinizadores e dispersores de sementes, provendo assim a perpetuação de uma dada espécie.

De acordo com TAIZ & ZEIGER (2004 *apud* LIMA,2015) os metabólitos secundários podem ser divididos em três principais grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados sendo vários destes metabólitos já descritos na *Terminalia sericea* como é o caso de:

### 2.2.1 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides constituem o maior e mais diversificado grupo de metabólitos secundários, estando presentes amplamente nas folhas, flores e frutos. São derivados do elemento estrutural isopreno (C<sub>5</sub>) (Fig.2) e são classificados em monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>) e politerpenos (+ C<sub>40</sub>), (NEVES & CUNHA,2015; NISSAR et. al.,2018).

Alguns terpenos possuem função bem caracterizada no crescimento e desenvolvimento vegetal, podendo ser considerados em alguns casos como metabólitos primários ao invés de secundários (BERGAMASCHI, 2010). Os terpenos também são tóxicos para muitos parasitas e herbívoros, exercendo assim um importante papel de defesa do reino vegetal.



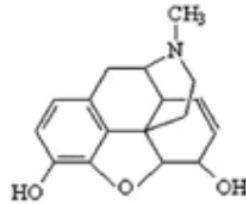
**Figura 2:** Estrutura básica dos terpenos

**Fonte:** <https://oetnobotanico.wordpress.com/2015/05/08/este-quimico-sou-eu-a-borracha-e-outros-metabolitos-secundarios/>

### 2.2.2 Alcaloides

São compostos nitrogenados que possuem em sua estrutura o nitrogênio (Fig.3). Os alcaloides constituem uma família com mais de 15000 metabólitos secundários nitrogenados, sintetizados a partir de aminoácidos (lisina, tirosina e triptofano). Sua estrutura química é composta de átomos de carbono e nitrogênio, tendo em seu anel heterocíclico um átomo de nitrogênio (BERGAMASCHI, 2010). Esses compostos podem ser encontrados em toda a planta ou, às vezes, em uma parte específica da planta

atuando na defesa das plantas contra os parasitas e herbívoros. Assim como tem despertado um grande interesse devido as suas propriedades medicinais apesar de apresentarem um alto grau de toxicidade, (BERGAMASCHI, 2010; KAUSHIK,2021).



**MORFINA**

**Figura 3:** Estrutura química de alguns alcaloides

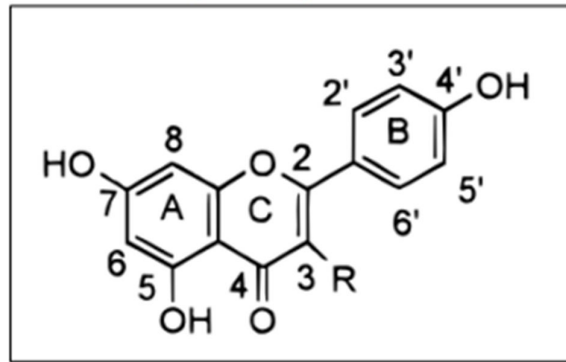
**Fonte:** NEVES & CUNHA,2015

### 2.2.3 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, os quais são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Os compostos fenólicos ou polifenóis contribuem para as propriedades antioxidantes e sensoriais (cor, aroma, adstringência) dos vegetais. Essas substâncias estão envolvidas na adaptação a condição de estresses ambientais, seja na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos, (LIMA,2015; HOLANDA,2017). Segundo TAIZ E ZEIGER (2004 *apud* LIMA,2015), os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, dentre eles, destacam-se os flavonoides, fenóis simples, cumarinas, taninos e antraquinonas

### 2.2.4 Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários de baixo peso molecular ubiqüamente presentes nas plantas, abrangendo mais de 10.000 estruturas. Eles representam a classe mais comum e amplamente distribuída de fenólicos de plantas. Esses possuem 15 carbonos (Fig.4) dispostos em dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos. Os flavonóides são classificados em diferentes grupos, principalmente com base no grau de oxidação dos três carbonos ponte sendo chalconas, flavonas, flavonóis, flavandióis, antocianinas e proantocianidinas, (NISSAR et. al.,2018).

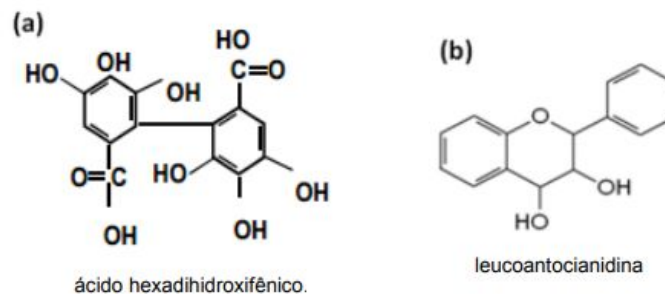


**Figura 4:** Estruturas básica de Flavonoides

**Fonte:** <https://www.infoescola.com/bioquimica/flavonoides/>

### 2.2.5 Taninos

Taninos são polifenóis encontrados principalmente em folhas, casca e madeira de plantas, são solúveis em água, com pesos moleculares geralmente entre 500 e 3000 Daltons (Mangan, 1988 citado por CORDÃO et al. 2010) e com a habilidade de formar ligações com e precipitar, vários tipos de proteínas, aminoácidos e polissacarídeos. Os taninos são classificados em hidrolisáveis e condensados (Fig.5) com base na sua estrutura química e propriedades, (NISSAR et. al.,2018).

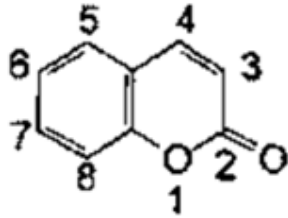


**Figura 5:** Taninos hidrolisáveis (a) e Condensados (b)

**Fonte:** [http://www.faacz.com.br/repositorio\\_de\\_tccs/.pdf](http://www.faacz.com.br/repositorio_de_tccs/.pdf)

### 2.2.6 Cumarinas

A cumarina é um composto químico orgânico perfumado da classe química benzopirona (Fig.6), que é uma substância cristalina incolor em seu estado padrão (Raj et al., 2015 citado por MATHEW,2016. Na perspectiva de SANTOS, SIQUEWIRA & FILHO (2013) a cumarina é um princípio ativo natural que pode ser encontrado em diversas plantas principalmente nas famílias, como na *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, sendo em concentrações abundantes nos frutos, sementes e raízes.



**Figura 6:** Estrutura básica das cumarinas

**Fonte:** SIMOES et. al.,2017

### 2.3 Definições

**Citotoxicidade** pode ser conceituada como a capacidade que uma substância possui de inibir a proliferação celular ou causar danos e lesões às células, que as levam a morte celular,( SUDEEP et.al.,2017).

**Viabilidade celular** é definida como o número de células saudáveis em uma amostra e a proliferação celular é um indicador vital para compreender os mecanismos em ação de certos genes, proteínas e vias envolvidos na sobrevivência ou morte celular após exposição a agentes tóxicos, (ADAN, KIRAZ & BARAN, 2016).

### 2.4 Técnicas de mensuração de Citotoxicidade

Como a grande maioria das técnicas analíticas, também a contagem de células foi sofrendo evoluções ao longo dos tempos, desde métodos unicamente manuais a métodos cada vez mais automatizados e expeditos.

De acordo com RODRIGUES (2011), de uma forma geral, a contagem de células no ensaio de citotoxicidade pode ser efectuada, por:

- ✚ Microscopia;
- ✚ Citometria de Fluxo;
- ✚ Espectofotometria;
- ✚ Impedância eléctrica;

#### 2.4.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método para medição qualitativa e quantitativa de células e outras partículas em suspensão, submetidas a um fluxo, (ALFONSO e RUBEAI,2011; ROCHA, 2019). Dentro desta ótica CARVALHO, RIBEIRO e FERRAZ (2010) afirmam que a medição da qualidade é relativa ao tamanho das células, granularidade

relativa ou complexidade interna (DNA, RNA, actividade enzimática, produção de citocinas, íons).

De acordo com RODRIGUES (2011), a primeira citometria de fluxo foi projetada como um simples contador de células, mas aplicações de citometria de fluxo de dois parâmetros foram desenvolvidas imediatamente. Portanto a citometria de fluxo é uma técnica amplamente utilizada na análise de células e partículas em várias áreas da pesquisa biomédica. Seu desenvolvimento ao longo dos anos remonta à década de 1950 e foi marcado por avanços tecnológicos significativos. As raízes da citometria de fluxo remontam a 1934, quando Andrew Moldavan desenvolveu um sistema inicial para contar células usando um detector fotoelétrico. Posteriormente, em 1948, Wallace Coulter inventou o contador Coulter, que permitiu a contagem de células com base na impedância elétrica. O uso de corantes e fluorescência foi introduzido nos anos seguintes, permitindo análises mais complexas de células e partículas. Desde então, a citometria de fluxo tornou-se uma ferramenta indispensável em aplicações clínicas, diagnóstico de doenças, pesquisa de células-tronco, análise de DNA e muito mais, (BRAGA et al.,2016; VEMBADI et al.,2019)

#### **2.4.2 Princípio Básico**

O princípio básico da citometria baseia-se no citômetro fluxo (Fig.7) e resume-se no emprego de uma radiação laser direcionada, que excita fluorocromos presentes nas células, através das quais pode-se interpolar informações biológicas, moleculares e/ou químicas das células em suspensão, (BECTON e DICKINSON, 2002).

Assim sendo as células então marcadas são transportadas e protegidas por um fluxo hidrodinâmico contínuo (solução salina), que acomoda as mesmas, de forma que individualmente sejam interceptadas pelo laser. Ao ser excitado pela radiação do laser, o fluorocromo emite luz, que dependendo do comprimento de onda, possui uma cor característica. Os sistemas óticos (espelhos) e eletrônicos, coletam, filtram e convertem em pulsos elétricos os parâmetros de dispersão de luz e fluorescência emitidos. A aquisição destes parâmetros se dá através de um sistema computacional específico, permitindo ainda que o usuário interaja com o citômetro e controle as funções da mesma. A seguir, os pulsos elétricos são convertidos em dados digitais ou analógicos, enviados a um computador e avaliados em *software* específico capaz de reproduzir através de gráficos mono e biparamétricos, informações físicas, químicas e biológicas

de cada célula, em função da intensidade de fluorescência e da luz dispersada, (BECTON e DICKINSON, 2002; CARVALHO, RIBEIRO e FERRAZ, 2010)

#### **Vantagens:**

- ✚ Rapidez e confiabilidade na medição de viabilidade;

#### **Desvantagens:**

- ✚ Complexidade do instrumento;
- ✚ Alto custo de manutenção.



**Figura 7:** Citômetro de fluxo (BD FACS Canto II)

**Fonte:** Autora, 2023

#### **2.4.3 Microscopia com hemocítmetro**

De acordo com Rubeai et al (1997) e Kummrow (2012) a microscopia com hemocítmetro constitui uma técnica clássica e versátil que permite avaliar qualitativamente as células usando diferentes técnicas de coloração de acordo com a finalidade das análises.

Historicamente, a microscopia óptica teve seu início com o trabalho do holandês Antony van Leeuwenhoek, no início do século XVII especificamente no ano de 1674 o que promovendo uma verdadeira revolução na ciência médica, (Braga et al.,2016). Nessa época o microscópio era um instrumento rudimentar, de pequenas dimensões,

composto por um suporte da amostra, um tradutor da amostra, um botão de foco, por única lente de vidro. Contudo, o instrumento possibilitou a ampliação de aproximadamente 300 vezes, com o qual observou-se pequenas estruturas micrométricas (células), de resolução variável entre um a dois micrômetros, com moderada nitidez.

Posteriormente, Robert Hooke aperfeiçoou o microscópio de Leeuwenhoek, com a criação do primeiro microscópio composto por duas lentes, que permitiu melhor ampliação da imagem. Embora os estudos conduzidos por Leeuwenhoek e Hooke tenham contribuído para as primeiras descobertas no campo da biologia celular, somente em 1856, com a descoberta do primeiro corante sintético, a anilina roxa, por William Henry Perkin, houve um avanço significativo na análise de células. Finalmente, em 1870, Paul Ehrlich começou utilizar corantes em suas amostras, o que permitiu a distinção entre diferentes tipos de células brancas. A partir dessa descoberta, a análise celular foi acrescido ao microscópio e aos corantes sintéticos.

Depois que o hemocítômetro foi inventado por Louis Charles Malassez em 1874 e melhorado significativamente por Karl Burkner (1872-1957) possibilitou amplamente a investigações de doenças como a malária a partir da análise clínica das células e diagnósticos foram determinados pela enumeração de células, assim como realização de estudos envolvendo células, (GREEN e WACHSMANN-HOGIU, 2015; VEMBADI et al.,2019).

#### **2.4.4 Princípio básico**

Entre os métodos de contagem de células viáveis bem conhecidos e desenvolvidos até agora, a contagem manual com um hemocítômetro e microscópio óptico (Fig.8) tem sido o método mais comumente usados para determinar o número de células e avaliar a viabilidade em uma população de células, (KIM et al.,2011; Herrera et al.,2015).

A suspensão de células é arrastada para as câmaras por ação capilar entre a grade do hemocítômetro e a lamela, formando uma camada fina. Usando o contador manual, conta-se as células vivas/mortas nos quadrantes dos cantos. De uma forma geral, neste método utiliza-se uma suspensão diluída da amostra a analisar que vai ser colocada na câmara de contagem de Neubauer e observada ao microscópio.

O princípio básico da microscopia baseia-se na reflexão da luz direcionada sobre a amostra, ao chegar na amostra, ela é absorvida e posteriormente refratada e concentrada

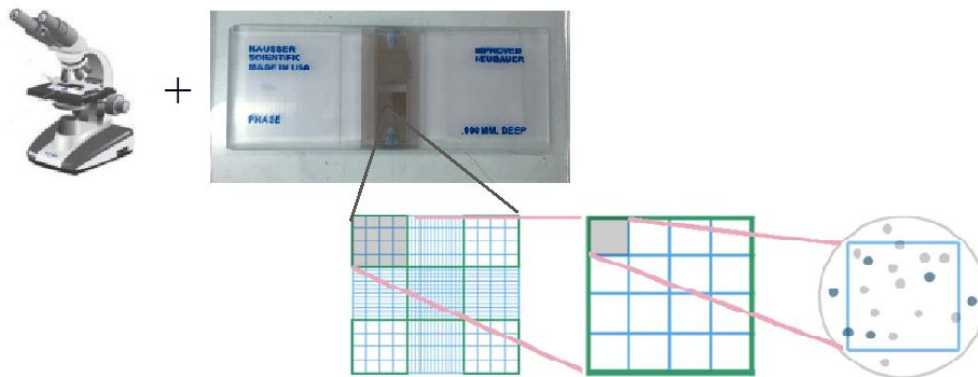
na objectiva formando uma imagem ampliada que pode ser visualizada pela ocular e consequente enumeração de células dentro de um número específico de campos microscópicos pela coloração seletiva de células mortas geralmente com azul de tripano, (ASBC,2011; Riss et al., 2019).

### Vantagens:

- + Simplicidade do método;
- + Baixo custo e versatilidade

### Desvantagens

- + Altamente propenso ao erro de amostragem (distribuição desigual de células na amostra ou nas câmaras do hemocitómetro);
- + Altamente trabalhoso e lento ao lidar com um grande número de culturas;
- + Sujeita a erros de contagem (~10%)

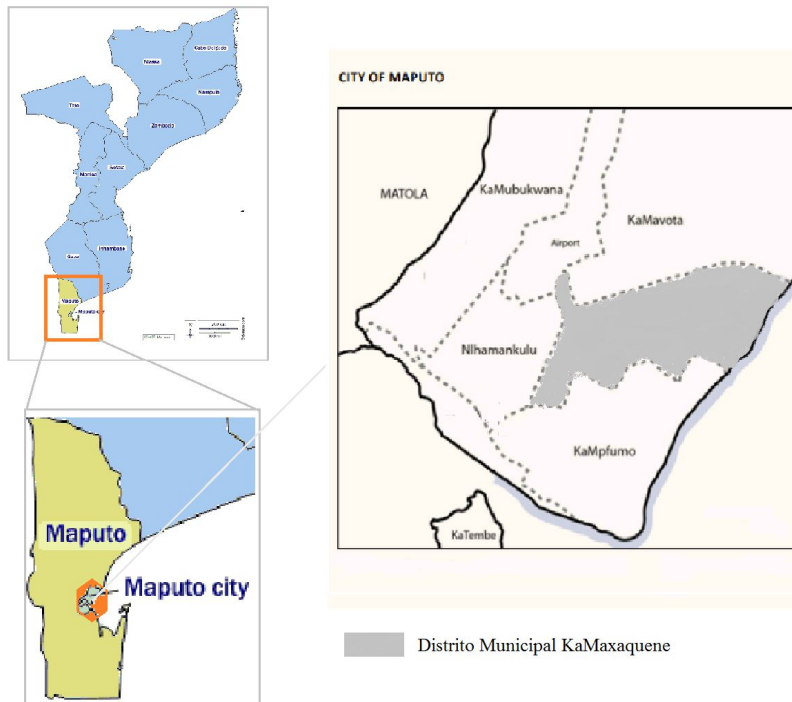


**Figura 8:** Microscópio óptico e Camara de Neubauer/ hemocitómetro

**Fonte:** Autora, 2023.

### 3 Metodologia

#### 3.1 Caracterização da área de estudo



**Figura 9:** Representação da área de estudo

**Fonte:** Autora, 2023.

O Distrito Municipal KaMaxakeni é um dentre os sete distritos municipais que estruturam as unidades orgânicas do Município de Maputo, definidas pelo Estatuto Orgânico dos Serviços Técnicos e Administrativo do Município, aprovado pela Resolução n.º 50/AM/2020 de 15 de Dezembro.

O distrito encontra-se localizado numa zona de confluência de três distritos municipais, apresentando como limite norte o Distrito Municipal KaMavota, pela Av. Das FPLM, sul pelo Distrito Municipal KaMpfumu, na Av. Marien Ngouabi e Joaquim Chissano, oeste com Distrito Municipal Nhlamankulu, na Av. De Angola e a este pela Av. Marginal e a Praia, na zona do Clube Naval, (UAQUESSA,2016; CHIBAMO, 2021).

O distrito ocupa uma superfície de 19,9 km<sup>2</sup>, com uma população estimada em cerca de 222.756 habitantes por Km<sup>2</sup> nos quais neste universo podemos encontrar 109.528 homens e 113.228 mulheres e em termos de agregado familiar temos um universo total de 84380, (UAQUESSA,2016).

### 3.2 Tipo de pesquisa

A presente pesquisa é quantitativa a qual fez-se a avaliação quantitativa de citotoxicidade de *Terminalia sericea*, pela mensuração de morte celular em linhagem celular de PBMC após o tratamento com o extrato, assim como a quantificação da concordância entre os resultados obtidos por ambos os métodos microscopia, citometria de fluxo e posteriores inferências estatísticas, seguindo a perspectiva de SCHNEIDER (2013), o qual afirma que a pesquisa de caracter quantitativa constitui uma pesquisa na qual o investigador coleta e analisa dados, integra os resultados e faz inferências usando abordagens quantitativos/ numéricos no estudo/investigação.

### 3.3 População/amostra

Fazem parte da população em estudo os pacientes doadores de sangue para o isolamento de células para a mensuração da citotoxicidade de *Terminalia sericea*, tendo sido escolhidos utilizando o método de amostragem não probabilística por conveniência na qual visa selecionar aqueles indivíduos que atendem aos critérios de uma população-alvo e em melhores condições de acessibilidade, (FONTELLES,2012). Com base nesta afirmativa, os pacientes que fazem parte da amostra foram selecionadas utilizando como critérios aceitabilidade pela assinatura do consentimento, saudáveis, sem histórico de doença crônica ou doença autoimune.

### 3.4 Material e Métodos

**Tabela 1:** Lista dos materiais usados

Análise	Materiais	Reagentes
<b>Ensaio de citotoxicidade</b>	Tubos de falcon de 15 e 50, Tubos de Leucosep, Micropipetas, Pipetas serológicas de 10ml, Criovials, Garrafas de cultura, Papel de filtro, Pontas, Balança, Camara de Neubauer ou hemocítometro, Microscópio óptico, Lamínulas, Contadores manuais, Tubos de Facs, Citômetro de fluxo, Eppendorfs, papel de lentes	FBS, PBS, DMSO, RPMI-1640, Ficoll, Trypan Blue, Fixable viability Stain, Etanol a 70%

### 3.5 Obtenção do extrato das folhas

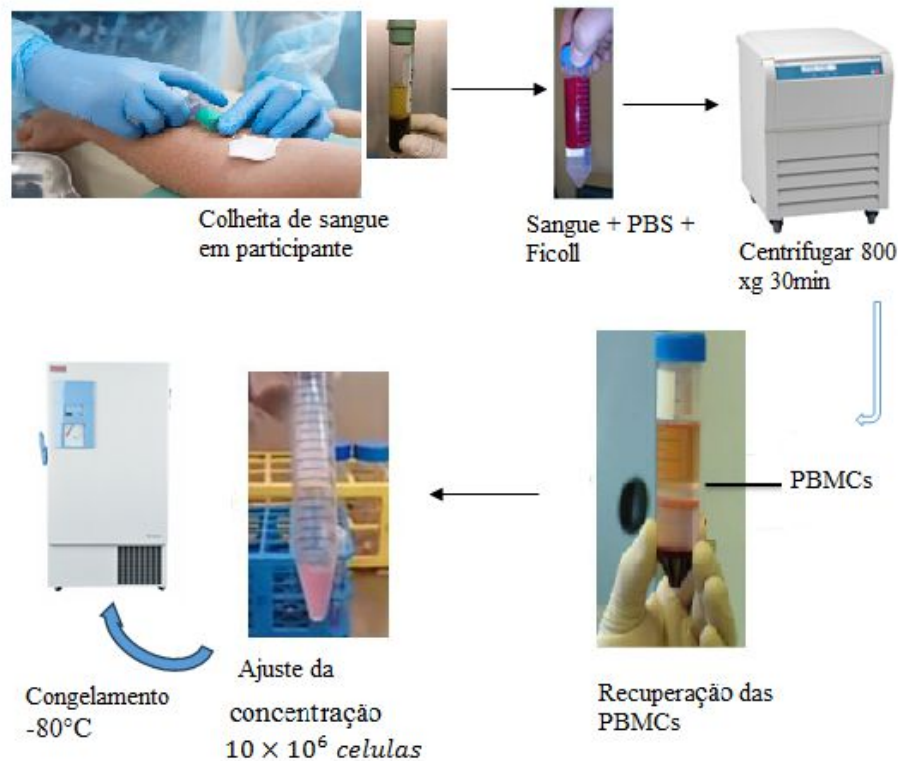
Os extratos liofilizados das folhas de *Terminalia sericea* foram preparados no Centro de Investigação e Desenvolvimento em Etnobotânica (CIDE), onde as plantas foram colhidas no distrito de Matutuine. Após a recepção dos extratos, eles foram diluídos em DMSO a uma concentração de 0,5% (100mg → 1ml), em seguida, divididos em alíquotas de 300 µl já codificadas com nome da planta, concentração, parte da planta e data de preparação. Essas alíquotas foram armazenadas a uma temperatura de -80°C no CISPOC até o momento de sua utilização.

### 3.6 Considerações éticas, colecta de sangue e isolamento das células PBMC

Para a presente pesquisa, utilizou-se uma linhagem de Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano (PBMCs). Esta pesquisa foi realizada de acordo com a aprovação do comité de Bioética com o número de referência 84/CNBS/22 para estudos de citotoxicidade desenvolvidos no Laboratório de Centro de Investigação e Treino em Saúde da Polana Caniço (CISPOC) onde o ensaio foi realizado.

A colecta de sangue periférico foi realizada por profissionais capacitados, utilizando-se seringas esterilizadas e descartáveis. Para tanto, o sangue foi colhido em um voluntário saudável Anexo IV e V, sem histórico de doença crônica ou doença autoimune em tubos de heparina (Vacuette) e as células monoclonais foram obtidas seguindo a técnica de gradiente de concentração (Ficoll-Paque) conforme descrito por Bicalho e colaboradores (1981 apud ESPÍNDOLA, 2016).

As células PBMC foram isoladas a partir de uma amostra de 20mL de sangue heparinizado acrescida de 20 mL de PBS (GIBCO). Essa mistura foi colocada em um tubo de Leucosep (Fig.10) com 10mL de Ficoll-Paque (CYTIVA) e submetida à centrifugação 800xg por 30 minutos à 25 °C. Em seguida, a região intermediária entre hemácias e o soro, correspondente ao anel de células PBMC foi aspirada e adicionada a um terceiro tubo (falcon de 15mL) e teve seu volume completado com PBS para duas sessões de lavagens a 400xg por 10 min cada. Após as lavagens o sobrenadante foi descartado e o *pallet* de PBMC foi ressuspensionado em 5ml de PBS e posterior contagem no Sysmex. Posteriormente a contagem, o volume de PBS foi completado para mais uma sessão de centrifugação a 400xg por 10min, o sobrenadante foi descartado e o *pallet* foi suspenso em CPS (FBS+DMSO) ajustando-se o volume final volume de  $10 \times 10^6$  células em 1mL, as quais foram armazenadas no -80°C e posteriormente no nitrogénio líquido.



**Figura 10:** Esquema resumido do isolamento de células PBMC's.

Fonte: Autora,2023.

### 3.7 Determinação da citotoxicidade *in vitro* da *Terminalia sericea* pela microscopia e citometria de fluxo

#### 3.7.1 Cultura de células

A linhagem PBMC foi descongelada e cultivada em meio RPMI 1640 (BIOCONCEPT) suplementada com 10% de FBS (GIBCO) a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . As células ( $670 \mu\text{l/poço}$ ) foram semeados em triplicata nos eppendorf a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço e incubadas num período de 24 horas.

#### 3.7.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade da *Terminalia sericea* foi avaliada em PBMCs *in vitro* usando como colorímetro o Trypan Blue Stain para microscopia e Fixable Viability Stain (FVS) para citometria de fluxo, (POTESTA et. Al.,2019). O Fixable Viability Stain é um marcador reactivo a amina usado para discriminar células viáveis de não-viáveis de mamíferos usando como base a intensidade da fluorescência. O reagente liga-se covalentemente a superfície celular e aminas intracelulares resultando numa coloração fraca para

membranas não permeáveis (células viáveis) e uma coloração intensa para membranas permeáveis (células inviáveis). E o Trypan Blue Stain é um corante azul de exclusão usado para colorir seletivamente células viáveis de não-viáveis de mamíferos com base no comprimento de onda do feixe de luz. O reagente não é absorvida por células viáveis, mas que cora as células com uma membrana celular danificada, células não viáveis









### *O procedimento*

#### **Dia 0**

1. Removeu-se o vial de células do nitrogênio líquido e limpá-lo com álcool 70% e levou-se rapidamente para o congelador de -80 °C por 30 minutos;
2. Ligou-se o Banho-Maria, adicionou-se a água destilada limpa e definiu-se 37°C, assim que atingiu 37°C iniciou-se o trabalho;
3. Pipetou-se 10 ml de R20 (RPMI, suplementado 20% FBS) num falcon de 15ml com uma pipeta serológica estéril;
4. Levou-se os falcon de R20 (ponto 3) e colocou-se no banho-maria a 37 °C para estabilização do pH por, 10 minutos
5. Removeu-se o vial do congelador levou-se ao banho-maria a 37 °C e submergiu-se com cuidado com ajuda de pinça, esperou-se até que o conteúdo descongele sem ultrapassar 2 minutos. Fez-se apenas um criovial de cada vez;
6. Limpou-se o vial com álcool 70% e com uma pipeta de pasteur estéril, transferiu-se 0,5 ml do R20 pré-aquecido do falcon de 15 mL para a amostra no criovial descongelado, vagarosamente e por gotejamento;
7. Misturou-se o conteúdo pipetando lentamente para cima / para baixo 3 a 5 vezes com a pipeta de pasteur, transferiu-se toda a suspensão celular para o falcom o restante R20 pré – aquecido;
8. Homogeneizou-se delicadamente para a distribuição uniforme das células e levou-se a centrifugação a 400 xg 10 min;
9. Decantou-se o sobrenadante, soltou-se as células com leves batidas nas laterais do falcon e ressuspendeu-se o pallet com 10 ml de R10 (RPMI, suplementado 10% FBS);
10. Levou-se o falcon novamente para a centrifugação a 400 xg 10min;

11. Decantou-se o sobrenadante e soltou-se as células com leves batidas nas laterais do frasco, ressuspendeu-se o pallet com 4ml de R10 (RPMI, suplementado 10% FBS);
12. Usando uma pipeta transferiu-se 200 µl da mistura de células e levou-se ao sysmex (XN-550) para a contagem;
13. Calculou-se o número de células presentes multiplicando o valor da concentração obtida na contagem com o volume de ressuspensão;
14. Transferiu-se o conteúdo do falcon para a garrafa de cultivo já codificado (nº de células, participante, volume e data);
15. Acrescentou-se 25ml de R10 (RPMI, suplementado 10% FBS) na garrafa de cultivo;
16. Incubou-se a garrafa de cultivo a 37 ° C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para permitir que as células se liguem à garrafa, e sem fechar totalmente a tampa da garrafa de cultivo para permitir a recepção CO<sub>2</sub>.

### **Dia 1**

-  Retirou-se a garrafa de cultivo da incubadora e homogeneizou-se delicadamente a cultura para distribuir uniformemente as células;
-  Transferiu-se 200 µl para o tubo ensaio e levou-se ao sysmex para a contagem confirmatória;
-  Calculou-se a quantidade estimada de células presentes, multiplicando o valor da concentração de células obtida pelo volume total presente na cultura;
-  Calculou-se o número total de células necessárias para os 36 poços (nº total de células necessárias = 500 mil/poço × 36 poços);
-  Subtraiu-se o valor do número total de células presente pelo número total de células necessárias para o experimento e retirou-se o excesso;
-  Dividiu-se o volume da ressuspensão restante pelo número de poço necessário para o experimento (36), multiplicou-se o valor obtido por 1000, para a conversão do volume em µl ;
-  Rotulou-se 10 eppendorfs em triplicado com as seguintes concentrações:
-  1000 µl, 500 µl, 250 µl, 125 µl, 62.5 µl, 31.25 µl, 15.625 µl, 7.8125 µl, 3.91 µl, 1.95 µl;

- ✚ Rotulou-se também 1 eppendorf para controlos, (Unstimulated) em triplicado e 1 eppendorf para Unstain em triplicata;
- ✚ Distribuiu-se  $5 \times 10^5$  células para cada um dos eppendorfs;
- ✚ Centrifugou-se as amostras a 600 xg por 5 minutos;
- ✚ Retirou-se sobrenadante e soltou-se as células com leves batidas nas laterais dos eppendorfs;
- ✚ Para inserção dos extratos pegou-se um vial da solução stock preparado pela dissolução de 100mg do extrato a 1ml de DMSO (100mg/mL) e filtrado usando um filtro com 45  $\mu$ l diâmetro;
- ✚ Rotulou-se 9 eppendorfs de S1-S9 e adicionou-se 100  $\mu$ L de DMSO nos 9 viais eppendorf para preparação de diluições seriadas do extrato stock de *Terminalia sericea* (S0).
- ✚ Transferiu-se 100  $\mu$ L do extrato S0 para o primeiro Eppendorf S1, homogeneizou-se e depois descartou-se a pontas. Transferiu-se 100  $\mu$ l da S1 para o próximo eppendorf e assim sucessivamente até S9 obtendo assim 10 concentrações diferentes;
- ✚ Rotulou-se igualmente 10 eppendorfs cada um deles em triplicado com as concentrações: 1000  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 125  $\mu$ l, 62.5  $\mu$ l, 31.25  $\mu$ l, 15.625  $\mu$ l, 7.8125  $\mu$ l, 3.91  $\mu$ l, 1.95  $\mu$ l;
- ✚ Preparou-se 14 ml de R10 (RPMI, 10% FCS) e alicotou-se 297  $\mu$ l de em cada eppendorfs codificados no ponto anterior;
- ✚ Pipetou-se 3  $\mu$ l de cada uma das concentrações (S0-S10) para 297  $\mu$ l de R10 (RPMI, 10% FBS) em cada um dos eppendorfs e vortexou-se;
- ✚ Da solução resultante (no ponto 18), alicotou-se 200  $\mu$ l a cada eppendorf já contendo células (ponto 12);
- ✚ Para os eppendorfs de Controlo o Unstimulated e Unstain adicionou-se apenas 200  $\mu$ l de R10;
- ✚ Incubou-se os tubos por 24 h a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub>, sem fechar totalmente as tampas dos eppendorfs para permitir a entrada de CO<sub>2</sub>.

### 3.7.3 Mensuração da citotoxicidade por Microscopia

A mensuração de células por microscopia foi feita usando a câmara de Neubauer (HAUSSER SCIENTIFIC. HORSHAM, PA 19044) e microscópio óptico (OLYMPUS CX23) com ampliação de 40X. A exclusão do azul de tripano foi usado para a viabilidade. Assim, 50  $\mu$ l da amostra foram misturados com 50  $\mu$ l de azul de tripano a

0,4% pipetando suavemente e, em seguida 10 µl da mistura foram carregadas para uma das câmaras do hemocítmetro e fez-se a contagem de acordo a concentração e réplica (Anexo I).

### ***Procedimento***

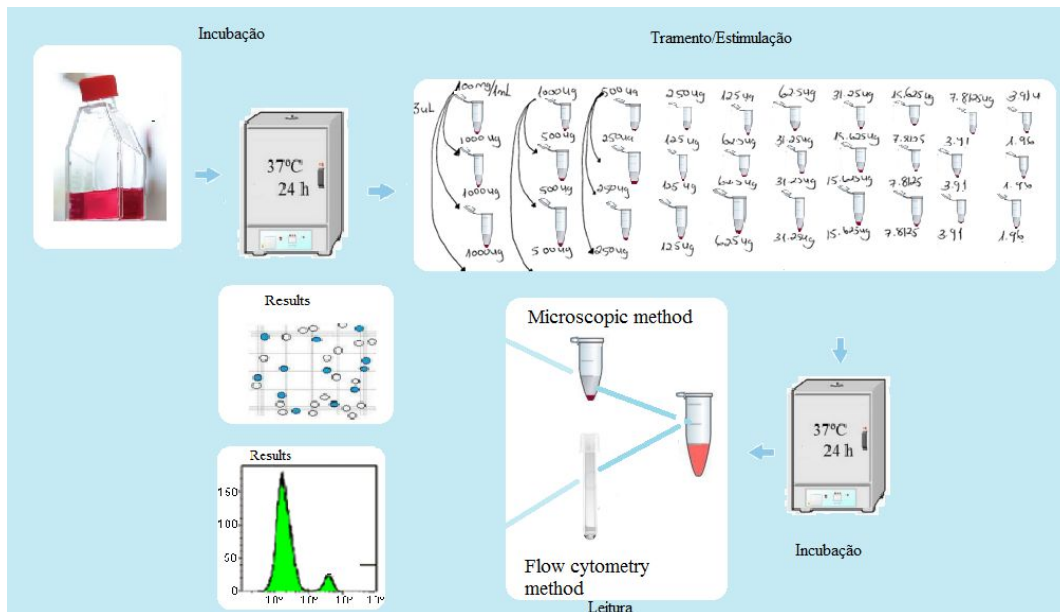
- ✚ Retirou-se as amostras da Incubadora e alíquotou-se 100 µl de cada concentração nos tubos de FACS Counter respectivamente já codificadas, da concentração máxima de 1000 µg/ml – 1,95 µg/ml;
- ✚ O volume restante nos eppendorfs foi utilizada para a leitura no microscópio;
- ✚ Limpou-se o hemocítmetro e a lamínula de vidro com EtOH 70%;
- ✚ Colocou-se a lamínula de vidro sobre as câmaras de contagem;
- ✚ Vortexou-se a suspensão de células de cada amostra e misturou-se na proporção de 1:1 com 0,4% de azul de tripano (50µl: 50µl) em um novo eppendorf;
- ✚ Carregou-se 10 µl da mistura resultante e pipetou-se na borda inferior da lâmela lentamente para a câmara inferior hemocítmetro até ser preenchida;
- ✚ Aguardou-se 30 segundos para que as células se assentem;
- ✚ Colocou-se o hemocítmetro sob um microscópio, usando uma objetiva de 10x explorou-se o campo até que as células e as linhas dos 4 quadrantes foram claramente visíveis;
- ✚ Passou-se então para a objectiva com maior ampliação 40X e explorou-se até que visualizou-se um dos quadrantes;
- ✚ Concentrando-se no padrão de grade e nas partículas celulares e contou-se o número total de células encontradas em 4 grandes quadrantes dos cantos. As células que setavam tocando os 4 lados do perímetro de um quadrado de canto, foram contadas apenas as células em 2 lados externos para todos os quadrantes;
- ✚ Com auxílio do contador manual, contou-se as células vivas (sem azul de tripano) e células mortas (com azul de tripano);
- ✚ Limpou-se o hemocítmetro e uma lâmela novamente com etanol 70% para a contagem até o final e colocou-se o hemocítmetro limpo no armário no final da actividade.

### 3.7.4 Mensuração da Citotoxicidade por Citometria de fluxo

A contagem de citometria de fluxo foi feita usando o citômetro (BD FACS Canto II) e o corante FVS foi usado para a viabilidade. Dos 100  $\mu\text{l}$  da amostra de cada réplica, foram feitas duas lavagens com 200  $\mu\text{l}$  PBS apos a marcação. As células foram ressuspensas em PBS e os eventos foram contados para cada a amostra na velocidade media. A avaliação do número de células foi obtida por meio de áreas de gating no gráfico de pontos FS vs log SS, visualizando assim a população de células vivas e mortas.

#### *Procedimento*

- ✚ Rotulou-se 10 tubos de Facs Counter em triplicado com as concentrações: 1000  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{l}$ , 125  $\mu\text{l}$ , 62.5  $\mu\text{l}$ , 31.25  $\mu\text{l}$ , 15.625  $\mu\text{l}$ , 7.8125  $\mu\text{l}$ , 3.91  $\mu\text{l}$ , 1.95  $\mu\text{l}$ ;
- ✚ Retirou-se as amostras da Incubadora e alíquotou-se 100  $\mu\text{l}$  de cada concentração nos tubos de Facs Counter respectivamente;
- ✚ Centrifugou-se as alíquotas dos tubos de Facs Counter a 600 xg por 5 minutos;
- ✚ Decantou-se e retirouse todo o excesso em papel toalha, soltou-se as células do tubo com a raspagem;
- ✚ Preparou-se o FVS, adicionando 2  $\mu\text{l}$  de FVS a 2 ml de PBS;
- ✚ Marcou-se as células de todas as concentrações incluindo o Unstimulated com FVS adicionando 50  $\mu\text{l}$  de FVS/poço excepto o Unstain;
- ✚ Incubou-se as amostras por 30 min na geleira de 2-8° C;
- ✚ Passados 30 minutos retirou-se os tubos da geleira e adicionou-se 1000  $\mu\text{l}$  de solução de lavagem (PBS);
- ✚ Centrifugou-se as amostras a 600 xg por 5 minutos;
- ✚ Retirou-se da centrífuga, decantou-se e soltou-se as células.
- ✚ Repetiu-se a lavagem 1000  $\mu\text{l}$  de (PBS), a 600 xg por 5 minutos e retirouse todo o excesso em papel toalha, soltou-se as células do tubo com a raspagem;
- ✚ Adicionou-se 200  $\mu\text{l}$  de PBS e fez-se a aquisição (leitura) das células no cirtómetro de fluxo, a uma velocidade media e tempo medio 5min de leitura por cada tubo de Facs Counter.



**Figura 11:** Esquema resumido do ensaio de citotoxicidade

**Fonte:** Autora,2023.

### 3.8 Análise Estatística

Os dados obtidos na microscopia de viabilidade e inviabilidade celular foram submetidos no Microsoft Excel, calculou-se o factor de diluição e do hematocítmetro e posteriormente expressos em percentagens, considerando o grupo de controlo. E os dados obtidos na citometria foram exportados para o FLOW JO, onde houve a subsequente separação das duas populações de células viáveis e não viáveis. Igualmente, os dados foram transferidos para o Microsoft Excel e expressa em percentagens considerando igualmente o grupo controlo.

Para verificar a normalidade na distribuição dos dados, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Após a confirmação da não normalidade na distribuição dos dados, foi realizado um teste de regressão logística em relação ao efeito citotóxico em resposta às diferentes concentrações de *Terminalia sericea*. Em seguida, utilizou-se a correlação de Spearman para verificar a relação entre os dois métodos usados na medição da citotoxicidade de *Terminalia sericea*. Por fim, para avaliar a concordância entre os dois métodos, empregou-se o teste de Bland-Altman. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 9.5.1, com excepção do teste de normalidade, que foi conduzido na IBM SPSS Statistics 20. Em todos os cálculos, um intervalo de confiança de 95% foi estabelecido.

## 4 Resultados

Neste capítulo estão apresentados resultados obtidos na determinação de citotoxicidade de *Terminalia sericea* por microscopia e citometria de fluxo, conseqüente comparação desses dois métodos de mensuração.

### 4.1 Análise da Normalidade

No presente estudo, foi realizado um ensaio de citotoxicidade de *Terminalia sericea* em 10 concentrações e cada concentração testada em triplicata. Para verificar a normalidade dos dados da citotoxicidade de *Terminalia sericea*, empregou-se o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que para a citotoxicidade mensurada por citometria, houve diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,013$ ), e para a microscopia, também foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,014$ ). Portanto, os dados não apresentaram uma distribuição normal, como evidenciado na tabela (2).

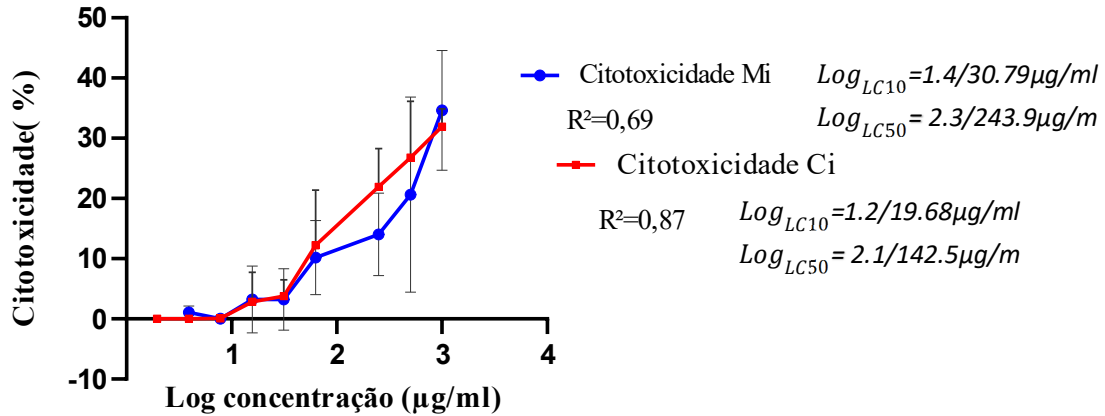
**Tabela 2:** Análise da normalidade dos dados da citotoxicidade de *Terminalia sericea*

Técnicas de mensuração	Nº de dados de Citotoxicidade	p- value
Citometria	33	0,013,
Microscopia	33	0,014

### 4.2 Determinação da citotoxicidade por microscopia e por citometria

O ensaio de citotoxicidade foi conduzido na linhagem de células PBMC, utilizando extratos de folha de *Terminalia sericea*, e os resultados foram mensurados por meio de microscopia e citometria sendo esse expresso percentualmente em relação à concentração do extrato.

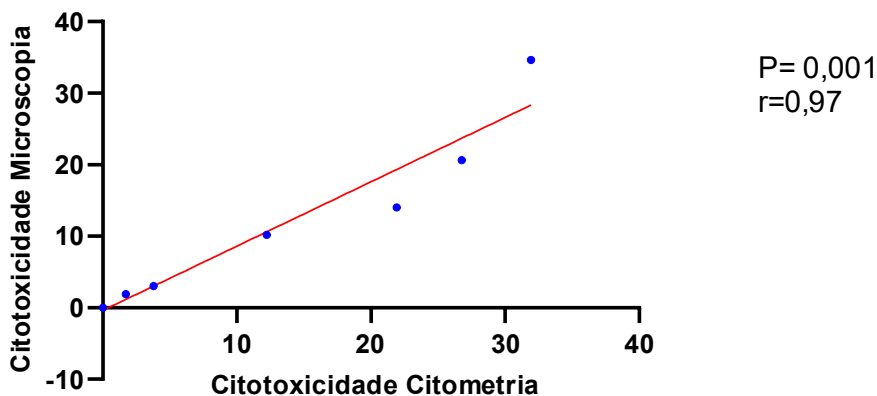
O teste de regressão logística revelou um baixo potencial citotóxico, como demonstrado na Figura 12. Olhando para as duas curvas da figura abaixo, é possível ver que o LC50 é de 2,3 (243,9  $\mu\text{g/ml}$ ) para a microscopia e 2,1 (142,5  $\mu\text{g/ml}$ ) para a citometria, dentro de uma concentração máxima de 3 (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) para ambos os métodos. Igualmente é possível ver que o efeito citotóxico varia conforme o aumento da concentração, o que significa que o efeito citotóxico possa ser condicionada pela concentração do extrato em ambas as curvas. Contudo, na citometria (curva vermelha) verificou-se mais o efeito do extrato sobre as células com  $R^2 = 0,87$  em relação a microscopia (curva azul) com  $R^2 = 0,69$ .



**Figura 112:** Efeito citotóxico do extrato das folhas de *Terminalia sericea* em PBMCs mensurada por microscopia e Citometria. A linha celular PBMC foi tratada em diferentes concentrações de *Terminalia sericea* (1.95, 3.91, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500,1000 µg/ml) por 24 horas. **Fonte:** Autora,2023.

#### 4.3 Análise da correlação dos resultados entre os métodos microscopia e citometria de fluxo

O coeficiente de Spearman foi utilizado para verificar se as duas técnicas em estudo (microscopia e citometria) estão linearmente relacionados. Como pode-se observar na figura abaixo (13), análise apontou um coeficiente de correlação estatisticamente significativo, ( $p = 0,001$ ), com intervalo de confiança de 95%. Tomando-se a atenção para o valor do coeficiente de correlação ( $r = 0,97$ ) é visível que existe nessa análise uma relação positiva entre ambas as técnicas citometria e microscopia.



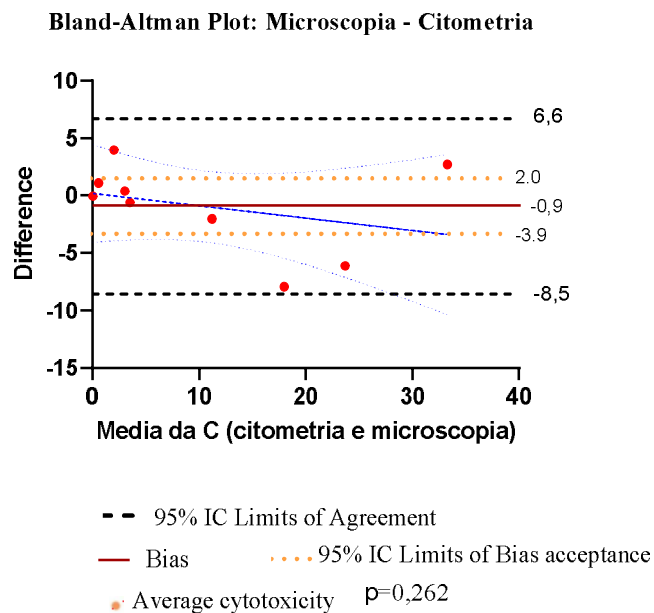
**Figura 13:** Gráfico de correlação da citotoxicidade do extrato de folhas de *Terminalia sericea* mensurada por citometria de fluxo (eixo Y) versus citotoxicidade do extrato de folhas de *Terminalia sericea* mensurada por microscopia (eixo X) com IC de 95% . **Fonte:** Autora,2023.

#### 4.4 Comparação entre citotoxicidade mensurada por microscopia e citometria de fluxo

Avaliou-se a existência de concordância entre as duas técnicas de determinação de citotoxicidade: Microscopia e Citometria, em relação a 33 amostras tratadas com *Terminalia sericea* em 10 concentrações diferentes seguindo a norma ISO 20391-2:2019 para contagem de células, parte 2: Experimental Design and Statistical Analysis to Quantify Counting Method Performance.

Assim a análise de Bland-Altman não indicou diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,262$ ) como demonstrado na figura abaixo (14). Este gráfico representa as diferenças (Microscopia - Citometria) em relação às médias da citotoxicidade de *Terminalia sericea*, com limites de concordância de -8,5 a 6,6 dentro de um intervalo de confiança de 95% , onde cada ponto no gráfico representa um par de medições de citotoxicidade de *T. sericea*, determinadas pelos métodos de microscopia e citometria.

Pode observar-se ainda que os limites de aceitação variam de -3,9 a 2,0 com um viés de -0,9.



**Figura 14:** Gráfico de Bland-Altman comparando a citotoxicidade medida por microscopia e citometria . **Fonte:** Autora,2023.

## 5 Discussão dos resultados

### 5.1 Análise da Normalidade

Em relação à análise inicial realizada para verificar a normalidade dos dados, o teste de Shapiro-Wilk apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,013$ ) para a citometria e ( $p = 0,014$ ) para a microscopia. Esse resultado pode ser atribuído ao facto de que o presente estudo avaliou a citotoxicidade de *Terminalia sericea* em diferentes concentrações impactando directamente na obtenção de dados com distribuição anormal e influenciando na escolha dos testes estatísticos pelo que NORMANDO et.al.,(2010) afirma que testes usados para dados com distribuição anormal são conhecidos como testes não-paramétricas como o caso da regressão logística, o coeficiente de Spearman.

### 5.2 Determinação da citotoxicidade por microscopia e por citometria

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade realizada na linhagem PBMC com extratos de folha de *Terminalia sericea* pela microscopia e citometria apresentaram baixo potencial citotóxico conforme o LC50 de 2,3 (243,9  $\mu\text{g/ml}$ ) para a microscopia e de 2,1 (142,5  $\mu\text{g/ml}$ ) para a citometria, dentro de uma concentração máxima de 3 (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) para ambas as técnicas. Esses resultados sugerem que as folhas da planta *Terminalia sericea* são menos tóxicos às células PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells), após um período de exposição de 24 horas para ambas às técnicas de mensuração. De acordo com os critérios estabelecidos por MEYER et al. (1982), a LC50 obtida indica que o extrato é "não tóxico", já que  $\text{LC50} > 30 \mu\text{g/ml}$ , demonstrando assim segurança em concentrações baixas.

Esses achados estão em consonância com estudos anteriores que investigaram outras espécies do gênero *Terminalia* destacando o DHARMARATNE et al. (2018) relataram resultados similares ao testar extratos de frutos de *Terminalia bellirica*, enquanto BESERRA et al. (2018) observaram resultados comparáveis ao avaliar extratos de folhas de *Terminalia argentea*.

Em relação ao efeito citotóxico de *Terminalia sericea* na linhagem PBMC foi observado que a percentagem de citotoxicidade das PBMCs tende a aumentar com o aumento da concentração do extrato de *Terminalia sericea* para ambas as curvas. Isso sugere que quanto maior a concentração do extrato, maior a citotoxicidade sobre as PBMCs, conseqüentemente a menor viabilidade. Esse resultado é de se esperar, pois as concentrações mais baixas do extrato podem conter uma quantidade menor de

fitoquímicos citotóxicos e, portanto, não prejudicam significativamente as células, contudo, concentrações altas de extratos de plantas pode conter uma quantidade maior de fitoquímicos citotóxicos, (HAMID et al., 2022).

O baixo efeito citotóxico verificado na microscopia  $R^2 = 0,69$  deve-se a várias razões a destacar, contagem de poucas células e distribuição desigual de células na amostra ou nas câmaras do hemacitômetro (erro de amostragem), Rubeai et al., (1997).

### **5.3 Análise da correlação dos resultados entre os métodos microscopia e citometria de fluxo**

No que diz respeito a correlação diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,001$ ) foram observadas em relação a análise do coeficiente de correlação entre as duas técnicas, num intervalo de confiança de 95%.

Portanto, a citotoxicidade de *Terminalia sericea* mensurada por microscopia e citometria de fluxo está correlacionada o que significa que as medições de citotoxicidade obtidas por essas duas técnicas tende a aumentar juntas ou diminuir juntas, se obtive-se uma medição alta de citotoxicidade usando a técnica de microscopia, igualmente obter-se-ia uma medição alta usando a técnica de citometria de fluxo, e vice-versa. No entanto, tomando em consideração o que BLAND & ALTMAN (1986) referem, provavelmente se tenha a resposta que justifique a correlação, pelo que eles salientam que é muito improvável duas técnicas diferentes concebidas para medir o mesmo parâmetro na mesma amostra não estivessem relacionados.

É importante destacar o coeficiente de correlação ( $r = 0,97$ ) estando próximo de 1, sugere-se uma relação positiva forte entre as variáveis analisadas como é possível observar que quanto maior for a citotoxicidade mensurada pela técnica padrão de ouro (citometria) no eixo X, maior também é a citotoxicidade mensurada pela microscopia no eixo Y. Isso sugere que ambas as técnicas microscopia e citometria estão medindo a mesma citotoxicidade de *Terminalia sericea* de maneira consistente. Portanto, tendo acesso apenas à microscopia, mas não à citometria de fluxo (vice-versa), pode-se confiar nas medições de citotoxicidade sabendo-se claramente que obter-se-ia resultados semelhantes na outra técnica.

Essa descoberta é consistente com estudos prévios realizados por COLLINS et al. (2010) em Califórnia na sua comparação entre citometria de fluxo e a técnica de contagem manual, esse autor observou que a correlação linear entre ambas as técnicas era de 0,86.

Em outro estudo realizado por KIM et al., (2011) em Coreia na sua comparação de testes de viabilidade por microscópica de fluorescência com microscopia óptica e citometria de fluxo sobre a correlação, os mesmos apresentaram uma relação positiva forte, igualmente o estudo de SOARES (2021), em seu estudo de comparação de microscopia e citometria em Brasil, apontou que estimativa tradicional (microscopia) apresentou ótima correlação com a contagem automatizada (citometria).

#### **5.4 Comparação entre citotoxicidade mensurada por microscopia e citometria de fluxo**

Quanto a concordância entre as técnicas de microscopia e citometria de fluxo na mensuração da citotoxicidade *in vitro* de *Terminalia sericea*. Todas as diferenças individuais caíram dentro dos limites de concordância, sugerindo que as duas técnicas estão em concordância. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os obtidos por COLLINS et al., (2010) e PATTI et al., (2016) na comparação de microscopia e citometria na mensuração da toxicidade pulmonar em roedores e apontou uma concordância extremamente boa, porém esse autor não olhou o viés da microscopia em relação a citometria embora houvesse concordância entre ambas.

Embora haja uma concordância entre as duas técnicas, é importante referir que observou-se que a tendência de dispersão das diferenças em função do par de medições de citotoxicidade de *T. sericea* é negativa. Isso sugere que a microscopia tende a subestimar a citotoxicidade em comparação com a técnica de citometria o que significa que à medida que a citotoxicidade aumenta, as medições de Microscopia tende a ser menores do que as medições de citometria, a isso, a distribuição desigual de células na amostra ou nas câmaras do hemacitômetro (erro de amostragem), pode estar a influenciar negativamente a performance da técnica, (Rubeai et al., 1997). No entanto, é importante destacar que essa tendência não alcançou significância estatística ( $p = 0,262$ ).

O viés de -0,9 ( $\Sigma$  das diferenças / n das medições) observado sugere que a citotoxicidade de *Terminalia sericea* medida por Microscopia é, em média, aproximadamente 0,9 unidade inferior à medida por Citometria nesta comparação. O

que significa que na medição de citotoxicidade usando microscopia, espera-se que a medição seja cerca de 0,9 unidade menor do que se tivesse usado a citometria. No entanto, é importante lembrar que, o intervalo de confiança de 95% para o viés inclui o zero (-3,9 a 2,0). Isso significa que a diferença pode ser tão baixo até -3,9 ou tão alta até 2,0 ou ate mesmo inexistente, ou seja, viés = 0, haverá ainda concordância entre ambas às técnicas. Contudo, como o intervalo de confiança do viés inclui zero, isso indica que a diferença observada entre os dois métodos não é estatisticamente significativa ( $p = 0,262$ ), ou seja, as variações nas medições de citotoxicidade entre essas técnicas podem se atribuídas à aleatoriedade.

De um modo geral, com base nos limites de concordância obtidos (-8,5 a 6,6) e o viés - 0,9 no intervalo de confiança de 95% ( $p= 0,262$ ) pode-se afirmar a técnica de microscopia pode ser utilizado para avaliar a citotoxicidade das plantas, uma vez que a diferença observada é tão pequena que não afetaria as decisões tomadas com base nessa avaliação.

O estudo de THOLUDUR et al., (2006) na comparação de microscopia e Vi-Cell a qual as duas técnicas apresentaram uma concordância e observaram um viés negativo na mensuração do método microscópico. Em contraste, estudo realizado por KUMMROW et al., (2013) de comparação microscopia e citometria incluindo outros métodos automáticos revelou que a microscopia apresentava uma boa concordância com todos os métodos automáticos incluindo citometria, porém um viés inverso ao observado nesse estudo e dos outros autores relatados acima, foi relatado, sendo esse positivo em relação à citometria e maioria dos outros métodos automáticos utilizados na comparação, ou seja, a microscopia tinha tendência de superestimar as células mensuradas esse resultado de viés positivo difere do observado nesse estudo.

## 6 Conclusão

Nesse estudo, de avaliação da citotoxicidade de *Terminalia sericea* em células PBMCs por microscopia foi concluído que o extrato de folha de *Terminalia sericea* mostrou baixo potencial citotóxico em células PBMC, com LC50 de 2,3 (243,9 µg/ml) para microscopia e 2,1 (142,5 µg/ml) para citometria, após a exposição por 24 horas, indicando segurança em concentrações baixas. Houve um efeito dose-dependente entre a concentração do extrato e a citotoxicidade observada nas células PBMCs, sugerindo que concentrações mais altas podem resultar em maior citotoxicidade, como esperado.

Em relação à análise de correlação dos resultados entre as técnicas de mensuração da citotoxicidade, citometria e microscopia mostrou uma correlação significativa, sendo esta positiva e forte, sugerindo que ambas as técnicas medem a citotoxicidade de maneira consistente. Foi observado ainda que a microscopia tende a subestimar a citotoxicidade, havendo-se verificado que o extrato de *Terminalia sericea* teve um efeito de 69% sobre as células em relação às 87% verificados na citometria de fluxo.

Embora a microscopia tenda a subestimar a citotoxicidade em comparação com a citometria, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,262$ ) dentro dos limites de aceitação de -3,9 a 2,0.

Por outro lado, apesar das diferenças observadas entre microscopia e citometria, os resultados estão dentro dos limites de concordância de -8,5 a 6,6 e indicando que a microscopia pode ser usada de forma para avaliar a citotoxicidade das plantas.

## 7 Limitações

- ✓ A comparação entre os métodos de microscopia e citometria foi feita apenas com uma corrida de citotoxicidade, por questões do tempo e material podendo ser difícil avaliar a robustez dos dados;
- ✓ Não foi possível atingir a mortalidade de 100% de células PBMCs com a concentração máxima de 1000 µg/ml, podendo ser difícil afirmar até que ponto vai a citotoxicidade de *Terminalia sericea* sobre essas células.

## 8 Recomendações

Recomenda-se:

- ✓ AO CISPOC a realização de um estudo mais abrangente, que inclua experimentos adicionais de citotoxicidade para garantir a representatividade dos dados;
- ✓ À FCNM a melhorias de condições do laboratório de pesquisa para garantir a implementação de ensaios de citotoxicidade de plantas medicinais utilizando microscopia;
- ✓ Ao pesquisadores prosseguirem com esse trabalho de avaliação da citotoxicidade de *Terminalia sericea* em células PBMCs com concentrações adicionais até que se ache o LC100.

## 9 Referências Bibliográficas

1. ABRAHAM, IDAGU GODWIN, and MUBARAK HUSSAINI AHMAD. “Preliminary Sub-Acute Toxicological Assessment of Methanol Leaves Extract of *Culcasia Angolensis* (Araceae) in Wistar Rats.” *Bulletin of the National Research Centre* 45 (1): 226, 2021. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00686-9>.
2. ADAN. A, KIRAZ. Y, and BARAN.Y, “Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays.” *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17 (14), 2016. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
3. ALFONSO, B.-F., and M. AL-RUBEAI. “Flow Cytometry.” In *Comprehensive Biotechnology*, 559–78. Elsevier, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00065-9>.
4. AL-RUBEAI, M., K. WELZENBACH, D. R. LLOYD, and A. N. EMERY. “A Rapid Method for Evaluation of Cell Number and Viability by Flow Cytometry.” *Cytotechnology* 24 (2): 161–68. 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1007910920355>.
5. ASBC, TECHNICAL COMMITTEE. “Microscopic Yeast Cell Counting.” In *ASBC Methods of Analysis*, 14th ed. American Society of Brewing Chemists, 2011. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Yeast-4>.
6. BARBOSA, ÂNGELA MONICK RAMOS, ADÃO ALVES DE MEDEIROS, VALDELINE ATANÁZIO DA SILVA, and PLÍNIO PEREIRA GOMES JÚNIOR. “Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como medicinais por parteiras no município de Serra Talhada – PE.” *Research, Society and Development* 11 (13): e176111334720, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i13.34720>.
7. BATISTA, ANA LÚCIA. “Avaliação Da Atividade Antimicrobiana E Antiradicalar Dos Extratos E Substâncias Dos Frutos De *Buchenavia Tomentosa* – Eichler (Combretaceae) E *Ouratea Spectabilis* Aubl. (Ochnaceae).” Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2011.
8. BESERRA, ANGELA .M, WAGNER .V, MARCELO .M, SÉRGIO .D, ILSAMAR .M, EDUARDA .P, AMILCAR .S, REGINALDO .V, and DOMINGOS .T. “Chemical Characterisation and Toxicity Assessment in Vitro and in Vivo of the Hydroethanolic Extract of *Terminalia Argentea* Mart. Leaves.” *Journal of Ethnopharmacology* 227 (December): 56–68, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.025>.
9. BIOTECHNOLOGY. “Cell Counting – Part 1: General Guidance on Cell Counting Methods. In: Standardization,” 2018.

10. BIOTECHNOLOGY. “*Cell Counting – Part 2: Experimental Design and Statistical Analysis to Quantify Counting Method Performance. In: Standardization.*” IOF, 2019
11. BLAND, J MARTIN, and DOUGLAS G ALTMAN. “*Statistical Methods For Assessing Agreement Between Two Methods Of Clinical Measurement,*” 1986.
12. BRAGA, KARLA. M, VANESSA. D, FERNANDA ALMEIDA RODRIGUES, THAIS POLTRONIERI DOS SANTOS, and EUGÊNIO GONÇALVES DE ARAÚJO. “*Citometria De Fluxo: Histórico, Princípios Básicos E Aplicações Em Pesquisa.*” *Enciclopédia Biosfera* 13 (23): 304– 19, 2016. [https://doi.org/10.18677/Enciclopedia\\_Biosfera\\_2016\\_027](https://doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2016_027).
13. BERGAMASCHI, K. B. *Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento.* Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura —Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
14. CADENA-HERRERA, DANIELA, JOSHUA E. E, NANCY D. RAMÍREZ-IBAÑEZ, CARLOS A., NÉSTOR O, LUIS F. FLORES-ORTIZ, AND EMILIO MEDINA-RIVERO. “*Validation of Three Viable-Cell Counting Methods: Manual, Semi-Automated, and Automated.*” 2015. *Biotechnology Reports* 7 (September): 9–16, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.04.004>.
15. CAMACHO-FERNÁNDEZ, CAROLINA, DAVID HERVÁS, ALBA RIVAS-SENDRA, M<sup>A</sup> PILAR MARÍN, and JOSE M. SEGUÍ-SIMARRO. “*Comparison of Six Different Methods to Calculate Cell Densities.*” *Plant Methods* 14 (1): 30, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0297-4>.
16. CARVALHO, AMANDA TORRENTES DE, GRAZIELLE ALVES RIBEIRO, and RAQUEL FERRAZ NOGUEIRA. “*Citometria de Fluxo no estudo das doenças infecto-parasitária.*” Instituto Oswaldo Cruz,2010.
17. CHIBAMO, RAFAEL. E, and HINERVO CHICO MARQUEZA. “*Análise da Coprodução dos Serviços Públicos Locais na Efectividade da Recolha e Transporte de Resíduos Sólidos no Distrito Municipal KaMaxakeni (2015 – 2019)*” 2021.
18. CORDÃO, M.A. et al. *Taninos e seus efeitos na alimentação animal: Revisão bibliográfica.* PUBVET, Londrina, V. 4, Ed. 137, Art. 925, 2010;
19. COLLINS, CHRISTINE, NICOLE .Y, DAVID. F, DAVID. A, and JON. K. 2010. “*A Rapid and Reliable Method of Counting Neurons and Other Cells in Brain*

- Tissue: A Comparison of Flow Cytometry and Manual Counting Methods*” 4.  
<https://doi.org/10.3389%2Fneuro.05.005.2010>.
20. DHARMARATNE, M. PRIYANGA. J, AMIRTHASINGAM .M, VASANTHI. T, ASELA. E, NIMAL. S, VERANJA. L, ERANGA ABEYRATNE, and B. M. RATNAYAKE BANDARA. “*Terminalia Bellirica Fruit Extracts: In-Vitro Antibacterial Activity against Selected Multidrug-Resistant Bacteria, Radical Scavenging Activity and Cytotoxicity Study on BHK-21 Cells.*” *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18 (1): 325, 2018.  
<https://doi.org/10.1186/s12906-018-2382-7>.
  21. DUARTE, JADY ALVES. “*Caracterização Lectínica E Avaliação Do Potencial Antimicrobiano De Frações Proteicas Das Folhas De Combretum Leprosum Mart.*” Mossoró: Universidade Federal Rural Do Semi-Árido, 2021.
  22. ESPÍNDOLA, MARIANA RODRIGUES. “*Comparação de métodos utilizados para ensaios de citotoxicidade in vitro na avaliação de compostos com atividade antiplasmodial.*” Divinópolis: Universidade Federal De São João Del-Rei – Ufsj Campus Centro-Oeste Dona Lindu – Cco Programa De Pós-Graduação Em Ciências Da Saúde, 2016.
  23. FONTELLES, Mauro José. 2012. *Bioestatística Aplicada à Pesquisa Experimental*. 1st ed. Vol. 1. Sao Paulo: Livraria da Física.
  24. GREEN, RALPH, and SEBASTIAN WACHSMANN-HOGIU. “*Development, History, and Future of Automated Cell Counters.*” *Clinics in Laboratory Medicine* 35 (1): 1–10, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.11.003>.
  25. HAÏDARA, MAHAMANE, ADAMA .D, MARIE H .T, MADANI LY, BAKAROU .K, ABDOULAYE .D, and ROKIA .S. “*Etude pharmacognosique de trois Combretaceae, utilisées en médecine traditionnelle dans la prise en charge de cancers au Mali*”, 2022.
  26. HAMID, K. M., YAKUBU, A., SANI, S. A., KALGO, M. U, ISIYAKU, A., UMAHI, N. P. F., GARBA, Y. B., ALIYU, M., ISAH, S. Y., and ABUBAKAR, U. “*Immunocytotoxic Effect of Aqueous Leaf Extract of Cassia Occidentalis on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Neutrophils.*” *UMYU Journal of Microbiology Research (UJMR)* 6 (2): 30–36, 2021.  
<https://doi.org/10.47430/ujmr.2162.005>.
  27. HAMID, KABIR .M, ADAMU .I, ABDULBASIT .O, DORCAS .M, ABUBAKAR .B, and MANSUR .A. “*In-Vitro Cytotoxic and Proliferative Activity of Three Plant*

- Extract on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).*” *Fountain Journal of Natural and Applied Sciences* 11 (2), 2022. <https://doi.org/10.53704/fujnas.v11i2.403>.
28. HUANG, YONGYANG, JORDAN .B, DMITRY .K, SUMONA .S, LAURA .T, DAVID .N, JEAN QIU, AND LEO L. “*Practical Application of Cell Counting Method Performance Evaluation and Comparison Derived from the ISO Cell Counting Standards Part 1 and 2.*” *Cell and Gene Therapy Insights* 7 (9): 937–60, 2021. <https://doi.org/10.18609/cgti.2021.126>.
  29. JUDITH, J, R. STEVEN, S. DAVID, CLARE, S. SUMONA, and S. GILBSON. 2018. “*FDA and NIST Collaboration on Standards Development Activities Supporting Innovation and Translation of Regenerative Medicine Products.*” <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146532491830478X>.
  30. Kale, O.E., O. AWODELE, and A.J. Akindele. “*Subacute and Subchronic Oral Toxicity Assessments of Acridocarpus Smeathmannii (DC.) Guill. & Perr. Root in Wistar Rats.*” *Toxicology Reports* 6: 161–75, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.01.005>.
  31. KAUSHIK, B, SHARMA. J, YADAV. K, KUMAR. P, and SHOURIE. A. “*Propriedades Fitoquímicas e Papel Farmacológico Das Plantas: Metabólitos Secundários*” 18: 13, 2021. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2894>.
  32. KIM, JANG SU, MYUNG .H, SEONG SOO A. AN, CHAE .S, DAE .S, CHANIL .C, and JUN .K. “*Comparison of the Automated Fluorescence Microscopic Viability Test with the Conventional and Flow Cytometry Methods.*” *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 25 (2): 90–94, 2011. <https://doi.org/10.1002/jcla.20438>.
  33. KUMMROW, A., M. FRANKOWSKI, N. BOCK, C. WERNER, T. DZIEKAN, AND J. NEUKAMMER. “*Quantitative Assessment of Cell Viability Based on Flow Cytometry and Microscopy.*” *Cytometry Part A* 83A (2): 197– 204, 2013. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22213>.
  34. LIMA, J.C. “*BIOATIVIDADE DE Morinda Citrifolia L. (NONI) NA INIBIÇÃO DE Escherichia Coli E Staphylococcus Aureus.*” Brasil: Universidade Federal De Pernambuco, 2015.
  35. LIN-GIBSON, SHENG, SUMONA .S, and JOHN T. ELLIOTT. “*Summary of the National Institute of Standards and Technology and US Food and Drug Administration Cell Counting Workshop: Sharing Practices in Cell Counting*

- Measurements.” *Cytotherapy* 20 (6): 785– 95, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.03.031>.
36. MATHEW. J, VAZHACHARICKAL .S NK, and Jaim JOY. “*Análise Fitoquímica E Invitro Hemostática Atividade De Mimosa Pudica, Hemigraphis Colorata E Extratos De Folhas Chromolaena Odorata*,” 2016.
37. MEYER, B., N. FERRIGNI, J. PUTNAM, L. JACOBSEN, D. NICHOLS, AND J. MCLAUGHLIN. “*Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*.” *Planta Medica* 45 (05): 31–34, 1982. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.
38. NAIR, ANUJA A, NISHAT .A, and Y C TRIPATHI. “*A Review on Ethnomedicinal, Phytochemical, and Pharmacological Significance of Terminalia Sericea Burch. Ex DC*.” *Journal of Pharmacy Research* 12 (3), 2018.
39. NEVES, J.M, and CUNHA. S “*PLANTAS MEDICINAIS, 2015*”
40. NISSAE. S, IRSHAD. A, and NEELOFAR .M. 2018. “*Metabólitos secundários de plantas e seu papel - uma revisão*,” 2015.
41. NM, FAHMY, AL-SAYED E, AND SINGAB AN. “*Genus Terminalia: A Phytochemical and Biological Review*.” *Medicinal & Aromatic Plants* 04 (05), 2015. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000218>.
42. NORMANDO, DAVID, LEO, and CÁTIA. “*A escolha do teste estatístico - um tutorial em forma de apresentação em PowerPoint*.” *Dental Press Journal of Orthodontics* 15, 2010. <https://doi.org/10.1590/S2176-94512010000100012>
43. ORWA, C, A MUTUA, R KINDT, R JAMNADASS, and S ANTHONY. “*Agroforestry Database: A Tree Reference and Selection Guide- Terminalia Sericea*” 4, 2009. <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>.
44. POTEITA, MARINA, ANTONELLA .M, ANGELO .G, LORENA .C, MAURICE .K, VALENTINA .R, FEDERICO .M. “*Cytotoxic and Apoptotic Effects of Different Extracts of Moringa oleifera Lam on Lymphoid and Monocytoid Cells*.” *Experimental and Therapeutic Medicine*, May, 2019. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7544>.
45. RIBEIRO, RAYANE. T, MARIA. L, and MARGARETH FERREIRA DE SALES. “*Terminalia L. (Combretaceae) do Estado de Pernambuco, Brasil*.” *Hoehnea* 45 (2): 307– 13, 2018. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-63/2017>.
46. RISS, TERRY, ANDREW .N, RICH .M, NATASHIA .K, and JOLANTA .V. “*Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells*,” 2019.

47. ROCHA, D. “*Métodos rápidos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em bacilos Gram-negativos.*” Doutorado em Análises Clínicas, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2020. <https://doi.org/10.11606/T.9.2020.tde-19022020-143436>.
48. RODRIGUES, SARA. C. “*Passagem Da Análise De Contagem De Células De Levedura Para Autocontrole, Pelo Método Sysmex.*” Universidade de Coimbra, 2011
49. SANTOS, SUIKINAI. N. “*Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de Combretum leprosum do bioma Caatinga.*”, Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2012. <https://doi.org/10.11606/T.11.2012.tde-07012013-083504>.
50. SANTOS.W, SIQUEIRA.M, and FILHO. L. C. “*Síntese De Derivados 4-Aril-3,4-Di-Hidroumarínicos Catalisada Por Nbcl5*” 36: 5, 2013.
51. SARATA, Amanda K. “*The 21st Century Cures Act (Division A of P.L. 114-255)*,” 2016.
52. SCHNEIDER, Zevia Merle. *Nursing and Midwifery Research: Methods and Appraisal for Evidence-Based Practice.* 4th ed. Chatswood, N.S.W.: Elsevier Australia, 2013
53. SIMOES, Cláudia Maria, Eloir Paulo SCHENKEL, Grace GOSMANN, João Carlos MELLO, Lilian Auler MENTZ, and Pedro PETROVICK. *Farmacognosia-Da-Planta-Ao-Medicamento.pdf.* 6th ed. Brasília, 2017.
54. SOARES, ANA .B. “*Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Programa De Residência Profissional Em Saúde Animal E Coletiva Faculdade De Veterinária,*” 2021.
55. SOUSA, THICIANA DA SILVA. “*Contribuição ao Conhecimento Químico de Combretum fruticosum Stuntz (Combretaceae).*” Universidade Estadual Do Ceará, 2010.
56. SUDEEP, N, MN NITHYA, and P KIRANMAYEE. “*Evaluation of In Vitro Cytotoxic Effects of Three Medicinal Plants on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC),*” 2017.
57. THOLUDUR, ARUN, LUIS .G, KOHINOOR .A, TIFFANY .T, ERIC .G, GRESHAM .W, KEITH KULOWIEC, MELISSA .Q, AND SCOT SHEPARD. “*Comparing Automated and Manual Cell Counts for Cell Culture Applications,*” 2006.

58. UAQUESSA. S. “‘Olhar, Calar, Trancar E Esconder Tudo’ O Meio Familiar Como Espaço De Reprodução Da Delinquência Juvenil: O Caso Do Bairro de Maxaquene ‘B’, Maputo (2015).” Universidade Eduardo Mondlane, 2016. Acessado: <http://monografias.uem.mz/bitstream/.pdf>
59. VEMBADI, ABHISHEK, ANOOP MENACHERY, and MOHAMMAD A. QASAIMEH. “Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7 (June): 147, 2019. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00147>.
60. VIRIATO, VIRGILIO. “Trabalho de Licenciatura- Estudo Fitoquímico de algumas plantas medicinais usadas na Província de Maputo.” Maputo: Universidade Eduardo Mondlane, 2013.
61. [Http://www.faacz.com.br/repositorio\\_de\\_tccs/.pdf](Http://www.faacz.com.br/repositorio_de_tccs/.pdf)
62. <Https://www.infoescola.com/bioquimica/flavonoides/>
63. <Https://oetnobotanico.wordpress.com/2015/05/08/este-quimico-sou-eu-a-borracha-e-outros-metabolitos-secundarios/>
64. <Https://wildflowernursery.co.za/indigenous-plant-database/terminalia-sericea/>

## 10 Anexos

## 10.1 Anexo I- Formulário de contagem de células pela microscopia

Número do participante: MOVD 165  
 Data: Terceira 1952  
 Iniciais do técnico:

Quadrado do hemacitômetro	Total de Células contadas	Total de células viáveis	Total de células não viáveis
Quadrado nº1			
Quadrado nº2		55	6
Quadrado nº3		66	13
Quadrado nº4		73	11
<b>Total</b>		194	30
<b>Média</b>			
Factor de diluição			
Factor de Hematocitômetro ( $10^4$ )			
Conversão de células x $10^6$			
% de células viáveis			

Número do participante: MOVD 165  
 Data: 1.952  
 Iniciais do técnico:

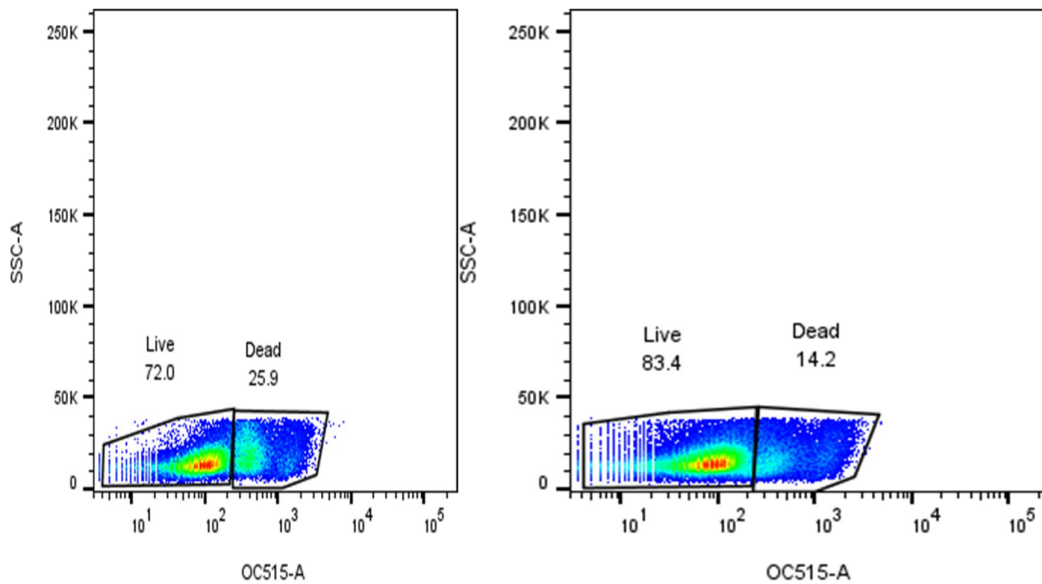
Quadrado do hemacitômetro	Total de Células contadas	Total de células viáveis	Total de células não viáveis
Quadrado nº1		61	4
Quadrado nº2		55	13
Quadrado nº3		47	6
Quadrado nº4		63	12
<b>Total</b>		226	35
<b>Média</b>			
Factor de diluição			
Factor de Hematocitômetro ( $10^4$ )			
Conversão de células x $10^6$			
% de células viáveis			

Número do participante: MOVD 165  
 Data: Terceira 1953  
 Iniciais do técnico:

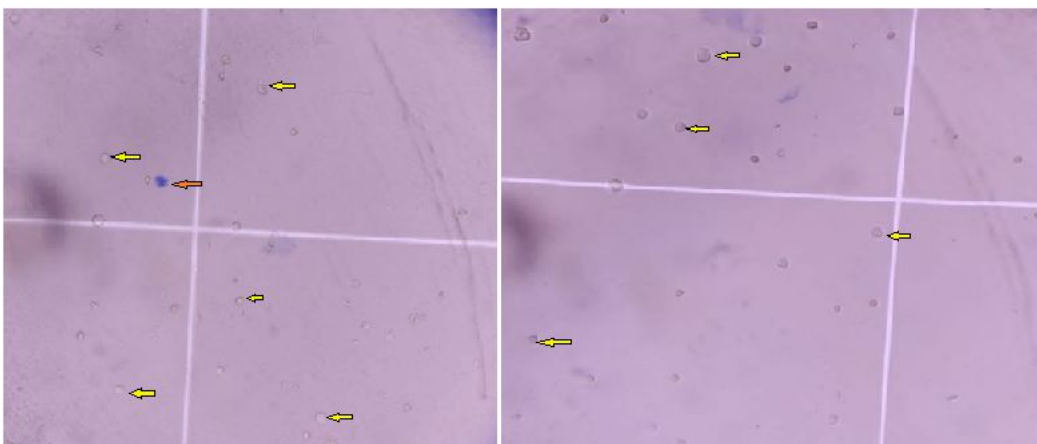
Quadrado do hemacitômetro	Total de Células contadas	Total de células viáveis	Total de células não viáveis
Quadrado nº1		21	4
Quadrado nº2		27	6
Quadrado nº3		18	6
Quadrado nº4		20	2
<b>Total</b>		86	18
<b>Média</b>			
Factor de diluição			
Factor de Hematocitômetro ( $10^4$ )			
Conversão de células x $10^6$			

## 10.2 Anexo II- Ilustração do processo de determinação da citotoxicidade através dos dois métodos: citometria de fluxo e microscopia.

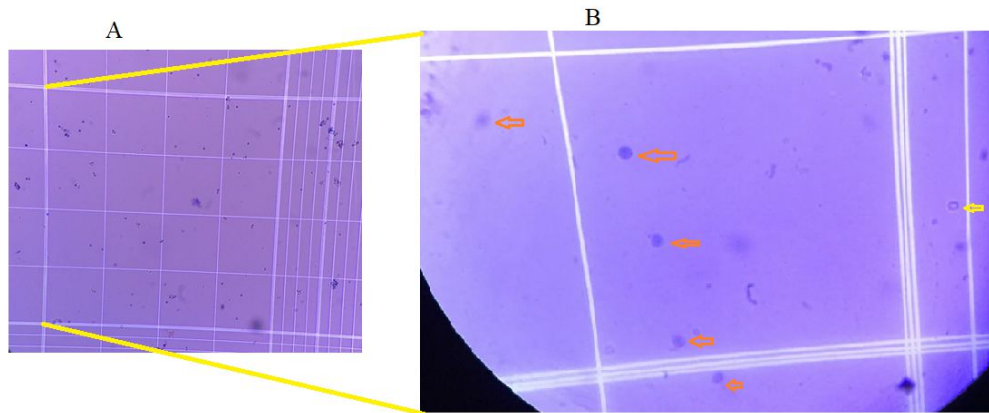
As imagens subsequentes demonstram como cada método realiza a contagem de células. A citometria de fluxo, embora não permita uma observação direta das células, fornece dados representados como um histograma com dois parâmetros correlacionados (células viáveis e não viáveis) Fig.15. Por outro lado, a microscopia permite uma observação directa das células, distinguidas em dois parâmetros (células viáveis e não viáveis) Fig.16.



**Figura 15:** Determinação da citotoxicidade observada através da citometria, gating das populações de células viáveis (Live) e células não viáveis (Dead)



**Figura 16:** Determinação da citotoxicidade observada através da microscopia. As células mortas são indicadas pelas setas laranjas e as células vivas pelas setas amarelas



**Figura 17:** Determinação da citotoxicidade observada através da microscopia. As células mortas coradas pelo azul de tripano são indicadas pelas setas laranjas e as células vivas sem a coloração de azul de tripano são indicadas pelas setas amarela. A **figura A** corresponde ao campo da camara de Neubauer observada no microscopio optico na objectiva de 10X e a **figura B** campo da camara de Neubauer observado na objectiva de 40X

### 9.3 Anexo III- Análises estatísticas

**Tabela 2:** Análise Estatística 1- Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos dados da citotoxicidade de *T. sericea*

[DataSet0] J:\Comparacao de metodos\Terminalia sericea\Citotoxicidade Cetometria.sav

#### Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Citotoxicidade	11	100,0%	0	0,0%	11	100,0%

#### Descriptives

			Statistic	Std. Error
Citotoxicidade	Mean		11,1879	3,83469
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,6437	
		Upper Bound	19,7321	
	5% Trimmed Mean		10,6573	
	Median		3,7933	
	Variance		161,753	
	Std. Deviation		12,71823	
	Minimum		,00	
	Maximum		31,93	
	Range		31,93	
	Interquartile Range		24,73	
	Skewness		,568	,661
	Kurtosis		-1,613	1,279

#### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Citotoxicidade	,265	11	,030	,811	11	,013

[DataSet0] J:\Comparacao de metodos\Terminalia sericea\Citotoxicidade Microscopia.sav

### Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Citotoxicidade	11	100,0%	0	0,0%	11	100,0%

### Descriptives

			Statistic	Std. Error
Citotoxicidade	Mean		8,7724	3,24956
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,5319	
		Upper Bound	16,0129	
	5% Trimmed Mean		7,8236	
	Median		3,9703	
	Variance		116,156	
	Std. Deviation		10,77756	
	Minimum		,00	
	Maximum		34,62	
	Range		34,62	
	Interquartile Range		13,22	
	Skewness		1,621	,661
	Kurtosis		2,451	1,279

### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Citotoxicidade	,217	11	,153	,812	11	,014

**Tabela 3:** Análise Estatística - Teste de regressão não linear para verificar a citotoxicidade *T. sericea* mensurada por Microscopia

,Citotoxicidade M
log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters),
Best-fit values,
Bottom,0.2483
Top,6911
LogIC50,6.609
HillSlope,0.6402
IC50,4061966
Span,6911
95% CI (profile likelihood),
Bottom,-9.880 to 5.048
Top,???
LogIC50,2.417 to ???
HillSlope,0.2768 to 2.282
IC50,261.1 to ???
Goodness of Fit,
Degrees of Freedom,26
R squared,0.7442
Sum of Squares,1098
Sy.x,6.498
,
Number of points,
# of X values,30
# Y values analyzed,30
Outliers (excluded, Q=1%),0(?)

**Tabela 4:** Análise Estatística 3-Teste de regressão não linear para verificar a citotoxicidade *T. sericea* mensurada por Citometria



,Citotoxicidade C
log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters),
Best-fit values,
Bottom,-0.9245
Top,36.37
LogIC50,2.266
HillSlope,0.9818
IC50,184.5
Span,37.29
95% CI (profile likelihood),
Bottom,-14.41 to 2.149
Top,26.81 to ???
LogIC50,1.959 to ???
HillSlope,0.2216 to 2.060
IC50,90.89 to ???
Goodness of Fit,
Degrees of Freedom,24
R squared,0.9104
Sum of Squares,327.7
Sy.x,3.695
,
Number of points,
# of X values,30
# Y values analyzed,30
Outliers (excluded, Q=1%),2

**Tabela 5:** Análise Estatística 4- Teste de Correlação de Spearman para verificar a correlação entre os métodos na mensuração da citotoxicidade de *T. sericea*

Correlation	;"Citotoxicidade Citometria
	vs.
	Citotoxicidade Microscopia"
Spearman r;	
r	0,9722
95% confidence interval;	
P value;	
P (two-tailed);<	<.001
P value summary;***	
Exact or approximate P value?;	Exact
Significant? (alpha = 0.05);	Yes
;	
Number of XY Pairs;	10

**Tabela 6:** Análise Estatística 5-Teste Bland-Altman para verificar os limites de concordância entre os dois métodos de avaliação da citotoxicidade

Bland-Altman Bias & agreement Data 1
Bias -0,9526
SD of bias 3,888
95% Limits of Agreement
From -8,572
To 6,667

	Instituto Nacional de Saúde (INS)	
Revisão: 0.1	Ficha de recolha de dados do estudo Moringa-COVID-19	FM – CISPOC- CL225

### A. Dados Demográficos



1. Nome: \_\_\_\_\_ 2. Data de admissão: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 3. Departamento: \_\_\_\_\_
4. Código do paciente: \_\_\_\_\_ Contacto Telefónico: \_\_\_\_\_
5. Residência: Bairro \_\_\_\_\_
6. Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 7. Idade: \_\_\_\_\_ 8. Sexo: Masc  Fem
9. Raça: Negra  Branca  Asiático  Mestiço  Outra: \_\_\_\_\_
10. Escolaridade: Nenhum  Primário  Secundário  Técnico  Universitário
11. Estado Civil: Solteiro  Casado  Divorciado  Viúvo(a)

### B. Dados Epidemiológicos e factores de risco

12. Hábitos
- a) Alcoólicos  Duração \_\_\_\_ (dias/meses/anos)
13. Viagem recente: Sim  Não  Se sim locais: \_\_\_\_\_
- a) Data de partida \_\_\_\_\_ b) Data de regresso \_\_\_\_\_
14. Contacto com pessoas doentes: Sim  Não  a) Duração do contacto \_\_\_\_\_
15. Presença de comorbidades
- a) Diabetes  c) Asma  e) Tumores
- b) Hipertensão  d) Cardiopatias  f) Insuficiência renal

### C. INFORMAÇÃO CLÍNICA

16. Internamento prévio: Sim  Não
17. Unidade sanitária: \_\_\_\_\_ 18. Serviço de internamento: \_\_\_\_\_
19. Tempo de internamento: \_\_\_\_\_
20. Uso de dispositivos médicos: Sim  Não
- a) Cateter venoso: Sim  Não
- b) Ventilação mecânica: Sim  Não
- c) Sonda Nasogástrica: Sim  Não
- d) Procedimentos cirúrgicos: Sim  Não
- e) Outros: \_\_\_\_\_

 INSTITUTO NACIONAL DE SAUDE MOÇAMBIQUE	Instituto Nacional de Saude (INS)	 CISPOC
Revisão: 0.1	Ficha de recolha de dados do estudo Moringa-COVID-19	FM – CISPOC- CL225

Vacinação contra COVID-19: Sim  Não  Nome da vacina: \_\_\_\_\_

21. Medicação: tratamento prévio: Sim  Não

Nome	Duração	Data de Início
_____	Duração ____ dias	_____ dd/mm/aa
_____	Duração ____ dias	_____ dd/mm/aa
_____	Duração ____ dias	_____ dd/mm/aa

**D. Dados clínicos**

22. Transferência: Sim  Não  23. Unidade sanitária: \_\_\_\_\_ 24. Serviço: \_\_\_\_\_

25. Data de início dos sintomas: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 26. Data de internamento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

27. Dias de evolução dos sintomas: \_\_\_\_\_

28. Diagnóstico de internamento: \_\_\_\_\_

---

29. Sintomatologia

Febre <input type="checkbox"/>	Mialgia <input type="checkbox"/>	Diarreia <input type="checkbox"/>	Esplenomegália <input type="checkbox"/>	Tosse <input type="checkbox"/>
Calafrios <input type="checkbox"/>	Anorexia <input type="checkbox"/>	Vómitos <input type="checkbox"/>	Hepatomegália <input type="checkbox"/>	Dor torácica <input type="checkbox"/>
Cefaleia <input type="checkbox"/>	Desidratação <input type="checkbox"/>	Dor abdominal <input type="checkbox"/>	Dor orofaríngea <input type="checkbox"/>	Dispneia <input type="checkbox"/>
Atralgia <input type="checkbox"/>	Nauseas <input type="checkbox"/>	Icterícia <input type="checkbox"/>		Dor na coluna <input type="checkbox"/>
Fraqueza <input type="checkbox"/>				Dor ao urinar <input type="checkbox"/>

Outros: \_\_\_\_\_

30. Estado serológico (HIV): Sim  Não  31. Nível de CD4 \_\_\_\_\_ 32. Carga viral \_\_\_\_\_

33. Dados Hematológicos:

Parametro	Resultado	Valores de referência		
		Homens	Ambos sexos	Mulheres
HGB		12,2 - 17,7		9,5 - 15,8
PLT			126-438	
WBC			3,1-9,1	
Neutrófilos			1,08 - 4,71	
Linfocitos				

2

Ficha de recolha de informação versão 4.0, 28.Set.2021



## ANEXO 3 – FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA MAIORES DE 18 ANOS

### FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

**Título do estudo:** Estudo *in vitro* do potencial anti-inflamatório de extractos de *Moringa oleifera* no âmbito da COVID-19.

Senhor (a),

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar como voluntário num estudo que está sendo conduzido pelo Instituto Nacional de Saúde no âmbito da pandemia da COVID-19. Este é o formulário de consentimento informado, que lhe dará a informação necessária sobre todos os detalhes do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comité de ética do Instituto Nacional de Saúde e pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) de Moçambique.

#### **1. Objectivo do estudo**

Este estudo tem como objectivo avaliar a actividade anti-inflamatória dos extractos de *Moringa oleifera* isto é, avaliar se a *Moringa* pode ser usada para ajudar no tratamento de pacientes com COVID-19. Queremos também ver nos doentes outras formas de avaliar como a doença progride.

#### **2. Informação geral**

SARS-CoV-2/COVID-19 é um vírus de transmissão rápida que atinge de forma rápida grande parte da população e causa morte de várias pessoas em pouco tempo. O vírus passa de uma pessoa para outra por contacto com gotículas de pessoas doentes, e pode causar doença grave principalmente em pessoas mais velhas. A presença de vírus nos pulmões cria lesões e é a principal causa de problemas respiratórios graves que podem complicar a vida dos doentes. Para a infecção pelo vírus que causa a COVID-19, ainda não há tratamento específico. Para o tratamento da COVID-19, foram propostas plantas medicinais como *Moringa (Moringa oleifera)*, Batata africana (*Hypoxis hemerocalideia*), Coração de boi (*Annona senegalensis*), Mogostão africano (*Garcinia livingstonei*) e Chibala (*Warburgia salutaris*), utilizadas em Moçambique no tratamento de doenças respiratórias. Essas plantas podem ser facilmente encontradas e são de baixo custo.

Estudo *in vitro* do potencial anti-inflamatório dos extractos de *Moringa oleifera* no âmbito da COVID-19 versão 4.0, 28.Set.2021

### 3. Procedimentos do estudo

Neste estudo serão colhidas informações dos participantes. Serão feitas algumas perguntas aos participantes, sobre a idade, residência, viagens, data de início da doença, os sintomas e outras perguntas importantes para o estudo. Outra informação sua, como participante do estudo poderá ser retirada do seu processo clínico. Para além das amostras usadas para o diagnóstico da COVID-19, vai ser pedido o fornecimento de amostras de fezes e cerca de 28 ml de sangue. As amostras de sangue a serem colhidas serão usadas para contagem das células do sangue (Hemograma), para avaliar o balanço entre vários indicadores bioquímicos de saúde no organismo (Bioquímica), para testagem de HIV e para isolamento de células do sistema de defesa do corpo, que a posterior serão usadas para a realização dos ensaios com a *Moringa* e avaliação de indicadores do estado da saúde em relação a COVID-19, específicos para este estudo.

### 4. Riscos/ Benefícios de participação no estudo

Os resultados deste estudo terão um potencial benefício para indivíduos com infecção pelo SARS-CoV-2, para Moçambique e o mundo no geral pela possibilidade de descoberta de um tratameto de fácil acesso e de baixo custo. Numa perspectiva mais futura, os resultados deste estudo podem melhorar a vida da população no geral pela redução do número de doentes e mortes por COVID-19 e redução de gastos de medicamentos. Contudo, o estudo não trará benefícios imediatos. Não irão ocorrer mudanças imediatas para o sistema de saúde. Se os resultados desejados forem alcançados, haverá necessidade de desenvolver outros estudos com desenho apropriado e um número maior de doentes. Como participante do estudo você poderá beneficiar-se a curto prazo de resultados de testes de hematologia, bioquímica e HIV, que são testes que não fazem parte da rotina de rastreio de pacientes com SARS-CoV-2. Os participantes vivendo com o HIV poderão beneficiar-se dos resultados CD4 e de carga viral do HIV-1. Casos novos de indivíduos vivendo com o HIV-1, serão encaminhados para unidades de saúde para o devido seguimento.

Antes da colheita de amostras será feita uma preparação psicológica aos participantes de modo a minimizar o impacto. A colheita de zaragoas nasofaríngeas é um procedimento desconfortável, contudo faz parte dos procedimentos normais de colheita de amostras para o diagnóstico de SARS-CoV-2. A colheita de amostras de sangue poderá causar um pequeno desconforto aos participantes, e você poderá correr o risco de ter hematomas se houver alguma dificuldade. Estudo in vitro do potencial anti-inflamatório dos extractos de *Moringa oleifera* no âmbito da COVID-19 versão 4.0, 28.Set.2021

durante a colheita, mas nada que altere o seu estado de saúde. Aos participantes que tiverem hematomas depois da colheita, será feita uma massagem no local e o participante será instruído a fazer massagem com panos quentes ao chegar em casa, se for o caso. Serão colhidos até 28 ml de sangue ao paciente o correspondente a cerca de 8 colheres de sopa, e não terá nenhum impacto sobre o estado de saúde do participante.

#### **5. Confidencialidade**

Seus resultados serão mantidos em sigilo, somente os pesquisadores terão acesso às suas informações. Depois de aceitar participar no estudo ser-lhe-á atribuído um código único, exclusivo para este estudo e confidencial. O seu questionário e as suas amostras serão codificadas utilizando este código único de tal modo que ninguém poderá relacionar o seu questionário e suas amostras a si. Os documentos que contêm sua informação serão guardados em um lugar seguro e apenas a equipa de estudo terá acesso a eles. Quando o estudo terminar, os documentos contendo os resultados e informações pessoais serão destruídas. O relatório final do estudo não mencionará o seu nome. Qualquer participante está livre de retirar-se do estudo a qualquer momento, mesmo depois da colheita de amostras e estas não serão usadas para os procedimentos acima descritos. No entanto isto não vai afetar no seu tratamento. Uma cópia do consentimento será arquivada no seu processo do estudo e outra deve ser entregue a si ou acompanhante.

#### **6. Quem pode contactar em caso de problemas?**

Se você tiver qualquer dúvida pode contactar a Investigadora Principal do estudo, Raquel Matavele Chissumba, telefone: +258 827393830, email: [raquelmatavele@gmail.com](mailto:raquelmatavele@gmail.com). Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos entre em contato com o Comitê de Bioética de Moçambique localizado fisicamente no edifício central do Ministério da Saúde, Av. Eduardo Mondlane 1008, R/C, Maputo, ou pelo telefone (+258) 21 430814. Se você concordar em participar deste estudo, por favor assinar o termo de consentimento. Obrigado por participar neste estudo.

### 7. Participação voluntária

A sua participação neste estudo é voluntária. É livre de aceitar ou não participar neste estudo. Caso recuse em participar neste estudo isto não afectará o seu tratamento na unidade sanitária e será tratado normalmente.

### DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Fui informado/a verbalmente e por escrito sobre este estudo e compreendo do quê se trata.

Concordo em participar neste estudo

Nome do participante no estudo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante/ acompanhante/ representante legal

Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do representante da equipa

Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura da testemunha (se aplicável)

Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Local da administração do consentimento

Estudo in vitro do potencial anti-inflamatório dos extractos de *Moringa oleifera* no âmbito da COVID-19 versão 4.0, 28.Set.2021