



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARCELA BEATRIZ DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E
GENOTÓXICA DO ÁCIDO GÁLICO COMO UM POTENCIAL
AGENTE RADIOPROTETOR**

Recife
2024

MARCELA BEATRIZ DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E
GENOTÓXICA DO ÁCIDO GÁLICO COMO UM POTENCIAL
AGENTE RADIOPROTETOR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Ana Maria Mendonça de
Albuquerque Melo

Recife
2024

Silva, Marcela Beatriz de Oliveira.

Estudo da atividade antioxidante, citotóxica e genotóxica do ácido gálico como um potencial agente radioprotetor / Marcela Beatriz de Oliveira Silva. - Recife, 2024.

41 p. : il., tab.

Orientador(a): Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências, anexos.

1. Radiações ionizantes. 2. Genotoxicidade. 3. Citotoxicidade. 4. Radioproteção. I. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

MARCELA BEATRIZ DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E
GENOTÓXICA DO ÁCIDO GÁLICO COMO UM POTENCIAL
AGENTE RADIOPROTETOR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo
UFPE/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Dra. Osana Diniz Ferreira
UFPE/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Dra. Maíra de Vasconcelos Lima
UFPE/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Dedico este trabalho à minha mãe,
Rosinete Maria, que com seu apoio
imensurável sinto que posso chegar a
qualquer lugar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida e pela força para que eu pudesse chegar até aqui. A minha sincera gratidão à minha orientadora Prof^a Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo pela orientação, suporte e confiança ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Dewson Rocha pelo conhecimento passado e paciência, que foram fundamentais para a realização dos experimentos.

Um agradecimento especial à minha família que, mesmo de longe, o amor e apoio incondicional me motivaram todos os dias. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Aos meus amigos de vida que apesar dos diferentes caminhos tomados contribuíram para o meu crescimento, Carolayne de Paula, Cleriston Flaviano, Daniela Pereira, João Francelino, Laryssa Eduarda e Marianny Beatriz. Agradeço também aqueles que desde o primeiro semestre de graduação estiveram comigo, Ane Caroline, Cassia Rebeca, Kássia dos Santos, Maria Eduarda e Stéphane Caroline.

Meu reconhecimento à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa que possibilitou a execução deste projeto.

Por fim, agradeço a todos meus familiares, amo todos vocês!

“O que fazemos para nós mesmos morre conosco. O que fazemos pelos outros e pelo mundo permanece e é imortal.”

Albert Pine

SILVA, Marcela Beatriz de Oliveira. **Estudo da atividade antioxidante, citotóxica e genotóxica do ácido gálico como um potencial agente radioprotetor**. 2024. 41. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

O uso das radiações ionizantes cresceu exponencialmente desde a descoberta dos Raios X em 1895, estando presente atualmente em diversas áreas como na medicina, indústria, agricultura, produção de energia, conservação de alimentos, entre outras. Com a grande aplicabilidade dessas radiações, houve também o aumento da exposição dos seres vivos a essas fontes de energia que dependendo do seu uso podem causar efeitos danosos ao organismo. Tais efeitos podem ser somáticos ou genéticos, causando mutações gênicas e até mesmo morte da célula. Desta forma, faz-se necessário a busca de substâncias capazes de proteger os sistemas biológicos dos efeitos indesejados das radiações ionizantes. Neste trabalho, foi avaliada a atividade antioxidante, citotóxica e genotóxica do ácido gálico como um potencial agente radioprotetor. Inicialmente, foi realizada a coleta sanguínea e o isolamento dos linfócitos para realização dos ensaios. Em seguida, foi realizado o teste de viabilidade celular com azul de tripano e a avaliação da atividade antioxidante do ácido gálico por meio do teste de sequestro de radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Posteriormente, foi feito o ensaio alcalino cometa para avaliar a atividade genotóxica do ácido gálico. Para a análise do grau de dano ao DNA, foi utilizado o Índice de Dano (ID) como parâmetro. Os resultados mostraram que o ácido gálico possui baixa toxicidade às células expostas e que a concentração de 150 µg/mL é a que causou menor dano genotóxico, portanto, é um candidato potencial para testes de atividade radioprotetora.

Palavras-chave: 1. Radiações ionizantes 2. Genotoxicidade 3. Citotoxicidade 4. Radioproteção

SILVA, Marcela Beatriz de Oliveira. **Study of the antioxidant, cytotoxic and genotoxic activity of gallic acid as a potencial radioprotective agent.** 2024. 41. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

The use of ionizing radiation has grown exponentially since the discovery of X-rays in 1895, and it is now found in various fields such as medicine, industry, agriculture, energy production, and food preservation, among others. However, this increased use has also led to greater exposure of living organisms to these energy sources, which can have harmful effects. These effects can be physical and/or biological, resulting in genetic mutations or even cell death. Therefore, it is essential to search for substances that can protect biological systems from the effects of ionizing radiation. In this study, we evaluated the antioxidant, cytotoxic and genotoxic activity of gallic acid as a potential radioprotective agent. Initially, blood samples were collected, and lymphocytes were isolated for the experiments. Subsequently, we conducted a cell viability test using trypan blue and assessed the antioxidant activity of gallic acid through the 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay. Later, an alkaline comet assay was performed to evaluate its genotoxicity. The Damage Index (DI) was used to analyze the extent of DNA damage. The results indicated that gallic acid exhibits low toxicity to the exposed cells, with a 150 µg/mL concentration causing the least genotoxic damage, therefore it is a potential candidate for radioprotective activity tests.

Key words: 1. Ionizing radiations 2. Genotoxicity 3. Cytotoxicity 4. Radioprotection

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espectro de energia eletromagnética.	14
Figura 2 – Mecanismos de ação da radiação na molécula de DNA.	16
Figura 3 – Estrutura do DNA.	17
Figura 4 – Graus de dano ao DNA em linfócitos.	19
Figura 5 – Linfócitos.	20
Figura 6 – Estrutura química do ácido gálico.	22
Figura 7 – Índices de dano ao DNA.	29
Figura 8 – Percentual de dano ao DNA em níveis por concentração.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antioxidante do ácido gálico pelo método DPPH.

28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	RADIAÇÕES	14
2.2	ESTRUTURA DO DNA	17
2.3	ENSAIO COMETA	18
2.4	LINFÓCITOS	19
2.5	RADIOPROTETORES	20
2.5.1	Radioprotetores Sintéticos e Naturais	21
2.6	ÁCIDO GÁLICO	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	ÁCIDO GÁLICO	25
4.2	ENSAIO ANTIOXIDANTE	25
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE	25
4.4	VIABILIDADE CELULAR	26
4.5	ENSAIO ALCALINO COMETA	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO ÁCIDO GÁLICO	28
5.2	ATIVIDADE GENOTÓXICA DO ÁCIDO GÁLICO	29
6	CONCLUSÃO	31
7	REFERÊNCIAS	32
	ANEXO A – Cópia do Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética Humana	38
	ANEXO B – Cópia do Termo de Livre consentimento	39

1 INTRODUÇÃO

Radiação é definida como propagação de energia, isto é, ao emitir energia, uma fonte é capaz de transmiti-la através do espaço (ar ou vácuo) ou por meios materiais na forma de ondas eletromagnéticas ou partículas (teoria da dualidade onda-partícula de Louis de Broglie) (Okuno; Yoshimura, 2010). No espectro eletromagnético de energia, as radiações possuem comprimento de ondas e frequência distintas e nem todas se comportam de forma a ionizar o meio com o qual interagem. Assim, de acordo com a frequência e a energia fotônica, as radiações podem ser classificadas em ionizantes e não ionizantes (Ziessman, 2014).

As radiações ionizantes podem interagir com a matéria viva de forma direta, transferindo toda a energia diretamente para a biomolécula ou indiretamente, ou seja, a radiação transfere sua energia para moléculas de água, provocando quebra dessa molécula e geração de radicais livres que irão interagir com as biomoléculas causando ionizações e conseqüentemente os efeitos biológicos das radiações (Okuno; Yoshimura, 2010).

Os avanços na utilização das radiações ionizantes em diferentes áreas do conhecimento, desde a medicina, agricultura e na indústria (Painuli; Kumar, 2016; Duggal et al., 2017), aumentaram a exposição dos seres vivos a essas fontes de energia, tornando-os mais suscetíveis a seus efeitos danosos.

Os efeitos deletérios da radiação podem se manifestar à nível molecular, devido ao dano causado ao DNA, a nível celular e/ou tecidual (Fenech, 2020). A radiação também pode afetar o funcionamento de células ou de suas futuras gerações, pois na maioria dos casos a sequência original da molécula de DNA é alterada podendo causar aberrações cromossômicas, indução de micronúcleos, quebras de fita dupla e mutações genéticas em linfócitos (Nenoi, Wang; Vares, 2015), ou até acarretar a morte do organismo (Fenech, 2020).

Como tentativa de amenizar os efeitos das radiações ionizantes, diferentes substâncias têm sido testadas com intuito de proteger o sistema biológico, comportando-se como radioprotetores ou radiomitigadores, porém, devido aos altos níveis de toxicidade celular não possuem aplicações práticas até o momento (Montoro et al., 2011; Koide et al., 2011). As substâncias radioprotetoras têm a capacidade de impedir a ação da radiação quando administrada antes ou no momento da exposição, pois estabelecem ligações químicas com os radicais livres

(Arouma, 1996; Montoro et al., 2011). Portanto, substâncias com atividade antioxidantes são promissoras como radioprotetoras.

Desta forma, a busca por moléculas que previnam e/ou reduzam os efeitos induzidos pelas radiações ionizantes no organismo é importante. Desse modo, um grande desafio está na identificação de moléculas de origem vegetal com as características moduladoras eficazes e não tóxicas às células, para formulação de agentes radioprotetores e radiomitigadores promissores. Dentre estas substâncias merece destaque o ácido gálico.

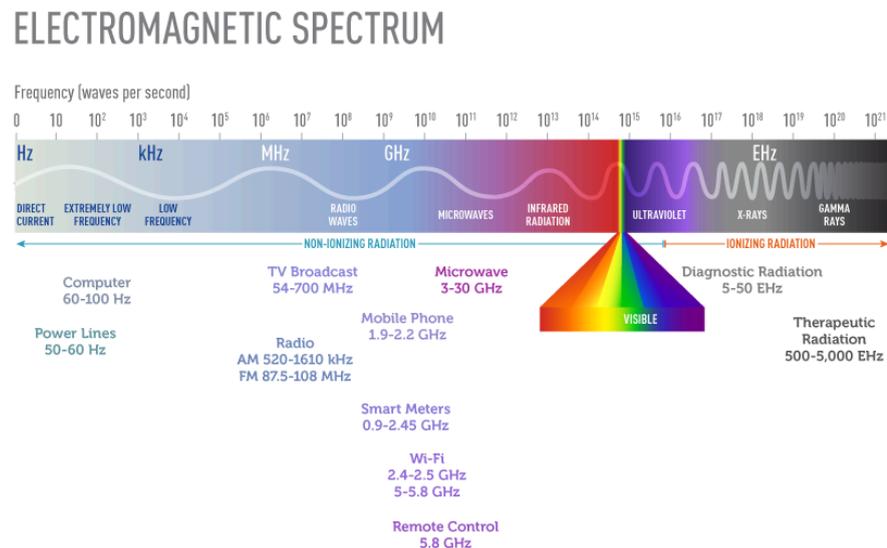
O ácido gálico é um composto fenólico encontrado em diversas fontes naturais como uvas, chá verde, casca de carvalho, morango, limão, banana, abacaxi, avelã e casca de maçã. Estudos prévios observaram atividades antitumorais, antimutagênicas, anticancerígenas, (Laguerre; Lecomte; Villeneuve, 2007), o que o torna proeminente para estudos da função radioprotetora. Assim, aprimorar os estudos sobre a atividade citotóxica e antioxidante passou a ser o objetivo desta pesquisa, para que posteriormente sejam realizados testes de sua atividade radioprotetora.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RADIAÇÕES

As radiações são um tipo de energia na forma de ondas eletromagnéticas ou partículas. A onda eletromagnética é composta por um campo elétrico e um campo magnético que são perpendiculares entre si e à direção em que a onda se propaga. Essas ondas podem ser classificadas em um espectro (Figura 1) com base em seu comprimento de onda, energia e frequência. Assim, elas se dividem em duas categorias principais: radiações ionizantes e radiações não ionizantes. As radiações ionizantes têm energia suficiente para ionizar a matéria com a qual entram em contato, ou seja, podem remover elétrons de átomos. Em contraste, as radiações não ionizantes não têm energia suficiente para quebrar ligações químicas. Exemplos de radiações não ionizantes incluem os raios ultravioleta, infravermelho, as ondas de radiofrequência, o laser, as micro-ondas e a luz visível (Samarth et al., 2019; Bitelli, 2006).

Figura 1- Espectro de energia eletromagnética.



Fonte: National Cancer Institute (NCI), 2022. Disponível em:

<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/radiation/electromagnetic-fields-fact-sheet>.

Dentro de todo espectro das ondas eletromagnéticas, apenas os Raios X e raios gama são considerados radiações ionizantes, pois possuem energia suficiente

para ionizar átomos. Os fótons de Raios X e gama, ao contrário das partículas carregadas, perdem toda ou quase toda a sua energia em uma única interação com os átomos, ejetando elétrons que, por sua vez, ionizam outros átomos até que sua energia se esgote. Além disso, os fótons podem também atravessar um meio sem qualquer interação (Okuno, 2013).

A radiação liberada por um núcleo excitado enquanto ele passa por um processo de reestruturação interna para alcançar a estabilidade é conhecida como radiação nuclear. Essa radiação pode ocorrer tanto na forma de partículas quanto de ondas eletromagnéticas, como a radiação gama, e ambas com a capacidade de ionizar a matéria. As radiações corpusculares são compostas por partículas carregadas, incluindo α (alfa), β^+ (pósitron), β^- (négatron) e prótons, que podem interagir com o meio ao seu redor, causando uma intensa ionização das moléculas presentes (Bitelli, 2006).

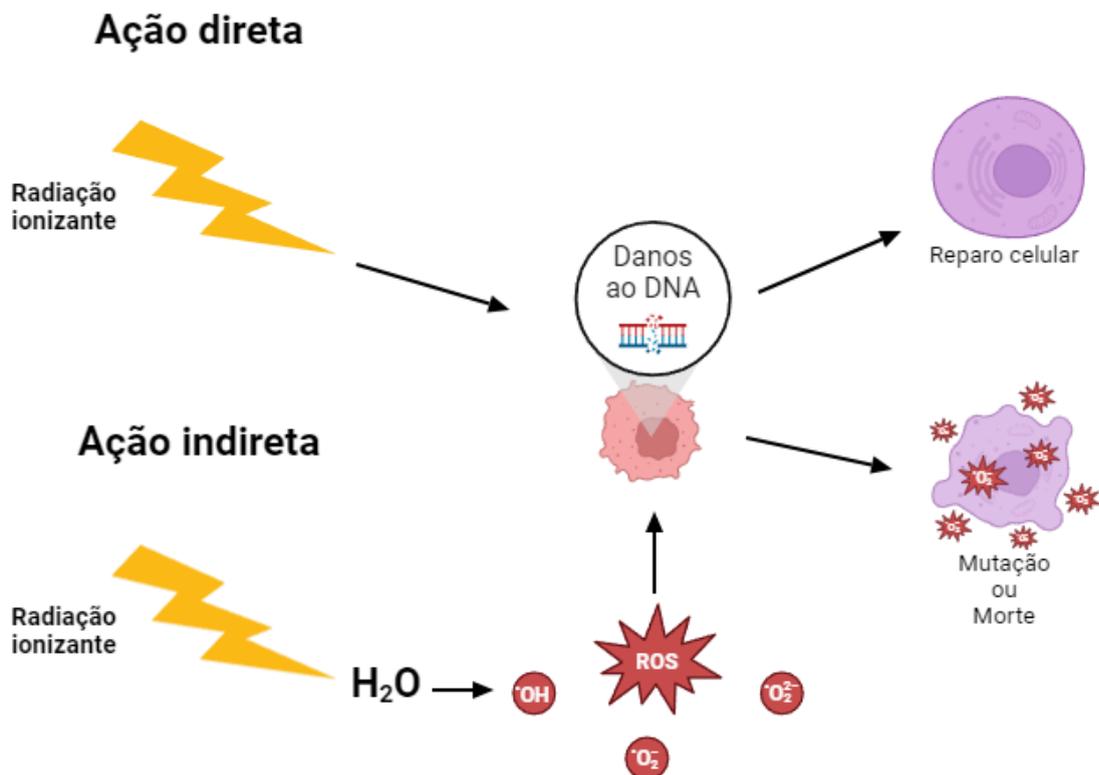
Os efeitos da radiação variam com a dose, a taxa de dose, o fracionamento, o tipo de radiação, e o tipo de célula ou tecido em questão, além de outros indicadores. Essas alterações nem sempre são prejudiciais ao organismo humano. Quando a substância afetada desempenha um papel crucial no funcionamento da célula, isso pode levar a mudanças em sua estrutura até à morte celular (Tauhata et al., 2013).

A radiação ionizante pode causar danos ao DNA de duas maneiras: por ionização direta e por processos indiretos, nos quais o DNA é afetado por vários produtos reativos gerados pela radiação. Os radicais livres resultantes podem atacar biomoléculas como DNA, proteínas e lipídios, iniciando a peroxidação lipídica e gerando intermediários que reagem com o DNA (Dimova et al, 2008). Entre os radicais livres estão o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), hidroperóxido ($\text{HO}_2\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sowa, 2012).

A interação direta (Figura 2) ocorre quando a radiação ionizante incide macromoléculas biológicas, como DNA e RNA. Essa interação pode causar danos fatais às células. Por outro lado, lesões no DNA que não levam a morte celular podem resultar em alterações estruturais. Essas alterações, causadas por falhas nos mecanismos de reparo celular, podem dar início ao processo de neoplasia celular, que podem ser transmitidas para as gerações futuras de células, (Siqueira, 2013). Os efeitos indiretos (Figura 2) surgem da interação da radiação com biomoléculas, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que atacam a molécula

alvo. Como 70% a 85% da massa dos organismos vivos é composta de água, a maioria dos danos causados pela radiação ocorre através da ação indireta, ou seja, a radiação é absorvida pelas moléculas de água, originando radicais livres. Este processo é conhecido como radiólise da água. Quando a radiação é absorvida por uma molécula de água, ela pode formar íons H_2O^+ ou H_2O^- , que são altamente instáveis e se dissociam em outros íons; radicais livres como: $\text{O}_2\cdot$, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{HO}_2$ e outras espécies reativas como H_2O_2 , oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) (Moreira, 2011). Os efeitos prejudiciais dos radicais livres são potencializados pela presença de oxigênio, que se espalham pelo meio biológico causando danos às células. Acredita-se que eles sejam a causa principal de danos biológicos resultantes da radiação por meio da transferência linear de energia (LET) (Moreira, 2011).

Figura 2 - Mecanismos de ação da radiação na molécula de DNA.



Fonte: A autora, 2024.

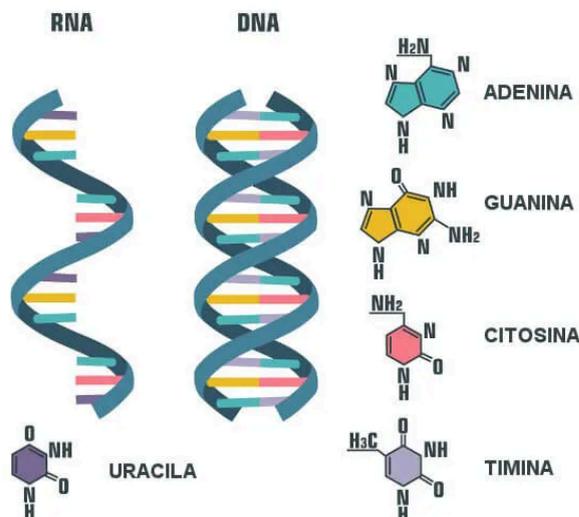
As células possuem diversos mecanismos de reparo, pois, ao longo de sua vida, enfrentam danos causados por substâncias químicas, variações na concentração iônica durante a troca de nutrientes e resíduos na membrana celular, além de danos físicos resultantes de mudanças de temperatura e exposição à radiação. Mesmo lesões significativas, como aquelas no DNA, podem ser reparadas

ou compensadas, dependendo do tempo e das condições disponíveis. Assim, um tecido exposto a uma dose baixa de radiação tem boas chances de recuperar sua integridade, mesmo que ocorra uma certa porcentagem de morte celular. Em condições normais, o tecido é capaz de repor as células e retomar seu funcionamento normal (Tauhata et al., 2013). Portanto, estudar mecanismos que possam proteger o DNA da célula é importante para mantê-lo íntegro. A estrutura e uma das técnicas de análise do DNA serão abordadas nos próximos subtópicos.

2.2 ESTRUTURA DO DNA

A molécula de DNA é uma longa hélice dupla enrolada em si mesma, semelhante a uma escada em caracol. Dentro dela, duas fitas, compostas por moléculas de carboidratos e de fosfatos, unem-se devido ao emparelhamento de quatro moléculas denominadas bases. Estas estruturas, ou seja, as bases nitrogenadas podem ser de dois tipos: pirimidinas (citosina (C), timina (T) e uracila (U), e púricas: adenina (A) e guanina (G), figura 3. O açúcar é uma pentose, a 2-desoxirribose que estabelece uma ligação glicosídica entre o seu carbono C1' e o nitrogênio N1 das pirimidinas ou o nitrogênio N9 das purinas, portanto uma ligação N-glicosídica. O ácido fosfórico se liga ao carbono C5' da pentose por meio de uma ligação ester (Pierce, 2011).

Figura 3 - Estrutura do DNA.



Fonte: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/dna.htm>.

Todos os organismos devem duplicar o seu DNA com extrema precisão e em altas taxas (até mil nucleotídeos por segundo), antes de cada divisão celular (Poty, 2011).

O DNA que existe na natureza pode se apresentar de diversas formas, tais como: fitas simples e duplas, e os dois podem existir tanto na forma linear, como na circular. Danos a esta estrutura podem durante a vida útil da maioria das células, como resultado de metabolismo energético aberrante, exposição à radiação, produtos químicos prejudiciais ao DNA e até mesmo infecções virais. Métodos rápidos, sensíveis e econômicos para a detecção destes danos oferecem informações valiosas sobre a genotoxicidade e o reparo do DNA. O ensaio cometa, ou eletroforese de célula única, surgiu como um método popular para detectar quebras de DNA de fita simples e dupla em células únicas (Dunkenberger; Reiss; Valle, 2022).

2.3 ENSAIO COMETA

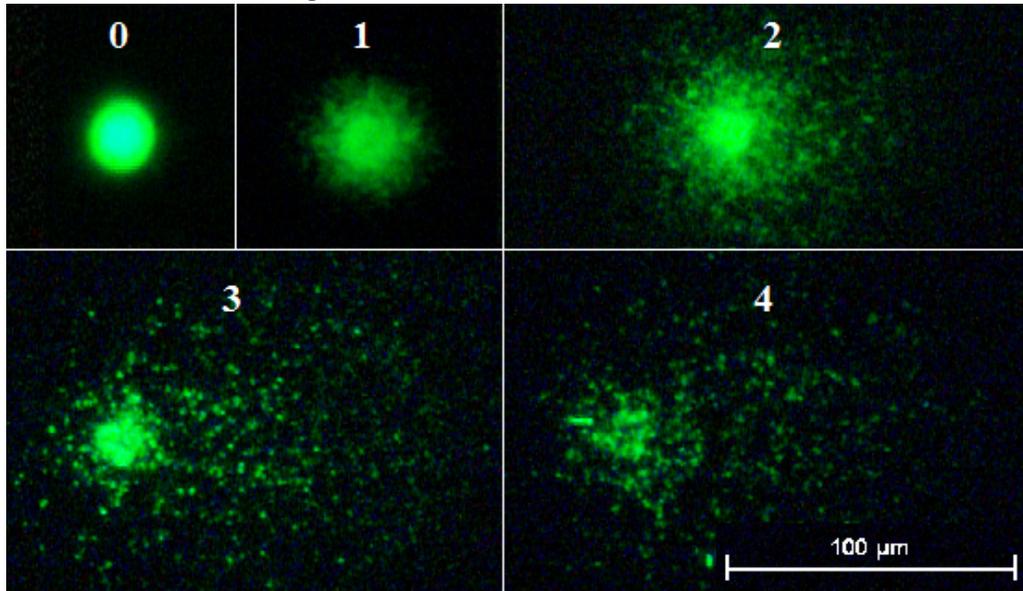
Este ensaio é uma técnica que avalia a genotoxicidade de agentes químicos ou físicos. É baseada no fato de que, quando expostos a uma corrente elétrica, fragmentos de DNA danificados em um gel migram para mais longe do núcleo em direção ao ânodo, resultando no formato de um cometa. Este ensaio é versátil, quantitativo, simples de executar e exibe alta sensibilidade; no entanto, condições experimentais consistentes devem ser mantidas para garantir a reprodutibilidade do ensaio. A eletroforese pode ser realizada em condições neutras para detectar apenas quebras de fita dupla ou em condições alcalinas para detectar quebras de fita simples e dupla (Dunkenberger; Reiss; Valle, 2022; Collins et al, 2023).

O Ensaio cometa, também chamado de ensaio de células individualizadas em gel (SCG) ou eletroforese de microgel (MGE) foi introduzido pela primeira vez por Ostling and Johanson em 1984 como uma técnica para a visualização direta de danos no DNA em cada célula (Ostling et al., 1984).

Nesse procedimento, nas células de conteúdo nuclear lesionado, a corrente elétrica provoca um transporte de fragmentos do DNA para fora dos núcleos. A migração deste fragmento gera uma imagem que lembra um cometa com uma cabeça e uma cauda, originando assim o nome do ensaio, como citado

anteriormente. Os danos, por sua vez, são qualificados em função da fragmentação do DNA, podendo ser classificados de 0 a 4, onde o zero representa a ausência de danos e 4 o dano máximo (Collins et al, 2023). (Figura 4)

Figura 4 - Graus de dano ao DNA em linfócitos.



Fonte: Lima, 2023.

Para avaliar efeitos do ácido gálico sobre as células e sobre o DNA foram utilizadas células linfocitárias humanas.

2.4 LINFÓCITOS

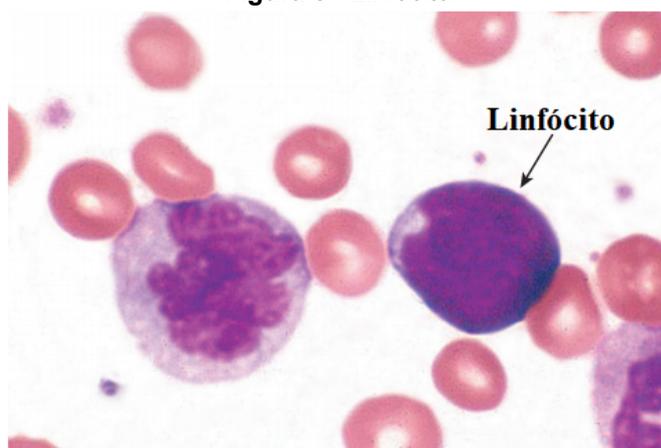
O sistema imunológico é constituído por órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões provocadas por diferentes agentes (Mesquita, 2000). Células tronco pluripotentes da medula óssea dão origem às células progenitoras mieloides e linfoides. Os progenitores linfoides, por sua vez, dão origem aos linfócitos T, B e células NK. As células que vão se diferenciar em linfócitos T (LT) deixam a medula óssea e migram para o timo, onde ocorre todo o processo de seleção e maturação. Apenas os linfócitos T maduros deixam o timo e caem na circulação. As células, que irão se diferenciar em linfócitos B, permanecem na medula óssea durante o processo de maturação. Após a conclusão da maturação, ela deixam a medula, entram na circulação e migram para os órgãos linfoides secundários (Delves et al., 2017;

Mesquita, 2000).

Linfócitos B são produzidos na medula óssea a partir de uma célula tronco precursora e passa por várias modificações que são descritas como: estágio pró-B; pré-B; linfócito B imaturo e em seguida migram para os órgãos linfoides onde se tornam maduras para agir na resposta imunológica (Delves et al., 2017; Mesquita et al., 2000).

Os linfócitos (Figura 5) são células que encontram-se distribuídas em todo o corpo, são de fácil obtenção e também apresentam reações frente a substâncias e agentes agressores. Por estas razões são bastante utilizadas em pesquisas que estudam reações citotóxicas e genotóxicas.

Figura 5 - Linfócito.



Fonte: Adaptado de Keohane et al., 2020.

2.5 RADIOPROTETORES

Radioprotetores são substâncias capazes de proteger ou minimizar o acúmulo de mutações genéticas antes ou no momento da exposição à radiação. Eles podem ser utilizados em pacientes em radioterapia ou naqueles que foram expostos a uma dose não letal de radiação, mas que é superior aos níveis normais. A frequência de mutação no DNA é dose dependente e tende a aumentar linearmente entre 0,1 e 5 Gy (Koukourakis, 2012; Samarth et al., 2017).

Dentre os radioprotetores, destacam-se os antioxidantes, que equilibram as espécies reativas de oxigênio geradas pelo desequilíbrio causado pelas radiações ionizantes (Aruoma, 1996; Montoro et al., 2011). Os antioxidantes retardam a oxidação de biomoléculas impedindo o início e a propagação de reações em cadeia, e, por fim, interferem na iniciação da apoptose (Arora et al., 2005).

As substâncias antioxidantes com efeito radioprotetor podem ser encontradas em fontes naturais, tais como extratos de plantas (polifenóis, flavonoides e taninos), vitaminas (A, C e E), enzimas (superóxido dismutase e glutathione peroxidase) que podem ser encontradas em frutas, vegetais, chás, café e cereais. Também existem substâncias sintéticas como a amifostina (WR-2721) (Dowlath et al., 2021; Škrovánková et al., 2012).

2.5.1 Radioprotetores Sintéticos e Naturais

Dentre os radioprotetores sintéticos, a amifostina é atualmente a única aprovada pela FDA (Food and Drug Administration, com tradução livre Administração de Alimentos e Medicamentos), mas sua aplicação é limitada para apenas usos/estudos clínicos (Seed, 2005). A amifostina é um pró-fármaco que contém tiol, e após ser desfosforilada, acumula-se preferencialmente nos rins e glândulas salivares, onde é metabolizada em sua forma ativa, WR-1065 (Brizel, 2007). Como todo fármaco, a amifostina apresenta efeitos adversos como vômito, náuseas, diarreia e hipotensão, e pode ser tóxica quando utilizada em níveis de doses citoprotetoras. Embora seu metabólito, WR-1065, acentue os danos genotóxicos causados por radiações ionizantes, ele pode não ser eficaz a longo prazo (Dowlath et al., 2021; Seed, 2005; Yun; Wang, 2017).

A procura por substâncias eficazes e não tóxicas com potencial para radioproteção tem despertado crescente interesse em antioxidantes naturais com propriedade de eliminação de radicais (Benkovic et al., 2008; Samarth et al., 2017). Além disso, outras características são importantes na busca do radioprotetor “ideal”, como proteger células normais sem proteger células tumorais, a proteção de diversos órgãos, facilidade de administração e estabilidade a longo prazo (Johnke et al., 2014).

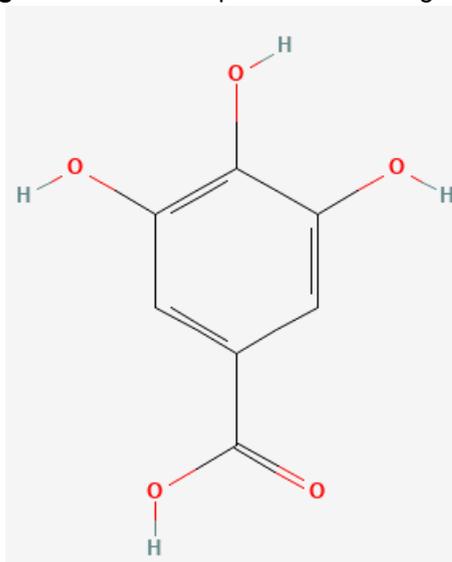
Extratos derivados de plantas podem ser bons candidatos a radioprotetores, pois são capazes de reduzir o estresse oxidativo induzidos por pró-oxidantes, aumentando a defesa antioxidante no organismo e prevenindo danos induzidos pela radiação (Yun; Wang, 2017). Os compostos fenólicos, que são os metabólitos secundários mais abundantes nas plantas, possuem um ou mais anéis aromáticos e grupos de hidroxilas que podem doar um átomo de hidrogênio ou um elétron para um radical livre, apresentando uma estrutura ideal para a atividade de sequestro

desses radicais. A estrutura química dos polifenóis influencia seus efeitos antioxidantes, assim como interações específicas no metabolismo do organismo. Um exemplo é o ácido gálico, derivado do ácido benzoico, que, por ser um monohidroxibenzoato pode ser um eficaz sequestrador de radicais hidroxila devido à sua propensão à hidroxilação e alta reatividade ao radical hidroxila (Škrovánková et al., 2012).

2.6 ÁCIDO GÁLICO

O ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico) é um cristal sólido, levemente amarelado e de baixo peso molecular. Sua estrutura (Figura 6) é uma molécula planar, com um anel aromático, três grupos hidroxila fenólicos e um grupo carboxila ácido. Os três grupos hidroxilas são ligados ao anel aromático em uma posição *orto* em relação um ao outro. É esse arranjo que determina a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos. O ácido gálico está abundantemente presente nas plantas em sua forma livre ou em seus derivados em diversos alimentos como nozes, chás e uvas (Badhani; Sharma; Nakkar, 2015; Fernandes; Salgado, 2016).

Figura 6- Estrutura química do ácido gálico.



Fonte: PUBMED, 2015. Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-Acid>

Estudos demonstram que o ácido gálico afeta diversas vias farmacológicas e bioquímicas, além de propriedades anti-inflamatórias, antimutagênicas e anticancerígenas. Seus derivados são utilizados como aditivos antioxidantes,

ajudando a preservar o sabor e os valores nutricionais dos alimentos, além de aumentar a vida útil de alimentos a base de lipídios, inibindo a peroxidação lipídica induzida por oxigênio (Silva et al., 2017; Verma et al., 2013).

No organismo, o ácido gálico é bem absorvido quando comparado a outros polifenóis, o que pode ser proveniente da degradação do ácido tânico e galatos no trato gastrointestinal. Os taninos hidrolisáveis são hidrolisados pelo pH ácido do estômago, liberando resíduos reativos do ácido gálico. Os galatos são primeiro hidrolisados em ácido gálico, que é posteriormente metalizado para formar 4-O-metilgálico como produto de biotransformação. O metabolismo dos derivados de éter mostra que o galato de octila e o galato de lauril são absorvidos e hidrolisados em menor extensão do que o galato de propila que é prontamente absorvido no trato gastrointestinal (Badhani et al., 2015).

Os galatos que são absorvidos no organismo passam por metabolização por meio de esterases intracelulares, o que resulta na geração de radicais livres e ativação da via intrínseca da apoptose (Silva et al., 2017). Estudos anteriores revelaram que o ácido gálico é mais eficaz no combate às células tumorais em comparação com células não tumorais. A maioria de pesquisas relacionadas às propriedades anticâncer do ácido gálico, estão ligadas a indução de apoptose por diferentes mecanismos, que variam conforme o tipo celular (Ko et al., 2022).

Pesquisas apresentaram que o ácido gálico potencializa atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase, concomitantemente reduzindo a concentração de espécies reativas de oxigênio em linfócitos sem qualquer alteração no total da atividade antioxidante. Também foi observado a redução de dano oxidativo ao DNA no fígado, linfócitos, cólon e pulmões, além de proteger esses órgãos da radiação gama (Choubey et al., 2018). Indicando que o ácido gálico se liga diretamente com radicais livres, levando à inativação e suprimindo a concentração intracelular de radicais livres (Vijaya et al., 2011).

Apesar dos resultados promissores nos estudos da sua ação na via da apoptose contra células tumorais, ainda há preocupações no aumento nas concentrações da forma pura do ácido gálico que podem levar à morte celular, pois apresenta atividade pró-oxidante após uma concentração limite. Por essa razão, é necessário estudos adicionais sobre a sua toxicidade (Joseph and Moka, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antioxidante, citotóxica e genotóxica do ácido gálico, frente a linfócitos humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a atividade antioxidante do ácido gálico frente aos linfócitos humanos;
- Verificar os efeitos citotóxicos do ácido gálico sobre os linfócitos humanos por meio do teste de viabilidade celular;
- Avaliar o potencial genotóxico do ácido gálico utilizando o ensaio cometa;
- Determinar qual a concentração de ácido gálico com baixa toxicidade e genotoxicidade frente a linfócitos humanos, para futura avaliação do seu potencial como radioprotetor.

4 METODOLOGIA

4.1 ÁCIDO GÁLICO

Para este trabalho foi utilizado o ácido gálico da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), com o propósito de utilizar uma substância pura, livre de contaminantes.

4.2 ENSAIO ANTIOXIDANTE

Para o teste de sequestro de radical livre foi realizada metodologia segundo Blois (1958) e Brand-Williams et al., 1995. Foi diluído 0,008 g do DPPH em 100 mL de metanol e após 30 minutos, foi realizada a leitura no ELISA no comprimento de onda de 517 nm e absorvância entre 0,600 a 0,700. O ácido gálico foi diluído a 1 mg/mL em metanol, e em seguida, feito a diluição seriada (1200, 600, 300, 150 e 75 µg/mL). Em um ambiente escuro, foi adicionado 40 µL em triplicata de cada concentração, distribuindo da menor concentração para a maior. Para os grupos controles, foram feitos três poços adicionando 40 µL de NaCl (controle negativo) e ácido ascórbico (controle positivo). Em seguida, foi adicionado 250 µL do reagente DPPH em todos os poços e foram aguardados 25 minutos em um ambiente escuro para leitura no ELISA na absorvância de 517 nm. O teste de sequestro de radical livre (SRL) foi calculado com:

$$SRL (\%) = \frac{(absorvância\ do\ controle - absorvância\ da\ amostra)}{absorvância\ do\ controle \times 100}$$

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Os experimentos in vitro com sangue humano foram realizados de acordo com os procedimentos julgados e aprovados pelo Comitê de Ética Humana do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CAAE 09186813.7.0000.5208 e do parecer consubstanciado 269.483 (Anexo A).

Foram coletados 4 ml de sangue periférico de cada indivíduo (n=6) que atenderam os critérios de inclusão do projeto, após a assinatura do termo de livre consentimento (Anexo B). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Radiobiologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco.

Foram utilizados tubos estéreis contendo heparina sódica em sistema a vácuo e todos os equipamentos de proteção individual (EPI). Em seguida, foi adicionado, dentro de uma capela de fluxo laminar, a solução de Phosphate Buffered Saline (PBS) e ácido gálico em 2 mL das amostras de sangue coletadas. Em seguida, foi depositado cuidadosamente com pipeta automática, 4 mL da mistura sobre 5 mL de Ficoll-Hypaque, e em seguida foram levadas para centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos. Por fim, coletou-se cuidadosamente a nuvem de linfócitos que se formou na interfase e estas foram transferidas para um tubo com solução salina. Foram ressuspensos 0,125 mL do sedimento celular em uma solução composta de 1 mL RPMI e 0,125 mL para o controle negativo, e para as demais 0,75 mL de RPMI, 0,25 mL ácido gálico e 0,125 mL, para que fossem feitas as análises citotóxica e genotóxica.

4.4 VIABILIDADE CELULAR

Para a realização do teste de viabilidade celular, foi utilizada uma adaptação do método padronizado por Louis e Siegel (2011) onde amostras de linfócitos de sangue humano (20 µL) foram misturados a uma solução azul de tripano (Gibco) a 0,04%, na proporção de 1:1, em um microtubo com capacidade para 1,5 mL (Eppendorf® LoBind microcentrifuge tubes). Em seguida, o volume de aproximadamente 10 µL da solução formada foi aplicada no hemocítmetro (Câmara de Neubauer Espelhada, Bright-Line). Após a adição das células a amostra permaneceu em repouso durante o intervalo de 2 minutos em temperatura ambiente (25 °C ± 2), para a célula interagir com o corante. Posteriormente, os linfócitos foram quantificados e analisados quanto ao número de células viáveis e inviáveis. A leitura na câmara de Neubauer foi realizada nos quatro quadrantes (A, B, C e D) destinados à contagem e avaliação das células. As células coradas foram classificadas como inviáveis e as células sem coloração foram identificadas como viáveis. Em seguida, a média das leituras dos quatro quadrantes foi multiplicada por 10^4 para obtenção do número de células por mL da amostra aplicada no hemocítmetro. Em seguida, o valor foi multiplicado por dois, referente a diluição de 1:1 da amostra com azul de tripano.

4.5 ENSAIO ALCALINO COMETA

O ensaio alcalino cometa foi realizado como descrito por Singh et al. (1988), com modificações. Linfócitos obtidos de sangue periférico humano foram avaliados quanto aos efeitos genotóxicos da radiação antes e após exposição às substâncias previamente selecionadas. Cerca de 100 µL de linfócitos obtidos de sangue periférico foram homogeneizados em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) (Sigma-aldrich) dissolvida em PBS (pH 7,4). Imediatamente, este homogenato foi colocado sobre uma lâmina de microscópio, previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%) (Sigma-Aldrich) dissolvida em PBS, (pH 7,4), coberto com lamínula e mantido a 4 °C (10 minutos). Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton-X 100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por 12 horas a 4 °C. Após o processo de lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução de tampão alcalino, pH 13,0 (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM), por 20 minutos.

A eletroforese ocorreu com os seguintes padrões 0,74 V/cm e 300 mA, a 4 °C por 20 minutos. Ao final da corrida eletroforética, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) por 15 minutos e fixadas com álcool absoluto por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 30 µL de uma solução de SYBR safe (Invitrogen) (1:500) e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) em aumento de 400x, com um filtro de excitação de 450-490 nm, filtro de emissão de 500-550 nm e um filtro de barreira de 495 nm. Foram analisadas 100 células por grupo experimental. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A análise visual dos danos ao DNA foi realizada de acordo com a metodologia padronizada no Laboratório de Radiobiologia segundo Collins et al. (2014), onde os nucleóides foram divididos em 5 categorias de dano ao DNA (0 – 4). A categoria 0 indica que não ocorreu danos, as categorias de 1 a 4 indicam danos em níveis crescentes sobre o material genético. Para avaliar o grau de dano ao DNA, foi utilizado o Índice de Dano (ID) como parâmetro. O ID foi calculado de acordo com a equação 1:

$$ID = 0 \times (n0) + 1 \times (n1) + 2 \times (n2) + 3 \times (n3) + 4 \times (n4) \quad (1)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO ÁCIDO GÁLICO

Na Tabela 1 é possível observar o resultado do teste antioxidante realizado por meio do método DPPH, após diferentes concentrações utilizando como controle positivo o ácido ascórbico.

Tabela 1 - Atividade antioxidante do ácido gálico pelo método DPPH.

Concentração (µg/mL)	Ácido gálico (%)	Ácido ascórbico (%)
1200	85,80	70,87
600	80,08	41,40
300	50,78	26,00
150	29,00	23,31

Fonte: A autora (2024).

Na avaliação de potencial antioxidante, observou-se que o ácido gálico apresentou potencial antioxidante em todas as concentrações quando comparado ao ácido ascórbico, em especial, a concentração de 600 µg/mL que apresentou o dobro do potencial do controle. Estudo realizado por Jankovic et al. (2008) com compostos polifenólicos da planta *Gentianella austriaca*, observaram que um dos compostos analisados apresentou capacidade antioxidante de 82,05%. Yen et al. (2002) também observaram a capacidade antioxidante do ácido gálico na faixa de 0-0,02 mM, o efeito de sequestro cresceu de acordo com o aumento da concentração. Os autores também sugeriram que a capacidade antioxidante em altas concentrações ocorreu devido ao sequestro de radicais livres mais do que sua capacidade de doar hidrogênio, dados semelhantes ao encontrado no presente estudo. Portanto, pode-se sugerir que a amostra de ácido gálico poderá ser utilizada para os testes radioprotetores.

O ensaio de viabilidade celular demonstrou que o ácido gálico não apresenta

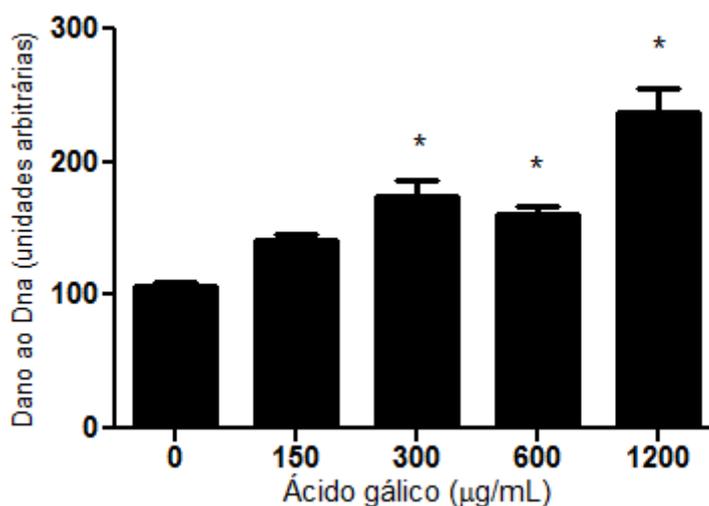
toxicidade celular para as concentrações testadas (1200, 600, 300, 150 e 75 $\mu\text{g/mL}$), pois os dados apresentaram 99% de viabilidade das células linfocitárias expostas.

5.2 ATIVIDADE GENOTÓXICA DO ÁCIDO GÁLICO

Para a avaliação genotóxica, foi realizado ensaio cometa, que analisa alterações no DNA de forma rápida, minimamente invasiva e sensível. Estas alterações foram classificadas em cinco categorias segundo Collins et al. (2014) com base no comprimento da cauda do cometa.

Os resultados do ensaio podem ser visualizados na Figura 7, onde observa-se que a concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ do ácido gálico apresentou a menor índice de genotoxicidade, ou seja, ao analisar o índice de dano observa-se que a concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ apresentou um valor de ID= 139,94 não diferindo significativamente do grupo controle. As concentrações de 300, 600 e 1200 $\mu\text{g/mL}$ causaram danos significativos quando comparados ao grupo controle

Figura 7 - Índices de dano ao DNA.

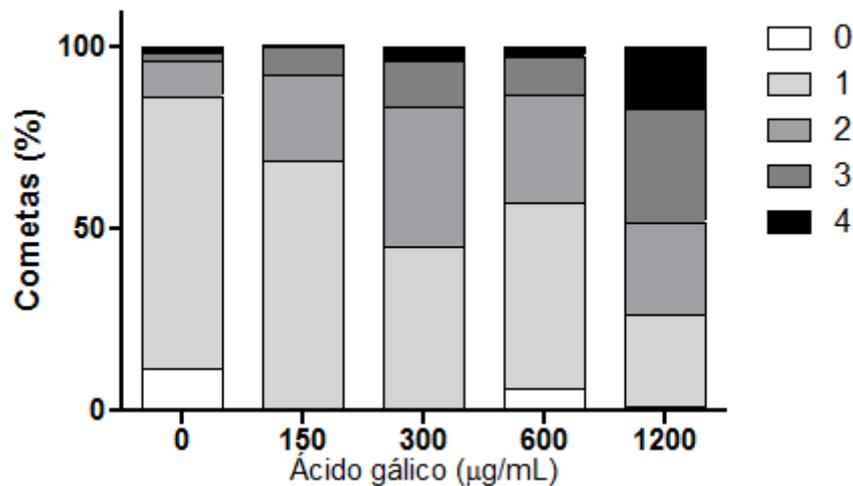


Estudos realizados por Wu et al. (2004) com exposição dos ácidos tânico e gálico na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre linfócitos não apresentaram danos significativos em seu DNA quando comparado ao controle. Este trabalho também demonstrou que antioxidantes podem induzir danos genotóxicos em células humanas quando aplicadas em altas concentrações. Dados semelhantes aos

encontrados neste estudo em que a concentração de 150 µg/mL foi a que apresentou menor dano ao DNA dos linfócitos expostos.

Na figura 8, pode-se observar a frequência dos diferentes níveis de danos ao DNA dos linfócitos expostos às diferentes concentrações de ácido gálico.

Figura 8 -Percentual de dano ao DNA em níveis por concentração.



Observa-se que o nível de danos 4 aumenta com o aumento da concentração de ácido gálico. A concentração de 150 apresenta a menor genotoxicidade como demonstrado no gráfico de índice de danos na figura 7. Embora a concentração de 1200 µg/mL de ácido gálico tenha apresentado melhor atividade antioxidante e viabilidade celular de aproximadamente 99%, esta concentração apresentou alta genotoxicidade e uma maior quantidade de danos 3 e 4 ao DNA. Ainda segundo Wu et al. (2004) os testes de citotoxicidade avaliam a integridade celular, mas a substância pode penetrar a membrana biológica sem causar danos e atingir o DNA causando genotoxicidade. Estes relatos são semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto foi observado:

- O ácido gálico não apresentou atividade tóxica aos linfócitos humanos;
- Todas as concentrações utilizadas no teste de captação de DPPH apresentaram atividade antioxidante;
- Na avaliação de genotoxicidade, a concentração de 150 µg/mL foi a que apresentou a menor genotoxicidade sobre os linfócitos e poderá ser utilizada para estudos sobre a atividade radioprotetora do ácido gálico.

REFERÊNCIAS

- ARORA, R. et al. Radioprotection by plant products: present status and future prospects. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–22, 2005.
- ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radical Biology and Medicine**., v. 20, n. 5, p. 675-705, 1996.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015.
- BENKOVIĆ, V. et al. Evaluation of the Radioprotective Effects of Propolis and Flavonoids in Gamma-Irradiated Mice: The Alkaline Comet Assay Study. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 167–172, 2008.
- BITELLI, Thomaz. **Física e dosimetria das radiações**. 2ª edição. [s./l]: Atheneu, 2006.
- BLOIS, M. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, [s./l.], v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRIZEL, D. M. Pharmacologic Approaches to Radiation Protection. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 25, n. 26, p. 4084–4089, 2007.
- CHOUBEY, S. et. al. Probing Gallic Acid for Its Broad Spectrum Applications. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 15, p. 1283–1293, 2018.
- COLLINS, Andrew et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 759, p. 27-39, 2014.

COLLINS, Andrew et al. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nat Protoc.** 2023 Mar;18(3):929-989. doi: 10.1038/s41596-022-00754-y. Epub 2023 Jan 27.

DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. **Fundamentos de Imunologia**. 12ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

DIMOVA, E. G.; BRYANT, P. E.; CHANKOVA, S. G. Adaptive response: some underlying mechanisms and open questions. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 396–408, 2008.

DOWLATH, M. J. H. *et al.* Effects of radiation and role of plants in radioprotection: A critical review. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 779, p. 146431, 2021.

DUGGAL, V., SHARMA, S., MEHRA, R. Radon levels in drinking water of Fatehabad district of Haryana, India. **Elsevier**, v. 123, p 36-40. 2017.

DUNKENBERGUER L, Reiss K., Del Valle L. Comet Assay for the Detection of Single and Double-Strand DNA Breaks. *Methods Mol Biol.* 2022;2422:263-269. doi: 10.1007/978-1-0716-1948-3_18. PMID: 34859412.

Electromagnetic Spectrum. Fonte: National Institute of Cancer (NIC). Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/radiation/electromagnetic-fields-fact-sheet>. Acesso em: 24 set. 2024.

FENECH, Michael et al. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 786, p. 108342, 2020.

FERNANDES, F. H. A.; SALGADO, H. R. N. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 257–265, 2016.

Gallic Acid. Fonte: PUBMED. Disponível em: [Gallic Acid | C7H6O5 | CID 370 - PubChem](#). Acesso em: 19 set. 2024.

JANKOVIĆ, Teodora et al. Radioprotective effects of *Gentianella austriaca* fractions and polyphenolic constituents in human lymphocytes. **Planta medica**, v. 74, n. 07, p. 736-740, 2008.

JOHNKE, R. M.; SATTLER, J. A.; ALLISON, R. R. Radioprotective Agents for Radiation Therapy: Future Trends. **Future Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 15, p. 2345–2357, 2014.

JOSEPH, N. T.; MOKA, R. EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF GALLIC ACID AGAINST ARSENIC-INDUCED GENOTOXICITY IN HEPG2 CELL LINE. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [s. l.], p. 98–103, 2020.

KO, E.-B. *et al.* Gallic Acid Hindered Lung Cancer Progression by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells via PI3K/Akt Pathway. **Biomolecules & Therapeutics**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 151–161, 2022.

KOIDE, K.; OSMAN, S.; GARNER, A. L.; SONA, F.; DIXON, T.; GREENBERGER, J. S.; EPPERLY, M. E. The use of 3,5,4'-tri-O-acetylresveratrol as a potential pro-drug for resveratrol protects mice from γ -irradiation-induced death. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 270-274, 2011.

KOUKOURAKIS, M. I. Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine. **The British Journal of Radiology**, [s. l.], v. 85, n. 1012, p. 313–330, 2012.

LAGUERRE, Mickaël; LECOMTE, Jérôme; VILLENEUVE, Pierre. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in lipid research**, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.

LIMA, G. F.; Identificação de elementos traços e biomonitoração de danos genotóxicos na população exposta ao óleo contaminante no litoral pernambucano. **Dissertação de mestrado. PROTEN**. Recife, 2023.

LOUIS, Kristine S.; SIEGEL, Andre C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. **Mammalian cell viability: methods and protocols**, p. 7-12, 2011.

MESQUITA, D. Júniorl et al. Sistema imunitário - parte II. fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Med Esporte* 6 (5). Out 2000.

MONTORO, A.; BARQUINERO, J. F.; ALMONACID, M.; MONTONO, A.; SEBASTIÀ, N.; VERDÚ, G.; SAHUQUILLO, V.; SERRANO, J.; SAIZ, M.; VILLAESCUSA, J. I.; SORIANO, J. M. Concentration-dependent protection by ethanol extract of propolis against γ -ray induced chromosome damage in human blood lymphocytes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, 2011.

MOREIRA. Radiobiologia e Radioprotecção. **Dissertação de mestrado.** Universidade da Beira Interior. Covilhã, 2011.

NENOI, M.; WANG, B.; VARES, G. In vivo radioadaptive response: a review of studies relevant to radiation-induced cancer risk. **Human & experimental toxicology**, v. 34, n. 3, p. 272-283, 2015.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**, [s. l.], v. 27, n. 77, p. 185–200, 2013.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. Física das Radiações. Oficina Textos. São Paulo. 2010.

PAINULI, S.; KUMAR, N. Prospects in the development of natural radioprotective therapeutics with anti-cancer properties from the plants of Uttarakhand region of India. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine.**, v. 7, p. 62-68, 2016.

PIERCE, B. A. **Genética: um enfoque conceitual.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. XXVI, 774 p.

SAMARTH, R. et al., The Effects of Ioninz and Non-Ionizing Radiation on Health. *In*: KUMAR, M.; TIWARI, R. R. **Recent Trends and Advances in Environmental Health.** [s. l.]: Nova Sciences, 2019. p. 179-205.

SAMARTH, R. M.; SAMARTH, M.; MATSUMOTO, Y. Medicinally Important Aromatic Plants With Radioprotective Activity. **Future Science OA**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. FSO247, 2017.

SEED, T. M. RADIATION PROTECTANTS: CURRENT STATUS AND FUTURE PROSPECTS. [s. l.], v. 89, n. 5, p. 531-545, 2005.

SILVA, I. C. *et al.* Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 105, p. 300–307, 2017.

SINGH, R. J.; HYMOWITZ, T. The genomic relationship between *Glycine max* (L.) Merr. and *G. soja* Sieb. and Zucc. as revealed by pachytene chromosome analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, n. 5, p. 705-711, 1988.

SIQUEIRA, W. N. D. ESTUDO DO EFEITO RADIOPROTETOR DO FLAVONÓIDE QUERCETINA SOBRE LINFÓCITOS HUMANOS. **Dissertação de mestrado. PROTEN**. Recife, 2013.

ŠKROVÁNKOVÁ, S.; MIŠURCOVÁ, L.; MACHŮ, L. Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *In*: **ADVANCES IN FOOD AND NUTRITION RESEARCH**. [S. l.]: Elsevier, 2012. v. 67, p. 75–139. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123945983000034>. Acesso em: 29 ago. 2024.

SOWA, P. *et al.* Ionizing and non-ionizing electromagnetic radiation in modern medicine. **Polish Annals of Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 134–138, 2012.

SOWA, P. *et al.* Ionizing and non-ionizing electromagnetic radiation in modern medicine. **Polish Annals of Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 134–138, 2012.

TAUHATA, L. *et al.* RADIOPROTEÇÃO E DOSIMETRIA: FUNDAMENTOS. 9ª revisão. Rio de Janeiro: IRD/CNEN, 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/cnen/pt-br/aceso-rapido/centro-de-informacoes-nucleares/materiais-didaticos-1/radioprotecao-e-dosimetria-fundamentos.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2024.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 473–485, 2013.

VIJAYA PADMA, V. *et al.* Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 991–998, 2011.

WU, L. T. et al. Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 556, n. 1-2, p. 75-82, 2004.

YEN, Gow-Chin; DUH, Pin-Der; TSAI, Hui-Ling. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food chemistry**, v. 79, n. 3, p. 307-313, 2002.

YUN, K.-L.; WANG, Z. Y. Target/signalling pathways of natural plant-derived radioprotective agents from treatment to potential candidates: A reverse thought on anti-tumour drugs. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 91, p. 1122–1151, 2017.

ZANONI, M; CORTESI, M; ZAMAGNI, A; TESEI, A. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Radiation-Induced Lung Fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 3876, 2019.

ZIESSMAN H.A, O'MALLEY J.P, THRALL. **Nuclear Medicine, The Requisites**. 4^a Edição. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014.

ANEXO A**Cópia do Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética Humana**

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Avaliação do potencial radioprotetor e radiomitigador de extratos de origem vegetal	
Pesquisador Responsável: Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo	
Área Temática:	
Versão: 2	
CAAE: 87578218.0.0000.5208	
Submetido em: 28/09/2018	
Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE	
Situação da Versão do Projeto: Aprovado	
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável	
Patrocinador Principal: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE	
	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1112606	

ANEXO B

Cópia do Termo de Livre consentimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Para maiores de 18 anos ou emancipados)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa intitulada: **Avaliação do potencial radioprotetor e radomitigador de extratos de origem vegetal**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo, residente na rua Condura, 26, Apipucos, CEP: 52.071-131; telefone: 81-991394775; e-mail: amdemelo@hotmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Gabrielly Christynne Nascimento Sales (Telefone para contato: 81-984227913) & Larissa Silva de Azevedo Melo (Telefones para contato: (81- 985912635) e está sob a orientação de: Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo Telefone: (81-991394775), e-mail: amdemelo@hotmail.com.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos **forem dados** e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O trabalho tem como objetivo avaliar o impacto protetor ou atenuador dos extratos brutos de vegetais selecionados e suas frações de *Schinus terebinthifolius* (aroeira) e *Anadenanthera colubrina* (angico) sobre linfócitos humanos expostos a radiação gama de ⁶⁰CO.

Será coletada apenas uma vez, amostra de sangue venoso (35ml), no braço de três indivíduos voluntários selecionados para o estudo. Este procedimento será realizado no Laboratório de Radiobiologia localizado no Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco utilizando tubos estéreis contendo heparina sódica, em sistema a vácuo e será realizada por um profissional habilitado e com certificado do curso de flebotomia (coleta de sangue por punção venosa).

O voluntário selecionado será submetido a uma coleta que seguirá as recomendações de segurança do padrão internacional ISO 6710 e receberá toda orientação sobre como proceder durante e após a coleta. Os riscos podem ser representados pelo aparecimento de uma pequena mancha roxa no local da coleta (hematoma), pequeno sangramento, dor (varia de acordo com a sensibilidade de cada indivíduo), e mais, raramente, pode ocorrer desmaio. Esses eventos podem ser solucionados com práticas simples como, por exemplo, aplicar leve pressão sobre o local da punção para evitar a formação de hematomas e sangramentos (o uso de compressa de gelo se faz necessário caso haja formação de hematoma). Este estudo não traz benefícios diretos para o voluntário participante. E como benefício indireto, irá contribuir para o desenvolvimento de uma nova substância radioprotetora que tendo seu efeito comprovado, proporcionará melhor qualidade de vida aos indivíduos que, de alguma forma, são expostos a altas doses de radiação.

Os resultados desta pesquisa serão divulgados em eventos e/ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, **sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação**. Os dados coletados ficarão armazenados em pastas de arquivo no computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período de cinco anos.

Salientando que não haverá nenhuma forma de pagamento pela participação e que é de direito do voluntário a retirada do consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo sem nenhum tipo de prejuízo. Como a aceitação é voluntária, fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo: **Avaliação do potencial radioprotetor e radiomitigador de extratos de origem vegetal**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa

e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

Impressão
(opcional)