



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências - CB

ANDREZA LIMA LOURENÇO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E
GENOTÓXICO DO EXTRATO SALINO DA SEMENTE DA
MORINGA OLEÍFERA LAM. COMO POTENCIAL
RADIOPROTETOR**

Recife
2025

ANDREZA LIMA LOURENÇO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E
GENOTÓXICO DO EXTRATO SALINO DA SEMENTE DA
MORINGA OLEÍFERA LAM. COMO POTENCIAL
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.

Orientador(a): Dra. Osana Diniz Ferreira
Coorientador(a): Prof^a Dra. Ana Maria
Mendonça de Albuquerque de Melo

Recife
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Andreza Lima Lourenço da.

Avaliação do perfil antioxidante, citotóxico e genotóxico do extrato salino da semente da Moringa oleífera Lam. como potencial radioprotetor / Andreza Lima Lourenço da Silva. - Recife, 2025.

53 p. : il., tab.

Orientador(a): Osana Diniz Ferreira

Coorientador(a): Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências, anexos.

1. Radiação ionizante. 2. Radiomodificador. 3. Acácia-branca. 4. Ensaio Cometa. 5. Produtos naturais. I. Ferreira, Osana Diniz. (Orientação). II. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

ANDREZA LIMA LOURENÇO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E
GENOTÓXICO DO EXTRATO SALINO DA SEMENTE DA MORINGA
OLEÍFERA LAM. COMO POTENCIAL 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: 28 / 02 / 2025.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Osana Diniz Ferreira
CRCN-NE / Departamento de Dosimetria Biológica

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

Dr. José Luís Ferreira Sá
UFPE/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Me. Thierry Wesley de Albuquerque Aguiar
UFPE/ Departamento de Bioquímica e Fisiologia

Dedico este trabalho à minha família pelo incentivo durante todo o processo, ao meu cachorro Bash e ao meu grande amigo Marcos (*in memoriam*) que me motiva e me protege de onde estiver.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que guiou todos os meus passos nessa grande e intensa jornada, me permitiu ter saúde física e mental para alcançar todos os meus objetivos e me permitiu ultrapassar todos os obstáculos encontrados na realização deste trabalho sem desanimar.

Agradeço aos meus pais, Dema e Valéria, que sempre acreditaram no meu potencial e nunca me deixaram desistir, que entenderam a minha ausência durante a graduação e sempre me deram apoio em tudo que me propus a fazer.

Te agradeço, mãe, pelos abraços nas madrugadas que eu quis chorar e pelas comidinhas deliciosas que me acalentaram enquanto eu passava horas estudando e a você, pai, obrigada por me ensinar a acreditar mais em mim e por me passar os seus incriveis “poderes do amor”, vocês são os melhores.

Agradeço ao meu grande amigo Marcos, que sempre destacou a importância dos estudos, que se fez presente por todo momento que convivemos, que me amou e me cuidou como filha que considerava e que olha por mim de onde quer que esteja.

Agradeço à minha irmã, Amanda, por me confortar nos dias que me sentia culpada por não dar conta e por comemorar todas as minhas vitórias durante essa jornada.

Agradeço aos meus tios, Tia Sheyla e Tio Xande, Tia Lila e Tio Nino, por serem meu ponto de apoio e por me lembrarem todos os dias do meu potencial.

Agradeço aos meus compadres, Márcio e Rafa, pelo presente de ser madrinha do príncipe Matheus e por serem o meu lugar de paz quando tenho dias estressantes.

Agradeço às minhas avós, Fia e Ademita, por acreditarem em mim e serem as minhas maiores inspirações.

Agradeço ao meu cachorrinho Bash, que me pediu carinho e me tirou para brincar todas as vezes que senti a minha angústia.

Agradeço às minhas amigas, Karine e Thaynara, que fazem parte dessa grande loucura chamada faculdade e que me fizeram dar risadas de todas as situações difíceis que passamos juntas. Por todas as dancinhas no banheiro da biofísica, por todas as vezes que apelidamos alguém e por me fazerem levantar todos os dias e ter certeza de que o dia será bom.

Agradeço à minha melhor amiga, Biela, por acompanhar todos os meus passos, por crescer comigo, sofrer comigo e vibrar comigo e, principalmente, por me dar a certeza de que nunca estarei sozinha.

Agradeço às minhas amigas do grupinho 6/6, Duda, Darlly, Brenda, Cecília e Gabi, pelas mesmas fofocas das mesmas pessoas todas as vezes que nos encontramos.

Agradeço aos meus amigos do grupo Panelinha, Karine, Thaynara, Osaninha, Thierry, Delson, Xuão 1 e Xuão 2, com quem convivi intensamente durante estes anos, pelo companheirismo, pelo karaokê nas melhores confraternizações e, principalmente, pelas boas risadas.

Agradeço às minhas orientadoras, Osana Diniz e Ana Maria Mendonça, por todos os ensinamentos e correções durante o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência e por servirem de inspiração profissional para mim.

Agradeço aos membros da banca, Thierry Wesley e José Luís, por terem aceitado o convite para participar desse momento especial.

Agradeço ao CRCN-NE, CNEN, CNPq, UFPE e ao laboratório de Radiobiologia pelo incentivo à pesquisa e realização deste trabalho.

*“Eu não sei por quanta coisa vou
passar
Tudo bem, mesmo se for pra chorar
Se eu cair, levanto disposto a seguir,
reagir!
Eu não vou parar, nunca vou me
entregar” (...)*

(José Augusto)

SILVA, Andreza Lima Lourenço. **Avaliação do perfil antioxidante, citotóxico e genotóxico do extrato salino da semente da *Moringa oleífera* Lam. como potencial radioprotetor.** 2025. 53. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

Substâncias consideradas radioprotetoras, em sua maioria sintéticas, são utilizadas pela medicina nuclear por exercer a função de minimizar os efeitos deletérios oriundos da exposição excessiva à radiação ionizante (RI). A Amifostina, WR-2721, é o único radioprotetor aprovado para uso clínico pelo FDA (Food and Drug Administration) atualmente. Porém, por ser uma pró-droga de origem sintética, apresenta desvantagens em relação ao seu uso, pela alta toxicidade, alto custo, proteção limitada de órgãos e efeitos colaterais, como hipotensão, náusea e vômito, mesmo quando administrada em concentrações mais baixas. Diante disso, cresce cada vez mais a procura por novos agentes radiomodificadores de origem natural, como os antioxidantes, que são capazes de eliminar os radicais livres ou evitar a sua formação. Nesse contexto, a *Moringa oleífera* Lam., popularmente conhecida como acácia-branca, se destaca por possuir elevada atividade biológica, como anti-inflamatória e imunomoduladora, bem como, fitocomponentes antioxidantes presentes em todas as suas estruturas, como vitaminas e beta-carotenos. Considerando esses aspectos, é possível inferir que o extrato salino da semente da *Moringa oleífera* Lam. apresenta-se como alternativa promissora à antioxidante e, potencialmente, radioprotetor, radiomitigador e/ou imunomodulador. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito radioprotetor do extrato salino obtido da semente da *M. oleífera* Lam. pela avaliação da ação antioxidante, citotóxica e genotóxica. O extrato salino da *M. oleífera*, foi obtido após etapas de trituração, diluição, diálise e liofilização das sementes da planta. Os experimentos com sangue humano seguiram de acordo com os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética Humana do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, CAAE: 09186813.7.0000.5208. Para o teste da capacidade antioxidante foi utilizado o método de captura dos radicais DPPH e ABTS avaliados por espectrofotômetro. A citotoxicidade foi realizada pelo ensaio MTT com o *Cell Proliferation Kit* seguindo as recomendações do fabricante. A análise do efeito radioprotetor foi testada por meio do Ensaio Cometa em grupos amostrais submetidos à dose de 2,5Gy. Os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados demonstraram baixa atividade antioxidante nas concentrações testadas para o DPPH (<12%). Para a testagem do ABTS não foi quantificada atividade antioxidante. O extrato salino não apresentou citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) pelo teste MTT, visto que manteve a viabilidade celular acima de 95% nas concentrações testadas. Embora não tenha apresentado toxicidade à célula, pela análise do ensaio cometa alcalino, o uso do extrato não apresentou diferenças significativas para comprovação do seu efeito radioprotetor e genotóxico em PBMCs na dose de 2,5Gy.

Palavras-chave: Radiação ionizante. Radiomodificador. Acácia-branca. Ensaio Cometa. Produtos naturais

SILVA, Andreza Lima Lourenço. **Evaluation of the antioxidant, cytotoxic and genotoxic profile of the saline extract of the seed of *Moringa oleífera* Lam. as a potential radioprotector.** 2025. 53. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

Substances considered radioprotective, most of which are synthetic, are used in nuclear medicine to minimize the harmful effects of excessive exposure to ionizing radiation (IR). Amifostine, WR-2721, is the only radioprotector currently approved for clinical use by the FDA (Food and Drug Administration). However, as it is a pro-drug of synthetic origin, it has disadvantages in relation to its use, due to its high toxicity, high cost, limited organ protection and side effects such as hypotension, nausea and vomiting, even when administered in lower concentrations. In view of this, there is an increasing search for new radiomodifying agents of natural origin, such as antioxidants, which are capable of eliminating free radicals or preventing their formation. In this context, *Moringa oleífera* Lam, popularly known as “Acácia-branca”, stands out for having high biological activity, such as anti-inflammatory and immunomodulatory, as well as antioxidant phytocomponents present in all its structures, such as vitamins and beta-carotenes. Considering these aspects, it is possible to infer that the saline extract of *Moringa oleífera* Lam. seeds is a promising alternative antioxidant and potentially a radioprotector, radiomitigator and/or immunomodulator. The aim of this study was to determine the radioprotective effect of the saline extract obtained from the seeds of *M. oleífera* Lam. by evaluating its antioxidant, cytotoxic and genotoxic effects. The saline extract of *M. oleífera* was obtained after crushing, diluting, dialyzing and freeze-drying the seeds of the plant. The experiments with human blood were carried out in accordance with the procedures approved by the Human Ethics Committee of the Centro de Ciências da Saúde of the Universidade Federal de Pernambuco, CAAE: 09186813.7.0000.5208. To test the antioxidant capacity, the DPPH and ABTS radical capture methods were used, evaluated by spectrophotometer. Cytotoxicity was measured using the MTT test with the Cell Proliferation Kit, following the manufacturer's recommendations. The radioprotective effect was tested using the Comet Assay on sample groups submitted to a dose of 2.5Gy. The results obtained from the tests carried out showed low antioxidant activity at the concentrations tested for DPPH (<12%). No antioxidant activity was quantified for the ABTS test. The saline extract showed no cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using the MTT test, as it maintained cell viability above 95% at the concentrations tested. Although the alkaline comet assay showed no toxicity to the cell, the use of the extract showed no significant differences in proving its radioprotective and genotoxic effect on PBMCs at a dose of 2.5Gy.

Key words: Ionizing radiation. Radiomodulator. Acácia-branca. Comet assay. Natural products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Poder de penetração das diferentes partículas emissoras de RI	18
Figura 2 – Efeito direto e indireto da radiação ionizante	19
Figura 3 – Mecanismo de radioproteção de origem vegetal	22
Figura 4 – Aspectos físicos característicos da <i>Moringa oleífera</i> Lam.	23
Figura 5 – Mecanismo de eliminação do DPPH por um antioxidante	25
Figura 6 – Mecanismo de eliminação do ABTS por um antioxidante	26
Figura 7 – Ensaio cometa por microscopia de fluorescência	27
Figura 8 – Esquema de incubação com DPPH	30
Figura 9 – Esquema de incubação com ABTS	31
Figura 10 – Esquema de incubação para ensaio citotóxico	33
Figura 11 – Verificação visual da não viragem do meio reacional no ensaio DPPH com o extrato salino	37
Figura 12 – Verificação visual da não viragem do meio reacional no ensaio ABTS com o extrato salino	37
Figura 13 – Viabilidade celular pelo ensaio MTT em células <i>PBMC</i>	38
Figura 14 – Análise microscópica dos cometas tratados com extrato salino	39
Figura 15 – Frequência de cometas (%) em <i>PBMCs</i>	40
Figura 16 – Índice de danos em <i>PBMCs</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de inibição (I%) dos radicais DPPH e ABTS pelo extrato salino de sementes da *Moringa oleífera* Lam. 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
•O ₂ ⁻	Radical Superóxido
ABTS	Radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de Variância
BioProt	Laboratório de Bioquímica de Proteínas
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CB	Centro de Biociências
CBMN	Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese
CENAPESQ	Centro de Apoio à Pesquisa
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CRCN/NE	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
DEN	Departamento de Energia Nuclear
DL	Dose Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
DPPH	Radical 2,2-difenil 1-picrilhidrazil
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>et al.</i>	Entre outros
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gy	Gray
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
I%	Índice de Inibição
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
IC ₅₀	Concentração Inibitória Mínima para inibir 50%
ID	Índice de Danos
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de Potássio
LBD	Laboratório de Dosimetria Biológica
LET	Transferência Linear de Energia

Log	Logaritmo
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MTT	((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)) -2,5-difenil brometo de tetrazolina))
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSMS	Oléo Essencial de <i>Myrcia sylvatica</i>
PBMC	Peripheral Blood mononuclear cell
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	Potencial hidrogeniônico
R ²	Coeficiente de Determinação
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
TV	Televisão
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
WEMoS	Water Extract of <i>Moringa oleifera</i> seeds
WR-2721	Amifostina
WSMoL	Water-soluble <i>M. oleifera</i> seed lectin
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	RADIAÇÃO IONIZANTE	18
2.1.1	Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante e Sistemas de Reparo do DNA	19
2.2	RADIOPROTETORES	20
2.2.1	Radioprotetores Sintéticos e Naturais	21
2.3	<i>MORINGA OLEÍFERA</i> LAM.: ACÁCIA-BRANCA BRASILEIRA	22
2.4	ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	24
2.4.1	DPPH (radical 2,2-difenil 1-picrilhidrazil)	24
2.4.2	ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))	25
2.5	ENSAIO COMETA ALCALINO	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	COMITÊ/COMISSÃO DE ÉTICA	29
4.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO SALINO	29
4.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	30
4.3.1	DPPH (radical 2,2-difenil 1-picrilhidrazil)	30
4.3.2	ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))	31
4.4	SELEÇÃO DE DOADOR E COLETA DE AMOSTRAS	32
4.5	ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS	32
4.6	VIABILIDADE CELULAR	32
4.7	ENSAIO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i>	33
4.7.1	Teste MTT (((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)) -2,5-difenil brometo de tetrazolina))	33
4.8	ENSAIO GENOTÓXICO <i>IN VITRO</i>	34
4.8.1	Separação de grupos amostrais e irradiação das amostras	34
4.8.2	Ensaio Cometa Alcalino	34
4.8.3	Análise Microscópica	35
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	EFEITO ANTIOXIDANTE	36
5.2	EFEITO CITOTÓXICO	38
5.3	EFEITO RADIOPROTETOR	39
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS	50
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE	

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a radiação ionizante (RI) tem grande destaque na indústria, na agricultura e na medicina. A indústria utiliza deste tipo de radiação, desde a produção de energia elétrica à realização de ensaios não-destrutivos, modificações de materiais poliméricos e esterilização de materiais médicos e cirúrgicos, bem como, a conservação dos alimentos que visa reduzir microrganismos patogênicos que possam inviabilizar o consumo (GONZAGA, 2023). Na agricultura, destaca-se a irradiação de alimentos, recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). A radiação ionizante, nesse caso, é utilizada para substituir produtos químicos poluentes no controle de pragas nas lavouras, como também, na eliminação de parasitas, fungos, larvas de insetos e bactérias que poderiam causar doenças aos consumidores (ARBOITTE; CLAUS, 2024).

Na medicina nuclear, o diagnóstico por imagem baseado na emissão de radiação ionizante e a terapia radioisotópica, se destaca na prevenção, rastreamento e tratamento de pacientes com o câncer, contribuindo para a qualidade de vida destes além de, permitir a aquisição de imagens morfofuncionais de órgãos e tecidos (KUMAR *et al.*, 2019).

Apesar dos seus benefícios, a exposição a esse tipo de energia pode causar efeitos adversos. É sabido que, os efeitos deletérios da radiação podem se apresentar tanto à nível celular ou molecular, devido ao dano na molécula de DNA, gerando mutações e alterações cromossômicas, quanto à nível tecidual, no qual as lesões dos tecidos variam de acordo com a dose/tipo de radiação, o tempo da exposição, e a parte do corpo que foi exposta. Assim, os sintomas podem ser locais ou sistêmicos, como, por exemplo, radiodermites (que se manifestam como queimaduras superficiais), e a síndrome aguda da radiação (que acomete, o sistema gastrointestinal, hematopoiético e sistema nervoso), respectivamente (SIQUEIRA *et al.*, 2018; DAINIAK; ALBANESE, 2022).

Diante destes fatos, os agentes radiomitigadores e radioprotetores são necessários para a proteção do sistema biológico antes ou após exposição à radiação ionizante (FISCHER; SEO; EFFERTH, 2018). Os radiomitigadores são moléculas que têm a finalidade de atenuar os efeitos causados pelas radiações ionizantes após a exposição. As substâncias radioprotetoras, por sua vez, são moléculas administradas antes ou no momento da exposição, a fim de proteger as células circunvizinhas sadias

(OBRADOR *et al.*, 2020).

Os radioprotetores podem atuar de maneira indireta, por meio de proteínas efetoras que reparam o DNA em casos de quebra da fita, ou diretamente, pelo sequestro dos radicais livres formados a partir da interação da RI com a matéria biológica (MUN *et al.*, 2018; DUTTA; WANDEKAR; ROY, 2021). Atualmente a Amifostina, WR-2721, é o único radioprotetor aprovado para uso clínico pelo FDA (Food and Drug Administration). Porém, por ser uma pró-droga de origem sintética, apresenta desvantagens em relação ao seu uso, pela alta toxicidade, alto custo, proteção limitada de órgãos e efeitos colaterais, como hipotensão, náusea e vômito (ZHANG *et al.*, 2022; HIDETOSHI SATOH *et al.*, 2022).

Uma grande variedade de substâncias consideradas antioxidantes, possuem potencial radioprotetor, a exemplo: vitaminas, flavonoides, carotenoides, licopenos e derivados, encontrados em frutas e vegetais (MUNTEANU; APETREI, 2021). No Brasil, dentre as diversas plantas com atividades medicinais, destaca-se a *Moringa oleífera* Lam., popularmente conhecida como acácia-branca. Pertencente à família Moringaceae e amplamente distribuída, a *Moringa* é rica em fitocomponentes antioxidantes como vitaminas e beta-carotenos, bem como, em polifenóis, ácidos fenólicos, isotiocianatos e glucosinolatos (OWENS *et al.*, 2020; VERA-NUÑEZ *et al.*, 2021).

Estudos recentes descrevem suas propriedades bioativas *in vitro*: ação anti-hiperlipidêmica, anti-hipertensiva, antiviral, bactericida, anti-inflamatória e imunomoduladora (SHARMA *et al.*, 2022; GHARSALLAH *et al.*, 2023). Suas sementes podem ser usadas para tratar doenças da bexiga e da próstata, as folhas no tratamento de insônia, ansiedade e diarreia e as flores servem de matéria prima para produzir compostos afrodisíacos com efeito curativo sob ulcerações em diversos tecidos, aspectos estes que, reforçam sua importância para a medicina herbal (DYVIA, *et al.* 2024)

Assim, atentando para estas características é possível que o extrato salino da semente da *Moringa oleífera* Lam. apresenta-se como alternativa promissora à antioxidante e, potencialmente, radioprotetor.

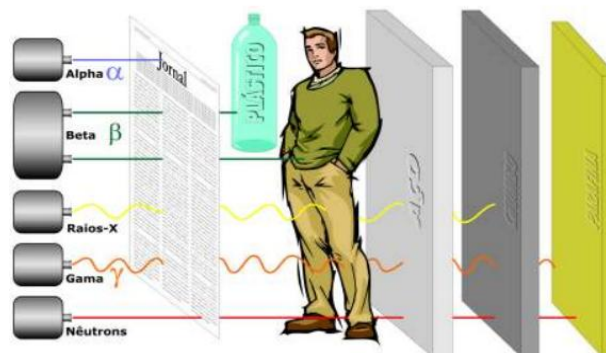
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RADIAÇÃO IONIZANTE

A radiação consiste na propagação de energia na forma de ondas eletromagnéticas ou partículas, sendo dividida entre ionizantes e não ionizantes (TAUBATA *et al.*, 2014). Dessa maneira, a radiação não ionizante, compreende àquelas capazes de interagir com a matéria por meio de aquecimento e excitação molecular, como a radiação infravermelha, microondas, ondas de rádio e de TV, enquanto a radiação ionizante (RI) é entendida por toda e qualquer partícula ou radiação eletromagnética que é capaz de ionizar os elétrons de átomos ou moléculas transformando-as em íons, a partir da interação com a matéria. São consideradas radiações ionizantes, as partículas alfa, beta, gama e os raios-X, emitidos por fontes radioativas (OMER, 2021; FLÔR; GELBCKE, 2009).

A forma de interação das radiações ionizantes com a matéria varia principalmente, de acordo com as características de cada radiação, estando ligadas diretamente com a sua Transferência Linear de Energia (LET) (IAEA, 2011). As partículas consideradas emissoras de radiação corpuscular (alfa) são altamente ionizantes, mas possuem baixo poder de penetração na matéria, sendo bloqueadas por até mesmo uma folha de papel. Do contrário, as partículas de radiação eletromagnética, como a radiação gama e os raios-x, por não possuírem massa, apresentam maior poder de penetração e menor capacidade de ionização (Figura 1).

Figura 1. Poder de penetração das diferentes partículas emissoras de RI.



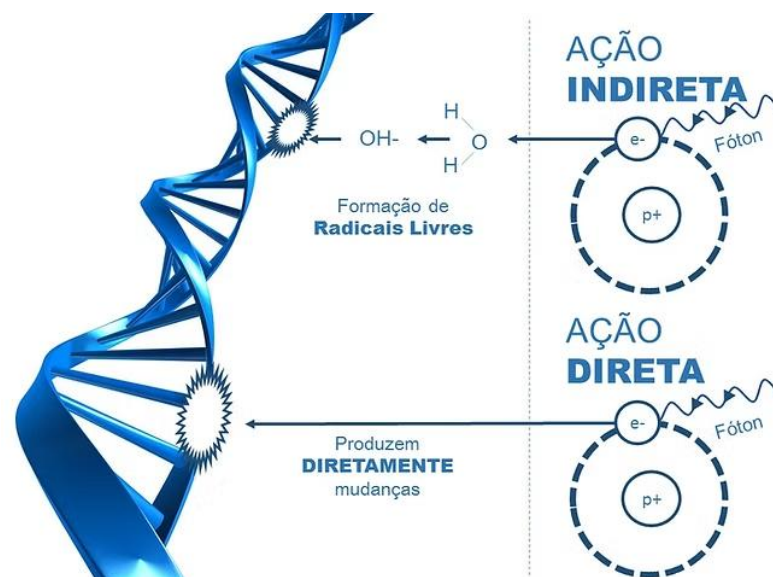
Fonte: Apostila educativa da CNEN, 2020.

Os raios gama são naturalmente emitidos por núcleos instáveis e possuem a capacidade de atravessar a matéria e ionizar átomos. Corresponde a mais energética das radiações e é amplamente utilizada para procedimentos médicos, como as terapias com radiação, bem como, os raios-x que são utilizados para diagnóstico por imagem, pois têm a capacidade de penetrar em tecidos e possibilitar a visualização de ossos e órgãos internos (ALKHALIDI *et al.*, 2023).

2.1.1 Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante e Sistemas de Reparo ao DNA

A interação da radiação ionizante com a matéria biológica desencadeia uma sequência de eventos que podem ocorrer por duas vias, a direta e a indireta (Figura 2). Pela via direta, a radiação interage diretamente com a molécula de DNA, levando a alterações morfofuncionais, ocasionadas pela quebra das estruturas da fita simples e fitas duplas do DNA (WANG, *et al.*, 2020; SANTIVASI; XIA, 2014). Na via indireta, a radiação vai atuar na molécula de água, provocando sua radiólise, o que dá origem às espécies reativas de oxigênio (EROS), que são radicais livres altamente reativos e instáveis (BARNES *et al.*, 2018; PRIVETT *et al.*, 2017).

Figura 2. Efeito direto e indireto da radiação ionizante



Fonte: “Radioterapia | Radioterapeuta Dr Felipe teles | Brasil”, 2016
Acessado de: <https://www.drfulpeteles.com/o-que-%C3%A9-radioterapia>

Os radicais livres não são facilmente neutralizados por possuírem elétrons desemparelhados em sua estrutura, sendo assim, tendem a se estabilizar quando encontram moléculas biológicas, produzindo o estresse oxidativo. Os elétrons livres, formam o radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) que, quando reduzido à peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pode afetar a estrutura da membrana plasmática, modificar grupos funcionais de enzimas, desnaturar proteínas e afetar a molécula de DNA diretamente (DOWLATH, *et al.*, 2021; OBRADOR, *et al.*, 2022).

O organismo humano possui mecanismos de reparo responsáveis por transmitir sinais amplificados às proteínas efetoras, para que sejam ativadas, com objetivo de reparar os danos ao DNA causados pela ação da radiação ionizante. Alguns desses sistemas de reparo são: os checkpoints, que permitem o bloqueio do ciclo celular entre as fases G1-S e S-G2, impedindo a proliferação de células danificadas; o reparo por excisão de bases de nucleotídeos, no qual, o dano ocorre na junção incorreta das fitas, então é produzido o nucleotídeo ideal para o local da excisão, conectando o seguimento e produzindo a fita; a morte celular programada (apoptose), que é o último recurso utilizado pela célula, quando o dano ao DNA é irreparável (CORTEZ, 2018; OH; MYUNG, 2021; NEPOMUCENO, *et al.*, 2017)

2.2 RADIOPROTETORES

Radiomodificadores são moléculas moduladoras administradas antes ou no momento da exposição à radiação, por diferentes vias ou combinação de conceitos e técnicas. Estes agentes minimizam a ocorrência dos efeitos deletérios decorrentes do uso da RI, como estratégia para proteger as células fisiologicamente saudáveis, seja pelo sequestro dos radicais livres ou por rotas de reparos no DNA (DUTTA; WANDEKAR; ROY, 2021). O uso de agentes radioprotetores e radiomitigadores se deve à capacidade dessas substâncias em atenuar os danos causados ao organismo pelo uso da RI, em indústrias, na agricultura e em procedimentos médicos, sendo essas, situações em que há um maior risco de exposições acidentais com níveis elevados de dose absorvida (CARVALHO, 2012; LIU *et al.*, 2023). Estes agentes radiomodificadores, se diferenciam com base no tempo de administração, sendo os radioprotetores, administrados antes da exposição à radiação ionizante e os radiomitigadores durante ou imediatamente após a exposição à radiação ionizante, contanto que seja antes da manifestação dos sintomas de toxicidade (OBRADOR, *et*

al., 2020; MISHRA; ALSBEIH, 2017).

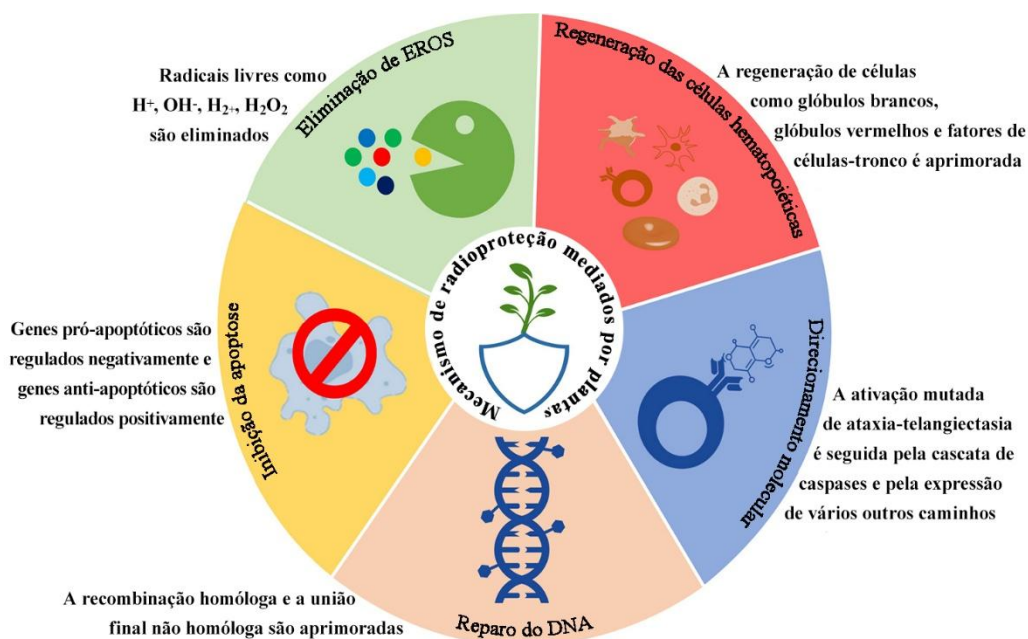
Em geral, os radioprotetores e radiomitigadores, amplificam os mecanismos de defesa celular por meio da eliminação dos radicais livres, pela capacidade que possuem de doar um elétron e estabilizá-los, estabelecendo sua ação antioxidante. Alguns radiomodificadores mais recentes, além de antioxidantes, também induzem a radioproteção/radiomitigação pela ativação de citocinas, da hematopoiese, da apoptose e da modulação de genes (SHIVAPPA; BERNHARDT, 2022; ZHANG, *et al.*, 2023).

2.2.1 Radioprotetores sintéticos e naturais

A Amifostina (WR-2721) é, atualmente, a única droga aprovada para uso clínico pela *FDA (Food and Drug Administration)*, como agente radioprotetor e radiomitigador (JIT *et al.*, 2023). É um pró-fármaco sintético do tipo tiofosfato orgânico, que atua como citoprotetor e agente de eliminação de radicais livres e no reparo do DNA. No entanto, há limitações expressivas em relação ao seu uso, uma vez que, se limita a reduzir os efeitos nefrotóxicos causados pelo tratamento e, devido a sua toxicidade provoca efeitos colaterais, mesmo quando administrada em concentrações mais baixas (KOUKOURAKIS, M. 2002; OBRADOR, 2020; JIT, *et al.*, 2023).

Portanto, é importante a procura por moléculas eficazes e não-tóxicas que previnam e/ou mitiguem os efeitos induzidos pelas radiações ionizantes no organismo. Nesse contexto, os radioprotetores de origem natural, em sua maioria polifenóis isolados de plantas medicinais e extratos, possuem propriedades terapêuticas cientificamente comprovadas, além de serem capazes de proteger contra os efeitos agudos da radiação, a exemplo, a *Cucuma longa* Linn, e a *Moringa oleífera* Lam, que previne os efeitos do estresse oxidativo (KURUBA, V.; GOLLAPALLI, P., 2018; DOWLATH, *et al.*, 2021; ADNAN *et al.*, 2022). A identificação de moléculas de origem vegetal com as características mostradas na Figura 6, observadas por Dowlath e colaboradores (2021) torna-se um desafio para formulação de agentes radioprotetores promissores.

Figura 3. Mecanismo de radioproteção de origem vegetal



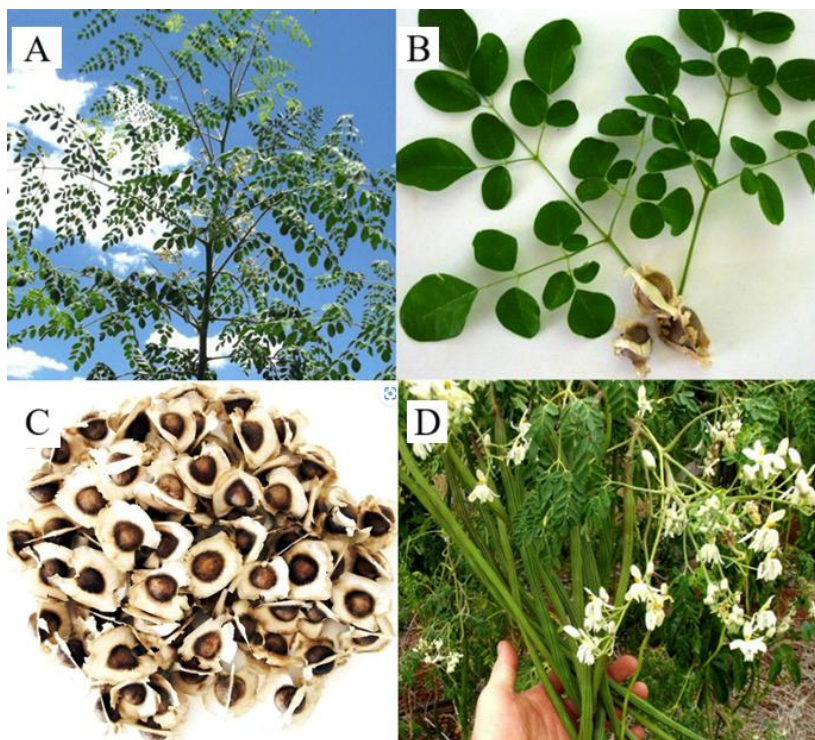
Fonte: Dowlath *et al.*, 2021 (adaptado).

2.3 *MORINGA OLEÍFERA* LAM.: ACÁCIA-BRANCA BRASILEIRA

A *Moringa oleífera* Lam. é uma planta que pertence à família Moringaceae, ordem Papaverales, gênero *Moringa* (SGOBI *et al.*, 2015). Trata-se de uma planta perene, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais (FUGLIER, 1998; ANWAR; BHANGER, 2003; BEZERRA *et al.*, 2004). No Brasil, é distribuída pela região nordeste e possui uso como planta ornamental e medicinal (LORENZI; MATOS, 2002). O gênero contém quatorze espécies, sendo que a mais conhecida e cultivada é a *Moringa Oleífera* Lamark (FAHEY, 2005; ANWAR *et al.*, 2007).

A *M. oleífera* mostra-se como uma alternativa mais barata e confiável para uma boa nutrição e quase todas suas partes (figura 7) podem ser usadas por possuírem nutrientes essenciais (TOHS; HARTMAN, 2015; GOPINATH; JEEVITHA; GOKILADEVI, 2017). Segundo Divya e colaboradores (2024), a *M. oleífera* Lam. contém em todas as suas partes, ao menos, 46 antioxidantes entre flavonóides, taninos, saponinas, alcalóides, fenólicos e triterpenóides.

Figura 4. Aspectos físicos característicos da *Moringa oleifera* Lam.



Legenda: Caule (A); Folhas (B); Sementes (C); Flores (D)

Fonte: SEMENTE RARA, 2024 (adaptado)

Acessado de: <https://www.sementerara.com.br/moringa-oleifera-moringa-oleifera-3-sementes>

O uso medicinal da *M. oleifera* já foi comprovado no tratamento de alterações patológicas, como hipertensão e ansiedade (BHAT; JOY, 2014; AEKTHAMMARAT *et al.*, 2019). Além disso, as folhas, sementes, gomas, casca e flores da *M. oleifera* Lam. são utilizadas para aliviar deficiências minerais e vitamínicas (SILVA; PADILHA; PADILHA, 2021). Diversos estudos têm sido realizados na busca por suas propriedades terapêuticas, utilizando o pó, infusão ou extratos de folhas e sementes. Suas folhas podem ser utilizadas no tratamento de condições inflamatórias além de tratar a hepatite e aliviar a dor nas articulações (POSMONTIER, 2011; GOPALAKRISHNAN; DORIYA; KUMAR, 2016). As raízes são utilizadas no tratamento de cálculos renais, doenças hepáticas, inflamação e a casca do caule para tratar infecções de pele (KARADI *et al.*, 2006; GHASI *et al.*, 2000; PALIWAL *et al.*, 2011; RATHI *et al.*, 2006). As sementes da planta podem atuar como laxante e são utilizadas no tratamento de tumores, problemas de próstata e bexiga (PANDEY *et al.*, 2012). As sementes mostram-se promissoras para o tratamento da artrite, alterando o estresse oxidativo e reduzindo a inflamação (MEIRELES; GOMES; LOPES, 2020).

Estudos recentes demonstram que WEMoS e WSMoL, lectinas presentes na semente da *M. oleífera*, têm efeitos protetores com ações antioxidantes e anti-inflamatórias que previnem a progressão da hipertensão (SILVA *et al.*, 2024). Além disso, a utilização do extrato de folhas de *Moringa oleífera* demonstrou ser capaz de atenuar o dano oxidativo induzido por uma dieta rica em gordura (DIVYA *et al.* 2024). A variedade de atividades biológicas e capacidade antioxidante de outras partes dessa planta, fazem do uso das sementes da *M. oleífera*, um bom candidato a radioprotetor.

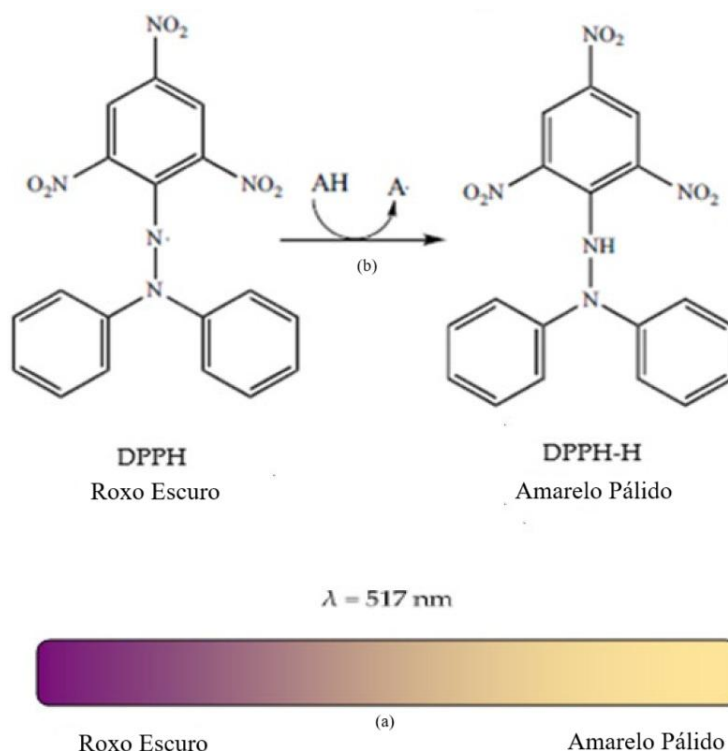
2.4 ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são compostos capazes de eliminar ou inibir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BERRA *et al.*, 2006; UTTARA *et al.*, 2009). Além de prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos (BENSID *et al.*, 2022), os antioxidantes atuam também na minimização dos danos oxidativos nos seres vivos como diabetes e câncer (DARENSKAYA *et al.*, 2021; JANG *et al.*, 2022).

Existem distintos métodos para quantificar a capacidade antioxidante de uma substância, sendo a formação de radicais livres o princípio mais aplicado na análise *in vitro*. Assim, as técnicas de adição de compostos cromógenos como o ABTS (2,2 -azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico) ou DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazila), são utilizadas para avaliação destes radicais (ARENA, FALLICO; MACCARONE, 2001; ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

2.4.1 DPPH (radical 2,2-difenil 1-picrilhidrazil)

O método espectrofotométrico de eliminação de DPPH \cdot é um dos mais amplamente utilizados para determinar a capacidade antioxidante de compostos recém-sintetizados (AYTAC *et al.*, 2023) e baseia-se na capacidade de sequestrar o radical pela doação de íons de hidrogênio ou transferência de elétrons (figura 3).

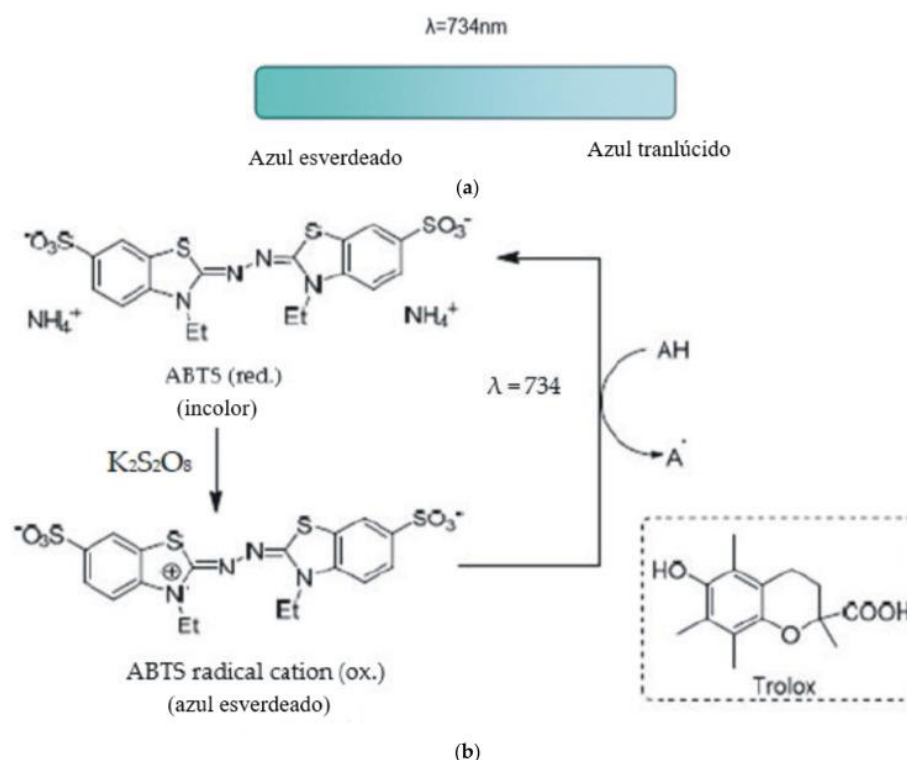
Figura 5. Mecanismo de eliminação do DPPH por um antioxidante

Legenda: Variação de cor no ensaio DPPH (a); Reação de eliminação do radical DPPH (b)
 Fonte: MUNTEANU; APETREI, 2021 (adaptado)

Esse método é um dos mais utilizados devido ao seu baixo custo, rapidez e acessibilidade para medição de propriedades antioxidantes de diversas substâncias por se basear na mudança da coloração do meio (Figura 3), o que confirma qualitativamente a ocorrência da reação (BLOIS, 1958; BALIYAN *et al.*, 2022). Todavia, apresenta desvantagens como a inacessibilidade estérica, ou seja, algumas moléculas têm menos chance de acessar o radical livre, alterando os valores de eliminação de DPPH (APAK *et al.*, 2007), sendo assim, fazendo necessário a complementação com outros testes antioxidantes para conclusão dos resultados obtidos.

2.4.2 ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))

O método ABTS se baseia na capacidade que o antioxidante tem, como doador de elétrons, para reduzir o radical ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), gerado a partir da oxidação do ABTS com Persulfato de Potássio (KURT *et al.*, 2015) como demonstrado na figura 4.

Figura 6. Mecanismo de eliminação do ABTS por um antioxidante

Legenda: Variação de cor no ensaio ABTS (a); Reação de eliminação de cátions do radical ABTS (b)
 Fonte: MUNTEANU; APETREI, 2021 (adaptado)

Este método pode atingir aproximadamente a formação de cerca 60% de radicais livres depois de 16 horas de incubação (RE *et al.*, 1999), apresentando-se como uma metodologia relativamente rápida e eficiente para realizar uma triagem inicial do potencial antioxidante de diferentes compostos (SALAR *et al.* 2018).

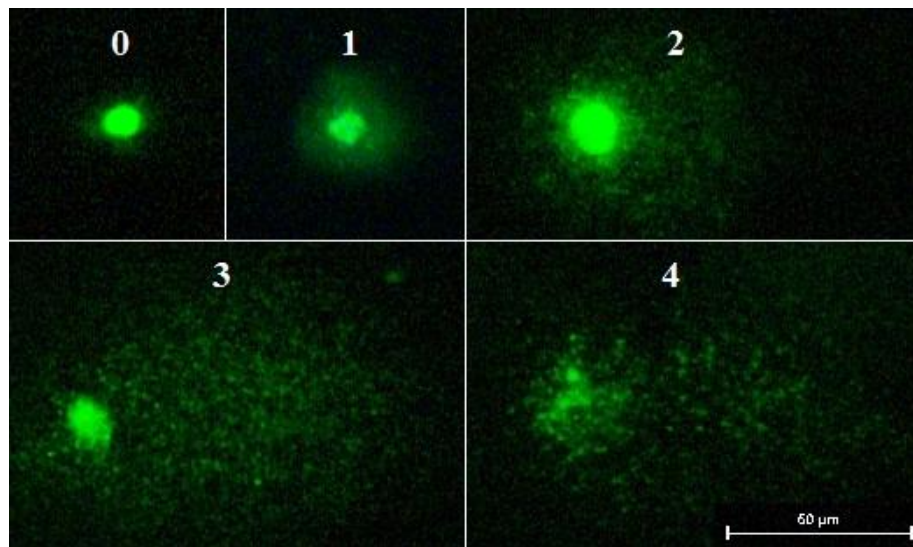
Apesar de sua eficiência, o método apresenta limitações por não ser um representante das biomoléculas, não estar presente em alguns sistemas biológicos como também, sua baixa seletividade e, por isso, pode reagir com qualquer componente menor redutor que ele (TOMBA; DIAZ; GUERGOLETTTO, 2023).

2.5 ENSAIO COMETA ALCALINO

Os radicais livres podem danificar o DNA causando quebras de fita simples ou dupla e fragmentação do DNA (CANNAN; PEDERSON, 2016). Caso o dano supere a capacidade de reparo, o excesso de danos provocados pelas EROS, desencadeiam efeitos genotóxicos graves, que podem ser mensurados ao utilizar uma técnica sensível, capaz de avaliar a fragmentação desse DNA (COLLINS *et al.*, 2023).

Devido a sua alta sensibilidade, capacidade de obtenção de resultados quantitativos, curto tempo e baixo custo, o ensaio cometa torna-se um método vantajoso que pode ser aplicado para determinar a genotoxicidade (MOBARAKEH *et al.*, 2015; NASIRI *et al.*, 2016). Este método tem sido amplamente utilizado embora tenha limitações, como não exibir reticulação DNA-DNA e outras alterações celulares, mas é capaz detectar vários tipos de danos no DNA (LU; LIU; YANG, 2017). Tais danos, são identificados microscopicamente, e classificados em uma escala de danos, na qual, de acordo com MÖLLER *et al.*, (2023) o grau 0 corresponde à manutenção da integridade do DNA e, de 1 a 4, os danos são progressivos e identificados pela presença de fragmentos do DNA, resultando, visualmente, o aspecto de cauda de cometa (Figura 5).

Figura 7. Ensaio cometa por microscopia de fluorescência



Legenda: 0 = Cometa sem danos / 1 = Cometa com baixo dano / 2 = Cometa com dano médio / 3 = Cometa com dano elevado / 4 = Cometa com dano irreversível

Fonte: Aguiar, 2022 (adaptado)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial radioprotetor do extrato salino das sementes da *Moringa oleífera* Lam. por meio da atividade antioxidante, citotoxicidade e genotoxicidade.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ação antioxidante do extrato salino das sementes da *Moringa oleífera* Lam. por meio do método de sequestro dos radicais DPPH (radical 2,2-difenil 1-picrilhidrazil) e ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico));
- Avaliar a citotoxicidade utilizando o teste MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl))-2,5-difenil brometo de tetrazolina)) em *PBMCs*;
- Analisar a genotoxicidade através do Ensaio Cometa Padrão para comprovação da eficácia radioprotetora;

4 METODOLOGIA

As sementes da *Moringa oleífera* Lam. foram cedidas pelo Laboratório de Bioquímica das Proteínas (BioProt) do Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

A pesquisa foi realizada em conjunto com o Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE, o Laboratório de Dosimetria Biológica (LBD) do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE) e com o Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE.

4.1 COMITÊ/COMISSÃO DE ÉTICA

Este trabalho faz parte do projeto intitulado “*Avaliação do potencial radiomodificador e imunomodulador de lectinas extraídas de extratos vegetais*”. A coleta do material biológico foi realizada após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por parte dos doadores voluntários e seu uso foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana do Centro de Ciências da Saúde da UFPE – Campus Recife sob o número do CAAE: 50965221.5.0000.5208 (**Anexo A**).

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO SALINO

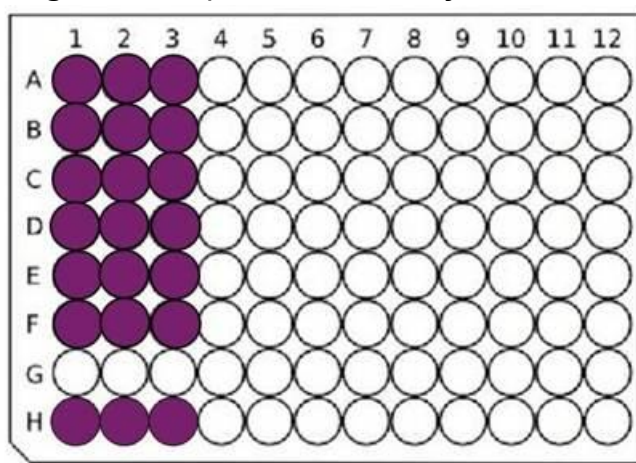
Para a obtenção do extrato, seguiu-se a metodologia adaptada proposta por Abou-Zeid *et al.* (2020). Para tanto, 50 gramas das sementes da *Moringa oleífera* Lam. foram trituradas e solvidas em 250mL de solução salina (NaCl) a 0,9%. A solução foi colocada sob agitação magnética por 24 horas a temperatura ambiente. A solução de extrato foi filtrada e, posteriormente, dialisada em membranas de celulose por 3 ciclos de 1 hora cada, seguido de trocas da água destilada. Em seguida, a amostra foi liofilizada no Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para a obtenção do extrato em pó, com isso, a solução mãe foi preparada na concentração de 50mg/mL. A partir dela, foram estabelecidas 6 concentrações do extrato para serem usadas nos demais testes, foram elas: 100µg/mL, 50µg/mL, 20µg/mL, 10µg/mL, 6µg/mL e 3µg/mL.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

4.3.1 DPPH (radical 2,2-difenil 1-picrilhidrazil)

O ensaio DPPH, conforme as adaptações da metodologia de Miliauskas, G. e colaboradores (2004). Inicialmente foram dissolvidos 8 mg do radical em 100mL de metanol. Antes de dar início ao teste, foi feita a calibração do radical colocando-se em microplaca de 96 poços 220µL do radical pronto para uso (em triplicata), para realizar a leitura da absorbância no espectrofotômetro ELISA (modelo Biotek®-Epoch). O comprimento de onda protocolado é de 517 nanômetros e a absorbância foi ajustada no intervalo de 0.600 a 0.700. Após ajuste, foram adicionados na microplaca 220µL do radical DPPH com 2µL do extrato salino, nas suas respectivas concentrações anteriormente estabelecidas (A1-A3 – F1-F3) (Figura 8).

Figura 8. Esquema de incubação com DPPH



Fonte: Da autora (2024)

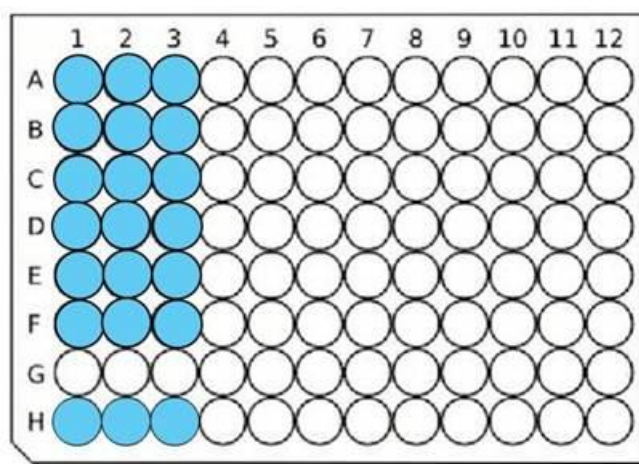
Como controle positivo foi utilizada a curva de calibração do ácido ascórbico a 500µM, já estabelecida no Laboratório de Radiobiologia. Para o controle negativo, foi utilizado 2µL de salina com 220µL do DPPH (H1-H3). No “branco”, foi utilizado apenas NaCl 0,15M. Após 25 minutos de espera em ambiente escuro, foram realizadas as leituras das absorbâncias no leitor de placas ELISA no comprimento de onda definido anteriormente.

4.3.2 ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))

O teste ABTS, seguiu a metodologia de Re *et al.* (1999) adaptada, para tanto, foi preparada a solução de ABTS a 7mM, na qual, 192 mg do radical foi dissolvido em 50mL de água destilada e, em paralelo, foi feita a solução do Persulfato de Potássio ($K_2S_2O_8$) a 140mM, com 378,4mg de $K_2S_2O_8$ em 10mL de água destilada. Para a formação do radical ABTS foi adicionado em um tubo Falcon 4912µL da solução de ABTS mais 88µL da solução de $K_2S_2O_8$. Essa solução foi homogeneizada e armazenada na temperatura ambiente, em local escuro, por 16 horas, após esse tempo, caso não seja utilizada no dia, poderá ficar armazenada na geladeira por até 30 dias.

No dia de uso, 1mL da solução do radical foi diluído em 99mL de álcool etílico para ser feita a calibração do radical no ELISA. O comprimento de onda recomendado é de 734 nanômetros e a absorbância foi ajustada no intervalo de 0.700 a 0.734. Feito isso, foi adicionado na microplaca 220µL do radical ABTS (Figura 9) com 2µL do extrato salino nas suas respectivas concentrações anteriormente estabelecidas (A1-A3 – F1-F3).

Figura 9. Esquema de incubação com ABTS



Fonte: Da autora (2024)

Como controle positivo foi utilizada a curva de calibração do ácido ascórbico a 500µM. Para o controle negativo, foi utilizado 2µL de salina com 220µL do ABTS (H1-H3). No branco, foi utilizado apenas NaCl. Após 6 minutos de espera em ambiente escuro, foi feita a leitura da absorbância no ELISA no comprimento de onda definido anteriormente.

4.4 SELEÇÃO DE DOADOR E COLETA DE AMOSTRAS

Foi selecionado um doador saudável, seguindo os critérios utilizados por Gajendiran, *et al.* (2001), no qual, foi feita uma anamnese do voluntário, a fim de, verificar se o mesmo não foi exposto à radiação ionizante nos últimos 6 meses ou fez uso de vacinações virais e/ou consumiu drogas, visto que, a utilização desses agentes pode levar a alterações cromossômicas que interfiram nos resultados do estudo.

Após essa seleção, foram coletados 4mL por punção venosa de amostras de sangue periférico total, para cada experimento em tubos de heparina.

4.5 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS

Seguindo o protocolo de Fenech (2007) adaptado, foram coletados 4 mL de sangue que, em capela de fluxo laminar, foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL. Ao tubo, foi adicionado o mesmo volume de tampão PBS de pH 7,4, na diluição 1:1. O sangue diluído foi levemente sobreposto com Ficoll-Paque Plus® na proporção de 1:3 e, em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm, dessa forma, foi possível a obtenção e visualização da camada de *PBMC* isolada (nuvem celular). A suspensão de leucócitos (nuvem celular) foi transferida para outro tubo falcon, onde foi diluída e homogeneizada em PBS com 2x o seu volume. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 2500 rpm e, ao final, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi colocado em um único tubo com 1mL de PBS.

4.6 VIABILIDADE CELULAR

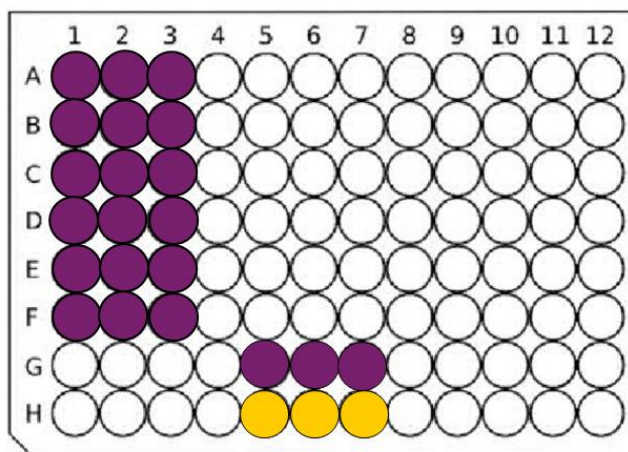
A avaliação da viabilidade e o ajuste da concentração celular para $1 \times 10^5/\text{mL}$ foram realizados na Câmara de Neubauer. Para isso, 20 μL da suspensão celular foram diluídos em 20 μL de Azul de Trypan a 0,04%, resultando em uma diluição final de 1:1. A viabilidade celular foi determinada pela razão entre o número de células viáveis e as células não viáveis, ou seja, as que foram coradas.

4.7 ENSAIO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*

4.7.1 Teste MTT (((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)) -2,5-difenil brometo de tetrazolina))

A avaliação da citotoxicidade do extrato salino da semente da *M. oleífera* Lam. foi realizada por meio do *Cell Proliferation Kit - MTT* (ROCHE®) em cultura de células mononucleares do sangue periférico (*PBMC*) seguindo as recomendações do fabricante e as adaptações de Mosmann (1983). Após realização das etapas descritas nos subtópicos 4.5 e 4.6, em capela de fluxo laminar, foi adicionado a uma microplaca, o isolado celular na concentração de $1 \times 10^5/\text{mL}$, 200 μL do meio RPMI (ideal para cultivo das células), 10 μL do soro bovino fetal (meio enriquecedor) e as 6 concentrações do extrato salino (A1-A3 – F1-F3). No controle positivo (G5-G7) foi utilizada a Fitohemaglutinina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o controle negativo (H5-H7) apenas meio RPMI, soro bovino fetal e células *PBMC*. Feito isso, a microplaca foi envolta em papel alumínio e incubada em estufa a 37°C por 24h, como representado na Figura 10.

Figura 10. Esquema de incubação para ensaio citotóxico.



Fonte: Da autora (2024)

Após as 24 horas, foram adicionados 20 μL do reagente MTT em todos os poços e a placa retornou para a estufa por mais 4 horas. Em seguida, foi adicionado 100 μL do tampão de solubilização e as amostras retornaram para incubação “*overnight*” a 37°C. Todo procedimento foi realizado em triplicata. Ao final, foi feita a leitura da densidade óptica (DO) das amostras no espectrofotômetro, no comprimento de onda para 570 nanômetros.

4.8 ENSAIO GENOTÓXICO *IN VITRO*

4.8.1 Separação de Grupos Amostrais e Irradiação das Amostras

As amostras de *PBMCs*, isoladas como descrito no tópico 4.5, foram distribuídas em eppendorfs devidamente identificados como grupos irradiados (por fonte de gama Gammacell 220 ^{60}Co) e não irradiados, da seguinte forma:

Grupo 1: Amostra não irradiada e não tratada com o extrato salino de *M. oleífera* (Controle negativo não irradiado);

Grupo 2: Amostra irradiada e não tratada com o extrato salino de *M. oleífera* (Controle negativo irradiado);

Grupo 3: Amostra irradiada e tratada com amifostina (Controle Positivo);

Grupos Tratados e Irrradiados: Amostras irradiadas e tratadas com o extrato salino de *M. oleífera* nas concentrações selecionadas (100 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$);

Grupos Tratados e Não irradiados: Amostras não irradiadas e tratadas com o extrato salino de *M. oleífera* nas concentrações selecionadas (100 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$);

A irradiação das amostras foi feita no Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE, na dose de 2,5Gy. Para a escolha da dose, seguiu-se os critérios da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2011), por ser próxima ao valor da $\text{DL}_{50/30}$ para humanos (2,5 – 3,0 Gy).

4.8.2 Ensaio Cometa Alcalino

Para a comprovação do efeito radioprotetor do extrato salino da semente da *Moringa oleífera* Lam foi realizado o ensaio cometa alcalino como descrito por Singh *et al.* (1988) e Arivalagam *et al.* (2015), com modificações. Primeiro, os eppendorfs correspondentes a cada grupo foram centrifugados por 4 minutos a 4000 rpm por 3 vezes no qual foi retirado o sobrenadante e ressuspensionado com PBS. Ao final desse processo, os *PBMCs* foram ressuspensionados e homogeneizados com agarose de baixo ponto de fusão 1% (2:1). Em seguida, esse homogenato foi colocado sobre lâminas de microscopia cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1%). As lâminas foram cobertas com lamínula e mantidas por 12 minutos a 4°C. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em solução de lise (NaCl a 2,5M,

EDTA a 100 mM, Tris a 10 mM, 1% de Triton-X 100 e 10% de DMSO, pH 10,0) por 12 horas a 4°C.

Após o processo de lise, ou seja, quebra da membrana celular para exposição do DNA, as lâminas foram cuidadosamente lavadas com água destilada e transferidas para a cuba de eletroforese horizontal, contendo solução de tampão alcalino (EDTA 1 mM e NaOH a 300 mM) (pH 13,0), onde permaneceram por 20 minutos. A corrida eletroforética foi iniciada após a incubação, com as lâminas sendo submetidas a 0,74 V/cm e 300 mA por 20 minutos (4°C). Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4M (pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em álcool absoluto por 10 minutos. Todo experimento foi realizado em triplicata e em ambiente escuro.

4.8.3 Análise Microscópica

As lâminas que foram avaliadas em microscópio de fluorescência foram coradas com 50 µL de solução de GEL RED (1:1000). Foram analisadas 300 células por grupo, classificando-as em cinco níveis (0, 1, 2, 3 e 4) a depender da extensão do dano, como descrito no método de MÖLLER *et al.*, (2023). Os cometas são analisados pelo Índice de danos (ID) (Equação 1).

$$ID = 0.(n_0) + 0,25.(n_1) + 0,5.(n_2) + 0,75.(n_3) + 1.(n_4) \quad (1)$$

Onde: n = número de cometas quanto à classe

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A plotagem dos dados foi mensurada através do Índice de Inibição (I%), que mede em porcentagem a capacidade de reduzir o objeto de estudo, radicais (DPPH e ABTS) e a porcentagem de viabilidade celular (MTT). Também foi calculado o IC₅₀ (concentração inibitória mínima para inibir 50% dos radicais e/ou as células). No tratamento dos resultados, foram utilizados os testes ANOVA e o post-hoc de Bonferroni e Turkey. As diferenças estatísticas foram definidas em $p \leq 0,05$ usando o software no GraphPad Prism 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO ANTIOXIDANTE

No ensaio DPPH, o extrato salino apresentou baixa atividade antioxidante, máxima de 11,56%. Entretanto, não houve detecção de atividade pelo método ABTS (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de inibição (I%) dos radicais DPPH e ABTS pelo extrato salino de sementes da *Moringa oleífera* Lam.

Concentração (µg/mL)	I% do DPPH	I% do ABTS
100	11,56	-1,36
50	10,62	-2,96
20	9,87	-3,1
10	8,36	-3,67
6	7,94	-5,59
3	4,93	-6,25

Pela equação da reta, em ambos os testes ($y = 0,3524x - 5,2094$ para ABTS e $y = 0,4306x + 7,1843$ para DPPH), o R^2 para a testagem ABTS foi igual a 0,7506 e para o DPPH, 0,6565.

Segundo Chein (2019), a concentração e a medição da absorbância estão correlacionadas, assim como o índice de inibição (que é calculado com base nas absorbâncias). Logo, uma substância com uma capacidade antioxidante expressiva, apresentará I% elevado mesmo em baixas concentrações.

Corroborando com este fato, está o fundamento destes testes, uma vez que, ambos são baseados na eliminação de um cromóforo estável que é determinado por espectrofotometria, de acordo com a mudança na absorbância, relacionando diretamente a concentração com o efeito antioxidante (SIDDEEG *et al.*, 2021).

A reatividade dos ensaios também pode ser observada visualmente, pois, após o tempo de reação determinado para cada um dos testes, espera-se que ocorra a viragem na coloração do meio com o DPPH (roxo para amarelo) e ABTS (azul-

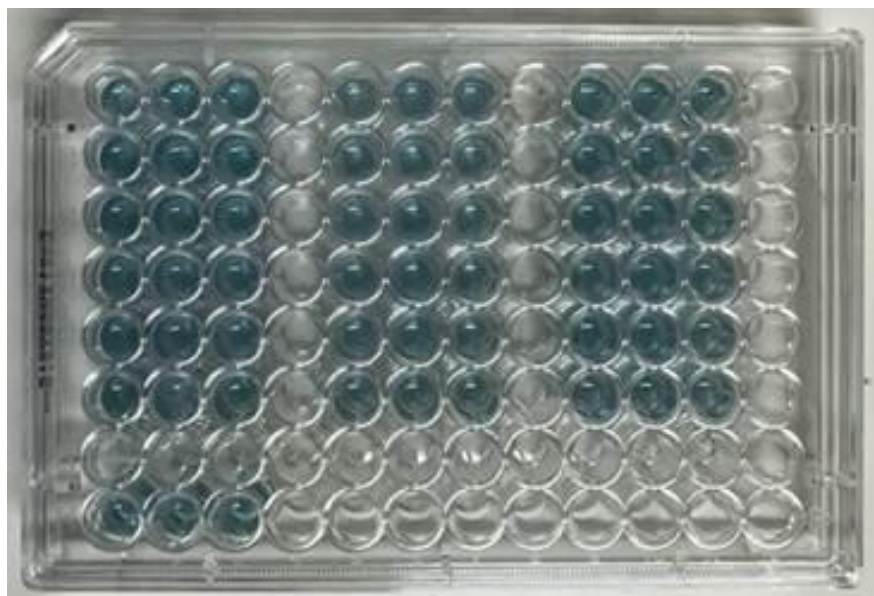
esverdeado para o translúcido) (MUNTEANU, 2021). Logo, como representado nas figuras 11 e 12, o extrato salino apresentou coloração semelhante ao controle negativo (H1-H3), sem alteração na coloração, o que demonstra a ausência parcial (qualitativa) da sua atividade antioxidante.

Figura 11. Verificação visual da não viragem do meio reacional no ensaio DPPH com o extrato salino.



Fonte: Autora (2025)

Figura 12. Verificação visual da não viragem do meio reacional no ensaio ABTS com o extrato salino.



Fonte: Autora (2025)

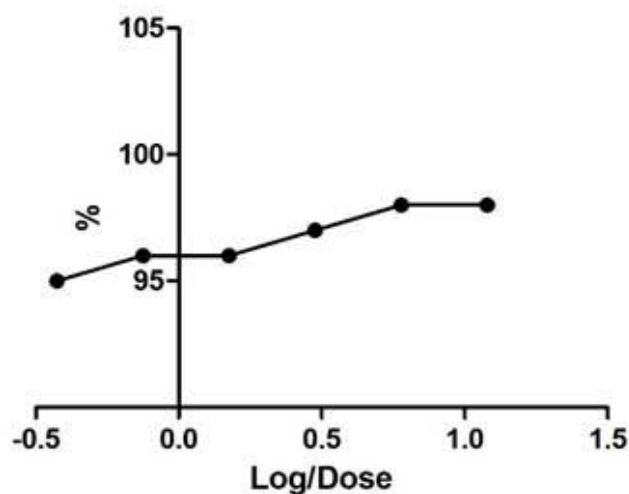
Silva e colaboradores (2018), encontraram achados semelhantes ao estudar a atividade do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (OSMS) com o padrão Trolox com radical DPPH. O OSMS, apesar de ter atuado como doador de átomos de hidrogênio ou elétrons e, conseqüentemente, reduzido o radical DPPH, apresentou um baixo potencial antioxidante, assim como o extrato salino das sementes da *M. oleífera*.

Os resultados do ABTS corroboram com o teste feito por Matheus *et al.* (2024), em sua análise da atividade antioxidante das lectinas WEMoS e WSMoL, proteínas obtidas a partir do extrato aquoso da semente da *Moringa oleífera*, em relação ao padrão Trolox, um análogo da vitamina E, com atuação de controle positivo, assim como o ácido ascórbico utilizado nesse estudo.

5.2 EFEITO CITOTÓXICO

Pelo ensaio MTT, o extrato salino não apresentou citotoxicidade na cultura de *PBMC*. De acordo com o gráfico de viabilidade celular (Figura 13), no qual, as seis concentrações testadas foram convertidas em Log na base 10 (eixo X), a viabilidade se manteve acima de 95% (eixo Y), sendo máxima nas concentrações de 50 e 100µg/mL, cerca de 97%.

Figura 13. Viabilidade celular pelo ensaio MTT em células *PBMC*.



Todos os poços em que foram pipetadas as amostras se mantiveram na coloração roxa, uma vez que, nesse teste, a positividade da reação tem natureza

cromogênica, ou seja, a medição é baseada em colorimetria e se dá pela redução do sal tetrazólio, MTT, por ação das desidrogenases presentes na mitocôndria das células metabolicamente ativas, em um composto denominado Formazan de coloração roxa, logo, a viabilidade é proporcional à redução intracelular do MTT (GHASEMI et al., 2021).

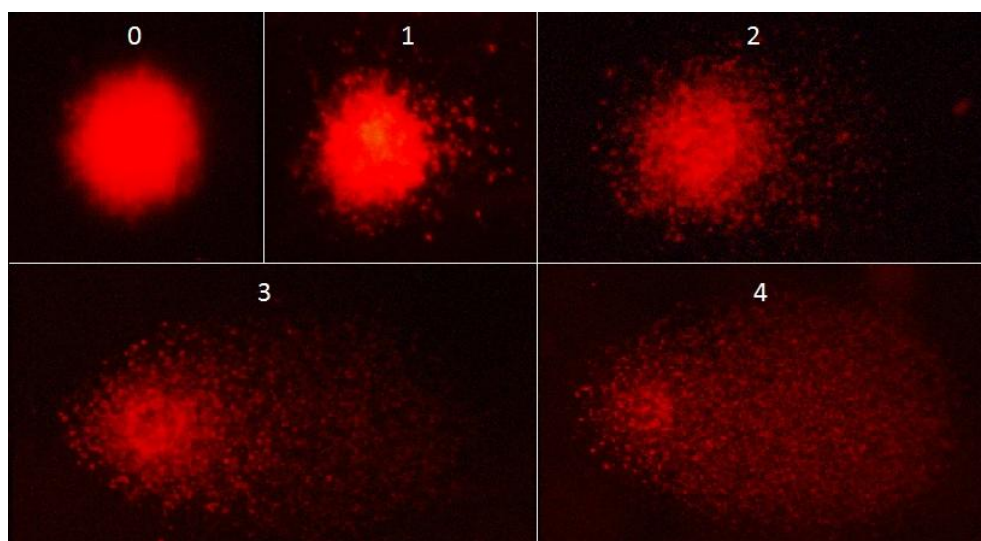
A concentração inibitória média, que corresponde à quantidade mínima necessária para inibir 50% das células, foi estabelecida em $IC_{50} = 1,064^{-0,05}$ o que não só implica na baixa citotoxicidade, como também em completa ausência de toxicidade. Os resultados acerca da citotoxicidade corroboram com o estudo realizado por Anunciação et al. (2020), em sua avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico da semente da *M. oleifera* Lam.

Esses resultados servem de base para estudos posteriores que destacam a importância da busca por radiomodificadores naturais e suas vantagens, em relação aos artificiais, devido à baixa toxicidade e propriedades imunoestimulantes (KURUBA; GOLLAPALLI, 2018).

5.3 EFEITO RADIOPROTETOR

Pelo ensaio cometa alcalino, a figura 14 apresenta as alterações de DNA que foram quantificadas e classificadas nas cinco categorias de dano.

Figura 14. Análise microscópica dos cometas tratados com extrato salino



Legenda: 0 = Cometa sem danos / 1 = Cometa com baixo dano / 2 = Cometa com dano médio / 3 = Cometa com dano elevado / 4 = Cometa com dano irreversível

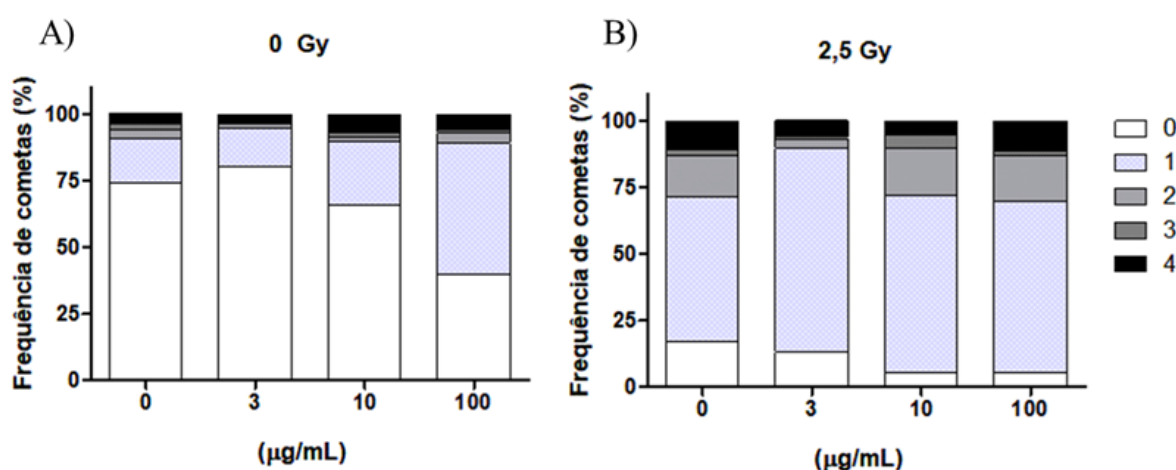
Fonte: Autora (2025)

Para a validação dos testes foi utilizado como controle positivo a Amifostina comercial, que apresentou o índice de dano de $8,00 \pm 0,75$ para os linfócitos irradiados a 2,5 Gy o que comparado ao controle negativo ($7,83 \pm 2,31$) demonstrou sua atividade radioprotetora.

Para os testes, as amostras tratadas e não irradiadas apresentaram diferentes níveis de categoria de dano (Fig. 15A) de acordo com as concentrações de 0 - 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato, com predominância de níveis 0 (74 - 40%) e 1 (16.67 - 49%), respectivamente.

Já as amostras tratadas e irradiadas (Fig. 15B), houve um aumento da frequência de níveis 1 (54.67 - 64.33%) e 2 (15.33 - 17%) para as mesmas concentrações do extrato salino. Além disso, quando comparados ao grupo controle negativo, não houve diferenças significativas.

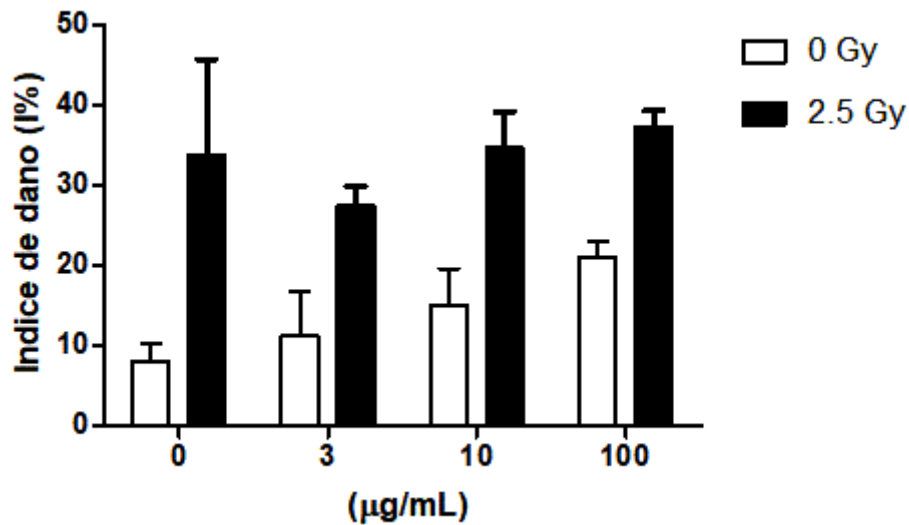
Figura 15. Frequência de cometas (%) em *PBMCs*



Legenda: Frequência de cometas em células não irradiadas (A); Frequência de cometas em células irradiadas (B)

Quanto ao índice de dano, pode-se observar um aumento gradual de dano de forma dose-dependente (0 - 100 $\mu\text{g/mL}$) em ambas os grupos, com I% de $7,83 \pm 2,31$ a $20,92 \pm 2,13$ para as amostras tratadas e não irradiadas, enquanto $27,42 \pm 2,40$ a $37,17 \pm 2,10$ para as amostras tratadas e irradiadas (figura 16). Porém, na análise por Bonferroni, não houve diferenças estatísticas entre o controle negativo irradiado e os grupos tratados e irradiados, revelando ausência de efeito radioprotetor.

Figura 16. Índice de danos em *PBMCs*



A literatura destaca a sensibilidade que o ensaio cometa possui para avaliar danos ao DNA (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2020). Embora o mecanismo em que o extrato de sementes de *M. oleifera* interage com as células produzindo dano no DNA não estejam claros, os resultados apontam que não houve diferenças entre os grupos testados. Portanto, embora o extrato não seja genotóxico, não foi capaz de atenuar os danos causados pela radiação nas concentrações testadas.

Resultados similares foram vistos em estudos com infusão de *M. oleifera* com ausência de toxicidade e genotoxicidade quando administrada por 28 dias (BARROS *et al.*, 2022). Assim como, também não foi visto danos ao DNA quando avaliado genotoxicidade de um extrato de pó de semente de *M. oleifera* e da lectina solúvel em água de *Moringa oleifera* (WSMoL) isolada de sementes (ROLIM *et al.*, 2011). Por fim, faz-se necessária a realização de novos ensaios para maiores esclarecimentos quanto à avaliação do dano ao DNA, com as técnicas biodosimétricas e citogenéticas, padrão ouro: Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (*CBMN*) e Dicêntricos.

6 CONCLUSÃO

- O extrato salino da semente da *Moringa oleífera* Lam. apresentou baixa atividade antioxidante pelos métodos DPPH, e ausência da capacidade antioxidante pelo ABTS.
- Não foi observada citotoxicidade pelo ensaio MTT em cultura de células mononucleares do sangue periférico (*PBMC*).
- O extrato não foi capaz de radioproteger as células dos efeitos da radiação, nas concentrações testadas e na dose estabelecida de 2,5Gy.

REFERÊNCIAS

- ABDELKADER *et al.* "Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food - a review." **Critical reviews in food science and nutrition** vol. 62,11 (2022): 2985-3001. doi:10.1080/10408398.2020.1862046
- ABOU-ZEID, S. M. *et al.* Moringa oleifera ethanolic extract attenuates tilmicosin-induced renal damage in male rats via suppression of oxidative stress, inflammatory injury, and intermediate filament proteins mRNA expression. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110997–110997, 13 nov. 2020.
- ADNAN, M.; *et al.* Radioprotective Role of Natural Polyphenols: From Sources to Mechanisms. **Anticancer Agents Med Chem.** V.22(1):30-39. 2022. doi: 10.2174/1871520621666210419095829.
- AEKTHAMMARAT D., PANNANGPETCH P., TANGSUCHARIT P. O extrato de folha de Moringa oleifera reduz a pressão alta, aliviando a disfunção vascular e diminuindo o estresse oxidativo em ratos hipertensos L-NAME. **Fitomedicina**. 2019; 54:9–16. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.10.023
- AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. 2018. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophys. Chem.** 238, 1-7. Doi: 10.1016/j.bpc.2018.04.003.
- ALKHALIDI, M. *et al.* Assessment of Non-Ionizing Radiation Emissions from Cell Phone Towers. **Pollution**, v. 9, n. 4, p. 1515–1524, out. 2023.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002
- ANUNCIAÇÃO *et al.* Antioxidant Activity Evaluation and Total Phenolics in Oils of Seed Extracted of the Moringa oleifera Lam. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 1, p. 148–154, 2020.
- ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Analytical characterization of Moringa oleifera seed oil grown in temperate regions of Pakistan. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6558-6563, 2003.
- APAK, R. *et al.* Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496–1547, 19 jul. 2007.
- ARBOITTE, F.; CLAUS, T. V. A irradiação de alimentos na agricultura demonstrando os benefícios que essa tecnologia pode proporcionar, trazendo qualidade e durabilidade. *Disciplinarum Scientia. Série Ciências Naturais e Tecnológicas*, v. 25, n. 1, p. 143–148, 1 jan. 2024.
- ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. **Food Chemistry**, v. 74, p. 423-427, 2001.

ARIVALAGAN, S. et al. Radioprotective Effect of Carvacrol Against X-Radiation-Induced Cellular Damage in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**. v.34, n. (3), p.263–275. 2015.

AYTAC, S. et al. Synthesis of Schiff Bases Containing Phenol Rings and Investigation of Their Antioxidant Capacity, Anticholinesterase, Butyrylcholinesterase, and Carbonic Anhydrase Inhibition Properties. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 779, 1 mar. 2023.

BALIYAN, S., *et al.* (2022). Determination of Antioxidants by 65 DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. **Molecules**, 27(4), 1326.

BARNES, J. L.; ZUBAIR, M.; JOHN, K.; POIRIER, M. C.; MARTIN, F. L. Carcinogens and DNA damage. **Biochem Soc Trans**. v.19, n.46(5), p. 1213-1224. doi: 10.1042/BST20180519. 2018.

BARROS, M. C. *et al.* Evaluation of acute toxicity, 28-day repeated dose toxicity, and genotoxicity of *Moringa oleifera* leaves infusion and powder. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 296, 2022.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; MASCIO, P.D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.

BEZERRA, A.M.E.; MOMENTÈ, V.G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleífera* Lam) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n 2, p. 295-299, 2004.

BHAT S.K., JOY A.E. Efeito ansiolítico do extrato etanólico de folhas de *Moringa oleifera* em camundongos albinos suíços. *Arch. Med. Saúde Sci.* 2014; 2:5–7.

CANNAN WJ, PEDERSON DS. Mechanisms and consequences of double-strand DNA break formation in chromatin. **J Cell Physiol**. 2016;231(1):3–14. doi: 10.1002/jcp.25048.

CARVALHO, Joaquim Francisco de. O espaço da energia nuclear no Brasil. **estudos avançados**, v. 26, p. 293-308, 2012

CHEIN, F. Introdução aos modelos de regressão linear: um passo inicial para compreensão da econometria como uma ferramenta de avaliação de políticas públicas. **repositorio.enap.gov.br**, 2019.

COLLINS, A. *et al.* Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nature Protocols**, v. 18, n. 3, p. 929–989, 1 mar. 2023.

CORTEZ, C. R. S. A. *et al.* **Os mecanismos de reparo do DNA face à mutação proposta por fatores endógenos e exógenos: revisão integrativa de literatura.** 2018.

DAINIYAK, N.; ALBANESE, J. Medical management of acute radiation syndrome. **Journal of Radiological Protection**, v. 42, n. 3, p. 031002, 19 jul. 2022.

DARENSKAYA, M A et al. "Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction." **Bulletin of experimental biology and medicine** vol. 171,2 (2021): 179-189. doi:10.1007/s10517-021-05191-7

DIVYA, S. et al. Exploring the Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Properties of Moringa oleifera: A Comprehensive Review. **Nutrients**, v. 16, n. 19, p. 3423, 9 out. 2024.

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

DURHAM, A. L.; ADCOCK, I. M. The relationship between COPD and lung cancer. **Lung Cancer**, v. 90, n. 2, p. 121–127, nov. 2015

DUTTA, S.; WADEKAR, R. R.; ROY, T. Radioprotective natural products as alternative complements in oncological radiotherapy. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 20, n. 2, p. 101–122, 30 mar. 2021.

FAHEY, J. W. Moringa Oleifera: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. **Trees for Life Journal: A Forum on Beneficial Trees and Plants**. Maryland, USA: 2005

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084, 2007.

FISCHER, N.; SEO, E.-J.; EFFERTH, T. Prevention from radiation damage by natural products. **Phytomedicine**, v. 47, p. 192–200, ago. 2018.

FLÔR, R. DE C.; GELBCKE, F. L. Tecnologias emissoras de radiação ionizante e a necessidade de educação permanente para uma prática segura da enfermagem radiológica. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 62, n. 5, p. 766–770, out. 2009.

FUGLIE L.J. Produzindo Alimentos sem Pesticidas: Soluções Locais para o Controle de Pragas de Culturas na África Ocidental. **1ª ed. Serviço Mundial da Igreja**; Dakar, Senegal: 1998

GAJENDIRAN, Natarajan, et al. "Neutron-induced Adaptive Response Studied in Go Human Lymphocytes Using the Comet Assay". **Journal of Radiation Research**, vol.42, no 1, 2001, p. 91–101.

GHARSALLAH, K. et al. Moringa oleifera: Processing, phytochemical composition, and industrial applications. **South African Journal of Botany**, v. 160, p. 180–193, 1 set. 2023.

GHASEMI, M. et al. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021.

GONZAGA, H. F. Radiação e sua importância para a conservação de alimentos tecnologia do futuro. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, v. 7, n. 1, 2023.

GOPALAKRISHNAN, L.; DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Moringa oleifera: a Review on Nutritive Importance and Its Medicinal Application. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n. 2, p. 49–56, jun. 2016.

GOPINATH, L.; JEEVITHA, S.; GOKILADEVI, T. Isolation and Identification of therapeutic compounds from Moringa oleifera and its antimicrobial activity. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 12, n. 6, p. 1-07, 2017.

HIDETOSHI SATOH et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-pyrrolone derivatives as radioprotectors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 116764–116764, 9 maio 2022.

JANG, WON YOUNG. *et al.* "Efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-menopausa e anticancerígenos das lignanas e seus metabólitos." **Revista internacional de ciências moleculares**, vol. 23,24, 15482. 7 de dezembro de 2022, doi:10.3390/ijms232415482

JIT, Bimal Prasad et al. Phytochemicals: A potential next generation agent for radioprotection. **Phytomedicine**, v. 106, p. 154188, 2022.

JONES, D.A. *et al.* Changes in markers of oxidative stress and DNA damage in human visceral adipose tissue from subjects with obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, v. 106, p. 627-633, 2014.

KARADI, *et al.* Effect of Moringa oleifera Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 105:306–311. doi: 10.1016/j.jep.2005.11.004.

KOUKOURAKIS, M. Amifostine in clinical oncology: current use and future applications. **Anti-Cancer Drugs**, v. 13, n. 3, p. 181–209, mar. 2002.

KUMAR, A. et al. Reaction of Electrons with DNA: Radiation Damage to Radiosensitization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 3998, 16 ago. 2019.

KURT, B. Z. *et al.* Synthesis, antioxidant and anticholinesterase activities of novel coumarylthiazole derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 59, p. 80–90, abr. 2015.

KURUBA, V.; GOLLAPALLI, P. Natural radioprotectors and their impact on cancer drug discovery. **Radiation Oncology Journal**, v. 36, n. 4, p. 265–275, 31 dez. 2018.

LIU, L.; LIANG, Z.; MA, S.; LI, L.; LIU, X. Radioprotective countermeasures for radiation injury (Review). **Mol Med. Rep.** Mar;27(3):66. 2023. doi: 10.3892/mmr.2023.12953.

LORENZI, H; MATOS, F. J. Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, p. 346-347, 2002.

LU, Y.; LIU, Y.; YANG, C. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 128, 11 out. 2017.

MATHEUS et al. Carbohydrate-Binding Mechanism of the Coagulant Lectin from *Moringa oleifera* Seeds (cMoL) Is Related to the Dimeric Protein Structure. **Molecules**, v. 29, n. 19, p. 4615–4615, 29 set. 2024.

MEIRELES D., GOMES J., LOPES L. A review of properties, nutritional and pharmaceutical applications of *Moringa oleifera*: Integrative approach on conventional and traditional Asian medicine. *Adv. Tradit. Med.* 2020; 20:495–515. doi: 10.1007/s13596-020-00468-0

MILIAUSKAS, G., PR VENSKUTONIS E TA VAN BEEK. 2004. Triagem da atividade de eliminação de radicais de alguns extratos de plantas medicinais e aromáticas. **Food Chemistry** 85 (2): 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>.

MISHRA, K.; ALSBEIHI, G. Appraisal of biochemical classes of radioprotectors: evidence, current status and guidelines for future development. 3 **Biotech.** v.7, n. (5):292. doi: 10.1007/s13205-017-0925-0. 2017

MOBARAKEH K., et al. Evaluation of genoprotective effects of hydroalcoholic and polyphenolic extracts of Quince by comet assay. **J Rep Pharm Sci.** 2015;4(2):155–161.

MÖLLER, P. et al. Visual comet scoring revisited: a guide to scoring comet assay slides and obtaining reliable results. **Mutagenesis**, v. 38, n. 5, p. 253–263, 26 maio 2023.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, dez. 1983.

MUN, G.-I. et al. Pharmacology of natural radioprotectors. **Archives of Pharmacal Research**, v. 41, n. 11, p. 1033–1050, 25 out. 2018.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3380, 25 mar. 2021.

NASIRI M., et al. Lovastatin prevents bleomycin-induced DNA damage to HepG2 cells. **Res Pharm Sci.** 2016;11(6):470–475. doi: 10.4103/1735-5362.194876.

NEPOMUCENO, L. et al. Mecanismos de reparo aos danos no DNA nos pontos de checagem do ciclo celular. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, 2017.

OBRADOR, E. et al. Nuclear and Radiological Emergencies: Biological Effects, Countermeasures and Biodosimetry. **Antioxidants** (Basel). 31;11(6):1098. 2022. doi: 10.3390/antiox11061098.

OBRADOR, E. et al. Radioprotection and Radiomitigation: From the Bench to Clinical Practice. **Biomedicines**, v. 8, n. 11, p. 461, 30 out. 2020.

OH, J.M.; MYUNG, K. Crosstalk between different DNA repair pathways for DNA double strand break repairs. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.** 2022 Jan; 873:503438. 2021. doi: 10.1016/j.mrgentox.2021.503438.

OMER, Hiba. Radiobiological effects and medical applications of non-ionizing radiation. **Saudi journal of biological sciences**, v. 28, n. 10, p. 5585-5592, 2021.

OWENS, F. S. et al. The effects of *Moringa oleifera* on blood glucose levels: A scoping review of the literature. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 50, p. 102362, 1 maio 2020.

PALIWAL R., SHARMA V., Pracheta A Review on Horse Radish Tree (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Tree with High Economic and Commercial Importance. *Asian J. Biotechnol.* 2011; 3:317–328. doi: 10.3923/ajbkr.2011.317.328

PANDEY A., *et al.* *Moringa oleifera* Lam. (Sahijan)—A plant with a plethora of diverse therapeutic benefits: An Updated Retrospection. *Int. J. Med. Aromat.* 2012;1:1–8. doi: 10.4172/2167-0412.1000101.

POSMONTIER B. As qualidades medicinais da *Moringa oleifera*. *Holista. Enfermagem*. Pr. 2011; 25:80–87. DOI: 10.1097/HNP.0b013e31820dbb27.

RATHI B.S., BODHANKAR S.L., BAHETI A.M. Evaluation of aqueous leaves extract of *Moringa oleifera* Linn for wound healing in albino rats. *Indian J. Exp. Biol.* 2006; 44:898–901.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, maio, 1999.

ROLIM, L. A. D. M. M. *et al.* Genotoxicity Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Extract and Lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. T53–T58, 1 fev. 2011.

SALAR *et al.* New Hybrid Scaffolds based on Hydrazinyl Thiazole Substituted Coumarin; As Novel Leads of Dual Potential; In Vitro α -Amylase Inhibitory and Antioxidant (DPPH and ABTS Radical Scavenging) Activities. **Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 87–101, 4 set. 2018.

SANTIVASI, W. L.; XIA, F. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21, n. 2, p. 251-259, 2014.

SEMENTE RARA. *Moringa Oleifera - Moringa oleifera - 3 Sementes. Semente Rara*, 2024.

SGOBI, L. Avaliação das propriedades funcionais das sementes da *Moringa oleifera*. **Revista Tecnológica**, p. 237-246, 2015.

SHARMA, K. et al. *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) polysaccharides: Extraction, characterization, bioactivities, and industrial application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 763–778, jun. 2022.

SHIVAPPA, P.; BERNHARDT, G.V. Natural Radioprotectors on Current and Future Perspectives: A Mini-Review. **J Pharm Bioallied Sci.** Apr-Jun;14(2):57-71. 2022. doi: 10.4103/jpbs.jpbs_502_21.

SIDDEEG, A. et al. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 1633–1644, mar. 2021.

SILVA, J. K. et al. The water extract and the lectin WSMoL from the seeds of *Moringa oleifera* prevent the hypertension onset by decreasing renal oxidative stress. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 96, n. 4, 1 jan. 2024.

SILVA, L. A. DA et al. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, 2018.

SILVA, M. V. S. DA; PADILHA, R. T.; PADILHA, D. DE M. M. Benefícios da *Moringa oleifera* para saúde humana e animal: Revisão de Literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e50010817495, 16 jul. 2021.

SILVA, W.J.M.; FERRARI, C.K.B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, v. 14, p. 441-451, 2011.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**. 175:184–91. 1988.

SIQUEIRA, W. N. et al. Study of the Potential Radiomitigator Effect of Quercetin on Human Lymphocytes. **Inflammation**, v. 42, n. 1, p. 124–134, 1 set. 2018.

TAUHATA, L., Salati, I. P. A., Di Prinzio, R., Di Prinzio, M. A. R. R. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. 10ª revisão abril/2014. Rio de Janeiro. IRD/CNEN. 2014.

TOHS S.J., HARTMAN M.J. Revisão da Segurança e Eficácia da *Moringa oleifera*. **Fitoter. Res.** 2015; 29:796–804. DOI: 10.1002/Ptr.5325

TOMBA, M. L. M.; DIAZ, B. F.; GUERGOLETT, K. B. EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF JUÇARA EXTRACTS BEFORE AND AFTER FERMENTATION. Ed 2°. **Athena**. Cap 1. Pg. 1-14. 2023

UTTARA, B. *et al.*, Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.*, v. 7, p. 65-74, 2009.

VERA-NUÑEZ, N. et al. Water-soluble lectin (WSMoL) from *Moringa oleifera* seeds treatment recovers glycemic levels and improves left ventricular ejection fraction on Type-2 Diabetes mice model. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 3, 2021.

WANG, Q.; XIE, C.; XI, S.; QIAN, F.; PENG, X.; HUANG, J.; TANG, F. Radioprotective Effect of Flavonoids on Ionizing Radiation-Induced Brain Damage. **Molecules**. v.3, n. 25(23):5719. doi: 10.3390/molecules25235719. 2020.

ZHANG, D. et al. Microalgae-based oral microcarriers for gut microbiota homeostasis and intestinal protection in cancer radiotherapy. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 17 mar. 2022.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL RADIOMODIFICADOR E IMUNODULADOR DE LECTINAS EXTRAÍDAS DE EXTRATOS VEGETAIS

Pesquisador: OSANA DINIZ FERREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50965221.5.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.024.293

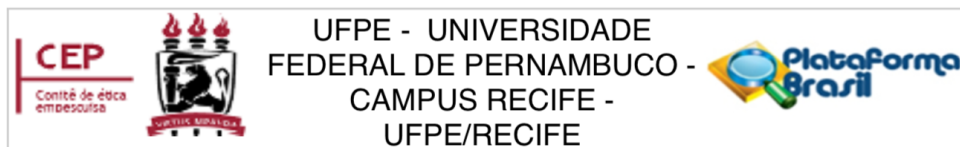
Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de tese da Doutoranda OSANA DINIZ FERREIRA sob a orientação da Professora ANA MARIA MENDONÇA DE ALBUQUERQUE MELO vinculada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O projeto será realizado no Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. A proposta consiste basicamente na análise da hipótese: As lectinas SteLL, MoFTI e MvFL obtidas de extratos vegetais apresentam atividades radioprotetoras e/ou imunomodulatórias in vitro e in vivo. Para este fim realizar-se-á um estudo com 20 participantes voluntários saudáveis, de ambos os sexos e com faixa etária de 18 a 55 anos. De cada um dos participantes voluntários serão coletadas amostras de 10 ml de sangue. Posteriormente cada amostra sanguínea será processada com metodologia adequada para isolamento e cultivo das células mononucleares. As células mononucleares serão utilizadas para avaliação da citotoxicidade e efeito radioprotetor das lectinas. Os critérios de inclusão e exclusão dos voluntários estão devidamente delineados. Os dados serão analisados estatisticamente empregando o programa STATA v.12. Adicionalmente todos os dados serão mantidos em sigilo e armazenados por um período de 5 anos, sob a responsabilidade da pesquisadora principal.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.024.293

Avaliar a ação radiomodificadora das lectinas SteLL, MoFTI e MvFL obtidas de extratos vegetais de folhas de *Schinus terebinthifolia*, flores de *Moringa oleifera* e de folhas de *Microgramma vacciniifolia*, respectivamente.

Objetivos secundários:

- 1- Determinar a ação antioxidante das lectinas, por meio do método ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico);
- 2- Avaliar a citotoxicidade, por meio do teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolína) para diferentes concentrações das lectinas, em cultura de células mononucleares do sangue periférico;
- 3- Analisar a atividade radioprotetora das lectinas estudadas por meio das técnicas de aberrações cromossômicas; teste do micronúcleo e o ensaio cometa;
- 4- Determinar e quantificar a expressão de citocinas pró-inflamatória (IL-17A, IL-2, IL-4, TNF e IFN-gama) em células PBMC por meio da técnica Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) após exposição à radiação ionizante e a lectinas e desta forma determinar o seu efeito inibidor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão devidamente delineados na folha de informações da pesquisa, no projeto de pesquisa e no termo de consentimento livre e esclarecido. Os riscos inerentes à participação pode ser: (1) durante a coleta sanguínea, que obedecerá aos requisitos de segurança e assepsia, os voluntários poderão sentir uma ardência local e, eventualmente, após coleta, poderá se formar um hematoma, que desaparecerá em poucos dias. Esse risco pode ser minimizado utilizando compressa de gelo logo após a coleta.

Quanto aos benefícios, haverá os indiretos consistindo em que futuramente novos agentes protetores possam ser desenvolvidos e comercializados para uso na rotina clínica de centros médicos nucleares, seja em pacientes ou indivíduos ocupacionalmente expostos à radiação ionizante. Adicionalmente todos os dados serão mantidos em sigilo e armazenados por um período de 5 anos, sob a responsabilidade da pesquisadora principal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma temática atual e interessante para comunidade em geral, pois, visa o desenvolvimento de radioprotetores que possam ser utilizados em centros hospitalares ou em unidades de produção de radiofarmacos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As cartas de anuências, currículos, termo de compromisso e confidencialidade, termo de

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

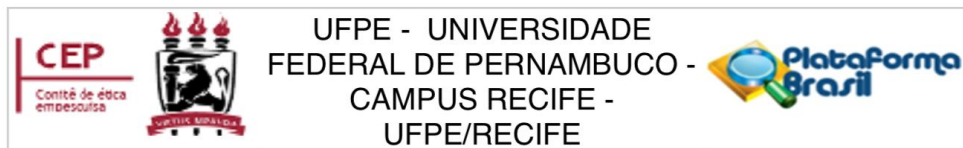
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.024.293

consentimento livre e esclarecido estão anexados na plataforma brasil. A folha de rosto está assinada e carimbada pela Coordenação da Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O orçamento de aproximadamente 2.500,00 reais será de responsabilidade da pesquisadora principal. O cronograma é compatível para a execução do projeto e consta que a coleta de dados somente iniciará após aprovação pelo comitê de ética.

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	29/09/2021		Aceito

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.024.293

Básicas do Projeto	ETO_1808202.pdf	11:27:18		Aceito
Outros	CARTARESPOSTA.docx	29/09/2021 11:25:07	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOdetalhado.doc	29/09/2021 11:24:45	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.doc	29/09/2021 11:24:28	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTOASSINADA.pdf	29/09/2021 11:23:34	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	anuenciaUsodedados.pdf	18/08/2021 16:54:49	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	Anuencia.pdf	18/08/2021 16:54:21	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	DeclUsoDados.pdf	12/08/2021 19:53:58	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	TermoConfidencialidade.pdf	12/08/2021 19:53:23	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	historicoOsanaDiniz.pdf	12/08/2021 19:53:00	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	CurriculoAna.pdf	12/08/2021 19:52:39	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	CurriculoMercia.pdf	12/08/2021 19:52:18	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito
Outros	CurriculoOsana.pdf	12/08/2021 19:51:29	OSANA DINIZ FERREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 07 de Outubro de 2021

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br