



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIAS E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

LUIZ DA SILVA MAIA NETO

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE A TOXICIDADE DO EXTRATO DAS
FOLHAS DE *Libidibia ferrea***

Recife
2018

LUIZ DA SILVA MAIA NETO

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE A TOXICIDADE DO EXTRATO DAS
FOLHAS DE *Libidibia ferrea*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

Coorientadora: Prof^a Dr^a Ivone Antônia de Souza

Recife

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

- M217i Maia Neto, Luiz da Silva.
Influência da radiação gama sobre a toxicidade do extrato das
folhas de *Libidibia ferrea*. / Luiz da Silva Maia Neto. - Recife, 2018.
67 f. : il., figs., gráfs., tabs.
- Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral.
Coorientadora: Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e
Nucleares, 2018.
Inclui referências e anexo.
1. Engenharia Nuclear. 2. Fitoterápicos. 3. *Libidibia ferrea*. 4.
Pau ferro. 5. Irradiação gama. I. Amaral, Ademir de Jesus, orientador.
II. Souza, Ivone Antônia de, coorientadora. III. Título.

LUIZ DA SILVA MAIA NETO

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE A TOXICIDADE DO EXTRATO DAS
FOLHAS DE *Libidibia ferrea*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 31/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral (Orientador)

DEN/UFPE

Dra. Edvane Borges da Silva (Examinadora Interna)

DEN/UFPE

Dra. Simey de Souza Leão Pereira Magnata (Examinadora Externa)

CAV/UFPE

Dr. Antônio Fernando Moraes de Oliveira (Examinador Externo)

Dep. Botânica/UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por me dar força, coragem e saúde para realizar mais este sonho;

A minha família, em especial a minha mãe, Ivonete, meu pai, Damião e minha irmã, Luana.

Ao Professor Dr. Ademir Amaral, meu orientador, por ter me aceito sem me conhecer e sem saber o que esperar de mim, pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho, pela orientação, pela paciência, pelo exemplo profissional e pelos ensinamentos que certamente procurarei transmiti-los. A ti, meu respeito e admiração;

As professoras Dras. Simey Magnata e Edvane Borges pela amizade, auxílio e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Professor Dr. Antônio Fernando/UFPE pelo auxílio e disponibilidade de seu laboratório e equipamentos;

A Professora Ivone de Souza pela contribuição e auxílio na parte experimental;

A Professora Dra. Maria Rita Cabral/UFRPE pela exsicata da espécie utilizada neste estudo;

Ao Professor André Maciel pela confiança ao disponibilizar seu laboratório e equipamentos;

A secretaria do PROTEN, Nilvânia, Kalydja e Adelmo, por toda ajuda e paciência;

A colega de laboratório Amanda Iumatti por me aturar todos os dias;

Ao técnico do LAMBDA Luciano Rodolfo, pelo auxílio na parte experimental e na correção do texto, além de muita paciência por aturar Amanda e eu, todos os dias;

A dona Lia, pelos lanches que salvam nossas vidas, além de paciência e muito bom humor;

Aos amigos, François Talles, Fátima Rodrigues, Camila Joyce, João Bosco, Pedro Elias, Vanessa Almeida, Carol Lopes, Benaia Gonçalves, Robson Raion, Ertenia Paiva e José Carlos pelos bons momentos, carinho e amizade;

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares e
ao Departamento de Energia Nuclear da UFPE;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

Um obrigado a todos, do fundo do meu coração!

RESUMO

O emprego da fitoterapia tem crescido nos serviços públicos de saúde no Brasil. Desta forma, considerando a biodiversidade brasileira como fonte de medicamentos, é evidente a importância de pesquisas que objetivem potencializar o emprego de fitoterápicos. Neste sentido, estudos têm demonstrado que a irradiação de materiais de origem vegetal pode desencadear mudanças físico-químicas peculiares em diferentes espécies e partes de plantas, resultando em aumento dos teores de flavonas, fenóis totais e taninos e, conseqüentemente, sugerindo as aplicações das radiações ionizantes na obtenção de matéria prima para indústria farmacêutica. Neste contexto, esta pesquisa buscou avaliar a influência do processo de irradiação do extrato de folhas de *Libidibia ferrea* (popularmente: Pau ferro) na transformação de metabólitos secundários, incluindo sua atividade tóxica, após exposição a uma fonte de Co-60. Para tanto, as folhas foram coletadas e preparadas para obtenção de extrato que, em seguida, foi alíquotado e, separadamente, exposto a diferentes doses de radiação gama, a saber: 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy. Nesta pesquisa, utilizou-se como controle uma alíquota de extrato não irradiado. Na caracterização do perfil fitoquímico do extrato bruto e irradiado, foram utilizadas as técnicas de CCD, UPLC-MS e GC-MS. Para cada amostra irradiada, a toxicidade foi avaliada em ensaios contendo o microcrustáceo *Artemia salina* Leach, considerando diferentes concentrações de extrato irradiado e não irradiado, a saber: 12,5; 25; 50 e 100 µg.mL⁻¹. Esses ensaios foram feitos em três momentos: logo após a irradiação do extrato, bem como 60 e 180 dias depois. Os resultados mostraram um aumento dos níveis de toxicidade do extrato com a dose de radiação, não se alterando com o tempo de estocagem, indicando uma boa estabilidade do material irradiado em relação ao tempo de prateleira. Os ensaios fitoquímicos evidenciaram a presença de moléculas pertencentes as mais diversas classes, como, fenóis totais, triterpenos, entre outras, nos ensaios quantitativos, a radiação foi capaz de quebrar as macromoléculas em moléculas menores. Os resultados desta pesquisa evidenciam a importância da radiação ionizante no processo de potencialização das propriedades tóxicas de extratos de plantas, motivando futuras investigações em torno da ação do extrato irradiado de *Libidibia ferrea* em células cancerígenas.

Palavras-Chave: Fitoterápicos. *Libidibia ferrea*. Pau ferro. Radiação Gama.

ABSTRACT

The use of phytotherapy has grown in public health services in Brazil. Thus, considering the Brazilian biodiversity as a source of drugs, it is evident the importance of researches that aim to potentiate the use of herbal medicines. In this sense, studies have shown that the irradiation of materials of plant origin can trigger peculiar physicochemical changes in different species and parts of plants, resulting in an increase in the levels of flavones, total phenols and tannins and, consequently, suggesting the applications of ionizing radiation agents in obtaining raw material for the pharmaceutical industry. In this context, this research was aimed at evaluating the influence of the irradiation process of the leaf extract of *Libidibia ferrea* (popularly: Pau ferro) on the formation of secondary metabolites, including its toxic activity, after exposure to a Co-60 source. The leaves were collected and prepared to obtain the extract, which was then aliquoted and separately exposed to different doses of gamma radiation, namely: 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 and 30 kGy. In this research, an aliquot of non-irradiated extract was used as control. In the characterization of the phytochemical profile of the crude and irradiated extract, the techniques of TLC, LCCM-MS and GC-MS. For each irradiated sample, the toxicity was evaluated in tests containing the microcrustacea *Artemia salina* Leach, considering different concentrations of irradiated and non-irradiated extract, namely: 12.5; 25; 50 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. These tests were done in three moments: soon after the irradiation of the extract, as well as 60 and 180 days later. The results showed an increase in the toxicity levels of the extract with the radiation dose, not changing with the storage time, indicating good stability of the material regarding shelf life. The phytochemical tests evidenced the presence of molecules belonging to the most diverse classes, such as total phenols, triterpenes, among others, in the quantitative tests, the radiation was able to break the macromolecules into smaller molecules. The results of this research evidenced the importance of ionizing radiation in the process of potentiation of the toxic properties of plant extracts, motivating future investigations about the action of irradiated extract of *Libidibia ferrea* on cancer cells.

Key words: Phytotherapics. *Libidibia ferrea*. Brazilian ironwood. Gamma radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Libidibia ferrea</i> , aspectos gerais de: (A); folhas (B); flores (C); fruto (D); sementes de <i>L. ferrea</i> (E).....	19
Figura 2 –	Principais vias de biossíntese dos metabólitos secundários.....	21
Figura 3 –	Estrutura da molécula de ácido gálico, composto pertencente à classe dos fenóis.....	22
Figura 4 –	Estrutura química de alguns terpenos com os resíduos de isopreno em destaque, exemplificando a “regra do isopreno”.....	23
Figura 5 –	Representação esquemática das duas rotas metabólicas referente à síntese de terpenos/terpenoides: via do mevalonato e via do 1-desoxixilulose-5-fosfato (DXP).....	24
Figura 6 –	Representação esquemática dos terpenos, de acordo com o número de unidades de isopreno.....	26
Figura 7 –	Folhas de <i>Libidibia ferrea</i>	34
Figura 8 –	Extrato hidroalcoólico de <i>Libidibia ferrea</i> durante os processos de filtração (A) e rotaevaporação (B).....	35
Figura 9 –	Irradiador Gammacell Cobalt-60 pertencente ao Departamento de Energia Nuclear - UFPE.....	37
Figura 10 –	Incubadora para os ovos de <i>Artemia salina</i> contendo água do mar a 25°C, com iluminação artificial e aeração constante, parcialmente coberta (A); tubos de ensaio contendo diferentes concentrações de extrato irradiado a diferentes doses para avaliar a toxicidade <i>in vitro</i> (B).....	38

Figura 11 –	<i>Artemia salina</i> Leach.	38
Figura 12 –	Esquema representativo da Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	40
Figura 13 –	Quantidade de indivíduos de <i>Artemia salina</i> vivos após teste de toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Libidibia ferrea</i> para a concentração de 12,5 µg / mL submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy) em três momentos distintos (após a irradiação; 60 e 180 dias depois).....	42
Figura 14 –	Quantidade de indivíduos de <i>Artemia salina</i> vivos após teste de toxicidade do extrato de folhas de <i>Libidibia ferrea</i> para a concentração de 25 µg / mL submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy) em três momentos distintos (após a irradiação; 60 e 180 dias depois).....	43
Figura 15 –	Quantidade de indivíduos de <i>Artemia salina</i> vivos após teste de toxicidade do extrato de folhas de <i>Libidibia ferrea</i> para a concentração de 50 µg / mL submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy) em três momentos distintos (após a irradiação; 60 e 180 dias depois).....	43
Figura 16 –	Quantidade de indivíduos de <i>Artemia salina</i> vivos após teste de toxicidade do extrato de folhas de <i>Libidibia ferrea</i> para a concentração de 100 µg / mL submetida a diferentes doses de radiação gama (0, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy) em três momentos distintos (após a irradiação; 60 e 180 dias depois).....	44

Figura 17 –	Quantidade de indivíduos de <i>Artemia salina</i> vivos após teste de toxicidade do extrato de folhas de <i>Libidibia ferrea</i> na dose de 30 kGy para concentrações menores (10; 7,5; 5 e 2,5 µg / mL) em três diferentes tempos (1º teste; 60 e 180 dias após).	45
Figura 18 –	Representação gráfica dos cromatogramas UPLC-MS dos extratos bruto (A) e irradiados a 10 (B), 20 (C) e 30 (D) kGy de <i>Libidibia ferrea</i>	50
Figura 19 –	Representação gráfica dos picos de (1) Ácido Pentanóico (36.408 Min), (2) Ácido Valérico (38.125 Min) e (3) 1-Trimetilsiloxi-3,7,11,15 (42.642 min) do extrato não irradiado de <i>Libidibia ferrea</i> obtidos pelo método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	51
Figura 20 –	Representação gráfica dos picos de (1) Estér de ciclohexil-isobutilico (7,233 min), (2) 1-Buteno (7,425 min), (3) Estér 1-Metiletílico (7,575 min), (4) Ciclohexano (9,308) e (5) Etanona (10.117) da amostra irradiada de <i>Libidibia ferrea</i> na dose de 10 kGy obtidos pelo método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	52
Figura 21 –	Representação gráfica dos picos de (1) Éster Metil (36,392 min), (2) Ácido Tridecanóico (38,117 min), (3) Ciclo- hexilideno (40,542 min), (4) Éster Metil (40,700), (5) Ácido 9,12,15-Octadecatrienóico (42,267) e (6) Silano (42,625) da amostra irradiada na dose de 20 kGy obtidos pelo método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	52

Figura 22 – Representação gráfica dos picos de (1) Éster de Ciclobutilo (5,850 min), (2) Éster Pentil de Ciclohexil (7,225 min), (3) Éster Metil (7,408 min), (4) Éster Metil (10,092), (5) Éster Metil (36,392), (6) Éster Metil (40,700) e (7) Éster Metil (41,325) da amostra irradiada a uma dose de 30 kGy obtida pelo método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais classes de alcaloides sintetizados pelas plantas.....	28
Tabela 2 –	Fases móveis e Padrões para determinação qualitativa da presença de metabólitos secundários em extrato vegetal (<i>L. ferrea</i>).....	46
Tabela 3 –	Deteção de classes de substâncias químicas presentes no extrato de folhas de <i>Libidibia ferrea</i> pelo método cromatográfico de camada delgada (CCD).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM	Câmara Climática Com Atmosfera Controlada
CHS	Enzima Chacora Sintase
CO ₂	Gás Carbônico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DMAPP	Demetilatil Pirofato
DO	Densidade óptica
EHLF	Extrato Hidroalcólico de <i>Libidibia ferrea</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Agência reguladora de medicamentos dos Estados Unidos
FPP	Farnesil Pirofato
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura
GPP	Geranil Pirofato
IP	Isopreno
IPP	Isopentinil Pirofato
Ir ¹⁹²	Írídio 192
K	Potássio
kGy	Quilogray
L. FERREA	<i>Libidibia férrea</i>
MVA	Melavonato
N	Nitrogênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAL	Enzima Fenilalanina-amônia-liase
PEP	Fosfoenol Piruvato
Phe	Fenilalanina
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RPM	Rotações por Minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
T _R	Taxa referencial
Tyr	Tirosina

UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
UV	Ultra-Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo geral.....	14
1.1.2	Objetivos específicos.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	PLANTAS DE USO MEDICINAL.....	15
2.2	FAMÍLIA FABACEA (LEGUMINOSEA).....	16
2.2.1	<i>Libidibia ferrea</i>	18
2.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VEGETAIS.....	20
2.3.1	Compostos Fenólicos.....	22
2.3.2	Terpenos.....	23
2.3.3	Alcalóides.....	27
2.4	EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM MATERIAL DE ORIGEM VEGETAL.....	29
2.5	ESTUDO DA TOXICIDADE E O USO DA ARTEMIA SALINA LEACH COMO INDICADOR BIOINDICADOR.....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	AMOSTRAGEM.....	34
3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	34
3.3	PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO.....	35
3.4	IRRADIAÇÃO DO EXTRATO.....	36
3.5	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE POR ARTEMIA SALINA LEACH.....	37
3.6	ANÁLISE DO PERFIL FOTOQUÍMICO.....	39
3.6.1	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	39
3.6.2	Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS).....	40
3.6.3	Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	TOXICIDADE E ESTABILIDADE DO MATERIAL.....	41

4.2	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	46
4.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (UPLC-MS).....	48
4.4	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS).....	51
5	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO A.....	67

1 INTRODUÇÃO

O emprego da fitoterapia tem crescido nos serviços públicos no Brasil, os quais apresentam programas para difundir práticas de cultivo de plantas para uso medicinal, para produção de fitoterápicos e para recomendações do uso a partir do diagnóstico médico. Todavia, não existem estudos suficientes para garantir a segurança de ingestão de algumas plantas utilizadas na medicina popular (ALCANTARA *et al.*, 2015).

Buscando evitar impactos negativos, a toxicologia avalia os possíveis efeitos prejudiciais das substâncias químicas ao organismo vivo, observando e analisando a resposta destas substâncias a nível tissular, celular e molecular. Obviamente, o princípio fundamental desta área do conhecimento é investigar os riscos da exposição humana frente aos diversos produtos buscando estabelecer os níveis de segurança ou limites seguros de exposição (KLAASSEN; WATKINS, 2012).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 60 a 80% da população de países considerados em desenvolvimento utilizam plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993). Isso pode ser reflexo de inúmeros fatores, como o alto custo dos medicamentos considerados tradicionais e a dificuldade desses medicamentos em chegarem às unidades básicas de saúde (RODRIGUES; CARLINI, 2002).

Com base nos trabalhos de Fukumasu e colaboradores (2008) e Brandão e colaboradores (2010), inúmeros estudos utilizando compostos ativos de plantas têm demonstrado ótimos resultados quanto aos seus efeitos terapêuticos. Por exemplo, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida também como Vinca, era bastante utilizada pela população da ilha de Madagascar, localizada no sul da África, no tratamento de inúmeras moléstias.

Estudos desta espécie levaram ao isolamento dos alcaloides vimblastina e vincristina que, atualmente, possuem grande utilidade no tratamento de várias neoplasias malignas, como: linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, leucemia linfoblástica aguda infantil e câncer de ovário e testículos (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Por outro lado, cerca de apenas 20% das espécies de plantas disponíveis no Brasil têm sido estudadas – o que mostra a necessidade de se investigar, desenvolver e introduzir no âmbito terapêutico, novos compostos para o tratamento de doenças.

Dentre as espécies de planta ainda pouco estudada encontra-se a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea*, uma árvore típica da caatinga e popularmente conhecida como pau-ferro ou Jucá. Esta planta possui inúmeras características medicinais, auxiliando no tratamento de diversas doenças, devido à existência de várias propriedades, como: anti-ulcerogênicas, anti-inflamatórias, anticancerígenas, anti-histamínicas, antimicrobianas, anticoagulantes, cicatrizantes, hipoglicêmicas e larvicida contra o *Aedes aegypti* (SILVA; SILVA; MAIA, 2014; SILVA *et al.*, 2014).

Essas propriedades que conferem o poder terapêutico da *L. ferrea* resultam da presença de compostos secundários como saponinas, flavonoides, cumarina, antraderivados, fenóis, taninos, quinonas, triterpenos, alcaloides e lactonas-sesquiterpênicas (SILVA, 2014).

Atividades em pesquisa, desenvolvimento e inovação que disponibilizem terapias alternativas e de baixo custo nos procedimentos curativos de doenças consideradas graves e comuns entre a população terão impactos diretos nas políticas públicas de saúde (FLOGIO *et al.*, 2006; COSTALOTUFO *et al.*, 2010).

Vários trabalhos têm demonstrado que a irradiação de materiais de origem vegetal pode desencadear mudanças físico-químicas peculiares a cada espécie. Alguns autores observaram que a radiação gama provoca o aumento dos teores de flavonas, fenóis totais e taninos, motivando aplicações das radiações para obtenção de matéria-prima para indústria farmacêutica (STAJNER *et al* 2007; SANTOS *et al.*, 2011).

Nesse sentido, processos que potencializem as ações terapêuticas de plantas, e de maneira a potencializar os aspectos tóxicos de espécies vegetais sobre células prejudiciais ao organismo humano, despertam o interesse em várias áreas do conhecimento.

A capacidade das radiações ionizantes de potencializar alterações físico-químicas após interação com espécies vegetais, aliada às propriedades terapêuticas da *L. ferrea*, motivaram esta pesquisa.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade tóxica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Libidibia ferrea*, após exposição à radiação gama.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de toxicidade dos extratos irradiados em função das doses de radiação;
- Caracterizar o perfil fitoquímico do extrato bruto e irradiado;
- Avaliar possíveis alterações dos níveis de toxicidade dos extratos irradiados em função do tempo de estocagem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS DE USO MEDICINAL

As práticas médicas populares utilizam elementos naturais que, na maioria das vezes, são os únicos recursos disponíveis nos ambientes onde estão instaladas as comunidades. A constante busca por novos medicamentos com base nestas práticas tradicionais tem-se mostrado eficaz no tratamento de inúmeras moléstias (ROQUE *et al.*, 2010).

O Brasil é um dos países mais ricos quando se trata de sua biodiversidade vegetal, isso por comportar aproximadamente 20% do número total de espécies do mundo (MACIEL *et al.*, 2002; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). O número de espécies estão descritos entre 300.000 e 500.000, destas, aproximadamente 50.000 estão catalogadas e distribuídas entre as diferentes regiões do país. Grande parte desta diversidade de espécies ainda não foi investigada cientificamente em relação às suas ações terapêuticas, embora este processo venha evoluindo de forma significativa (OLIVEIRA *et al.*, 1997; SIMÕES *et al.*, 2010).

No Nordeste, as pesquisas etnobotânicas se encontram intensificadas principalmente em áreas da caatinga no estado de Pernambuco. Entretanto, ainda são poucos os estudos realizados em outros estados nordestinos (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). No estado do Pernambuco, por exemplo, existe um considerável número de erveiros, pessoas que trabalham nos mercados e indicam as plantas medicinais a serem utilizadas para cada tipo de doença (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007), assim como os diversos modos de preparo, que podem ser na forma de infusão, maceração, decocção (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007), lambedor e uso tópico (ALVES *et al.*, 2007).

De acordo com Drumond e colaboradores (2000), plantas como o pau-ferro (*Libidibia ferrea*), o sabiá (*Mimosa caesalpinifoli* Benth.), o angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan), a aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.Allemão), o juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), e o marmeleiro (*Croton sonderianus* Muell. Arg.), entre outras, se destacam como espécies de plantas medicinais na caatinga, sendo usadas pela população em função das diversas propriedades curativas que apresentam.

Contudo, o indiscriminado uso desses vegetais pode ser prejudicial à saúde, devido aos efeitos colaterais e às intoxicações (ALVES *et al.*, 2007). Além disso, o uso extrativista pode induzir a prática da coleta excessiva de partes das plantas (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002). Por isso, a importância do manejo feito de forma apropriada, o cultivo e a domesticação de espécies medicinais são alternativas para a obtenção de matéria-prima de interesse farmacêutico, diminuindo assim, o extrativismo descontrolado (REIS *et al.*, 2003).

Em 22 de junho de 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo decreto de número 5.813, estabeleceu diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações pelos diversos parceiros em torno de objetivos comuns, voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como o fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

Em linha com esta pesquisa, alternativas biotecnológicas devem ser estudadas visando o estabelecimento do cultivo das plantas mais utilizadas como medicinais pela população. Pesquisas multidisciplinares envolvendo as áreas de fitoquímica, farmacologia, etnobotânica, química orgânica sintética e química medicinal viabilizam e validam de forma prévia o uso terapêutico de plantas medicinais, levando à descoberta de novos medicamentos (MACIEL *et al.*, 2002).

De uma forma geral, as plantas mais cultivadas pela população envolvem exemplares de espécies que compreendem a família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae. As espécies desta família se destacam por apresentar inúmeros benefícios para a população, tanto na área medicinal quanto na ambiental (SOUZA; LORENZI, 2005; SILVA, 2014).

2.2 FAMÍLIA FABACEAE (LEGUMINOSEA)

A família Fabaceae é uma das mais abundantes, com aproximadamente 730 gêneros e cerca de 19.400 espécies, o que representa 9,4% das eudicotiledôneas (STEVENS, 2006). Em florestas com o clima predominantemente úmido, como a Amazônia, 16% da flora é composta por exemplares dessa família, considerada a mais abundante nesses ambientes (BURNHAM; JOHNSON, 2004). Mundialmente, é

a terceira maior família das Angiospermas, atrás de Asteraceae e Orchidaceae (POLHILL *et al.*, 1981; GUNN, 1984; JUDD *et al.*, 1999) e em relação à sua importância na economia, é precedida apenas por Poaceae (GUNN, 1984).

No Brasil, são registradas cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies de leguminosas, estando entre as famílias mais ricas na maioria dos ecossistemas brasileiros (SOUZA; LORENZI, 2005). Na Caatinga do estado de Pernambuco, ocorrem 77 gêneros e mais de 290 espécies, constituindo cerca de um terço da riqueza do bioma (CÓRDULA, 2010).

Os exemplares desta família são caracterizados por possuírem folhas compostas e alternas, geralmente com estípulas, podendo ter pulvino na base. As inflorescências são indefinidas, normalmente racemosas, podendo apresentar flores vistosas ou não, quase sempre bissexuadas e simetria variada. A prefloração é valvar, o ovário é súpero e unicarpelar, podendo existir também 2-16 carpelos separados, a placentação é marginal e o número de óvulos variado (CRONQUIST, 1981; SOUZA; LORENZI, 2005; STEVENS, 2006).

Tipicamente o fruto da família é o legume, mas podem surgir vários outros, por exemplo vagens e sementes. Várias espécies são utilizadas na alimentação, como o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e a soja (*Glycine max* Merr.), enquanto outras são usadas como adubos quando se associam a bactérias que tem a capacidade de fixar o nitrogênio. Existem ainda espécies ornamentais, como a tipuana (*Tipuana tipu* (Benth.) Kuntze), o flamboyant (*Delonix regia* (Bojer) Raf.) e a pata-de-vaca (*Bauhinia variegata* L.). Outras espécies, como a cerejeira (*Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm.) e o angico (*Anadenanthera sp.*, Speg.), podem ser utilizadas para extração de madeira. O sansão-do-campo (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.), por sua vez, devido ao seu crescimento rápido, é normalmente utilizado como cerca-viva (SOUZA; LORENZI, 2005).

Pesquisas nesse âmbito vêm ganhando muito espaço no mundo científico, fazendo com que os pesquisadores comecem a dar uma maior importância para as características particulares das espécies desta família, que podem vir a fornecer inúmeros benefícios à comunidade de uma forma geral. Como exemplo, pode-se citar o pau-ferro (*Libidibia ferrea* var. *ferrea*), normalmente utilizado pela população no tratamento de doenças crônicas e imunológicas, como o diabetes mellitus tipo II (SILVA, 2014).

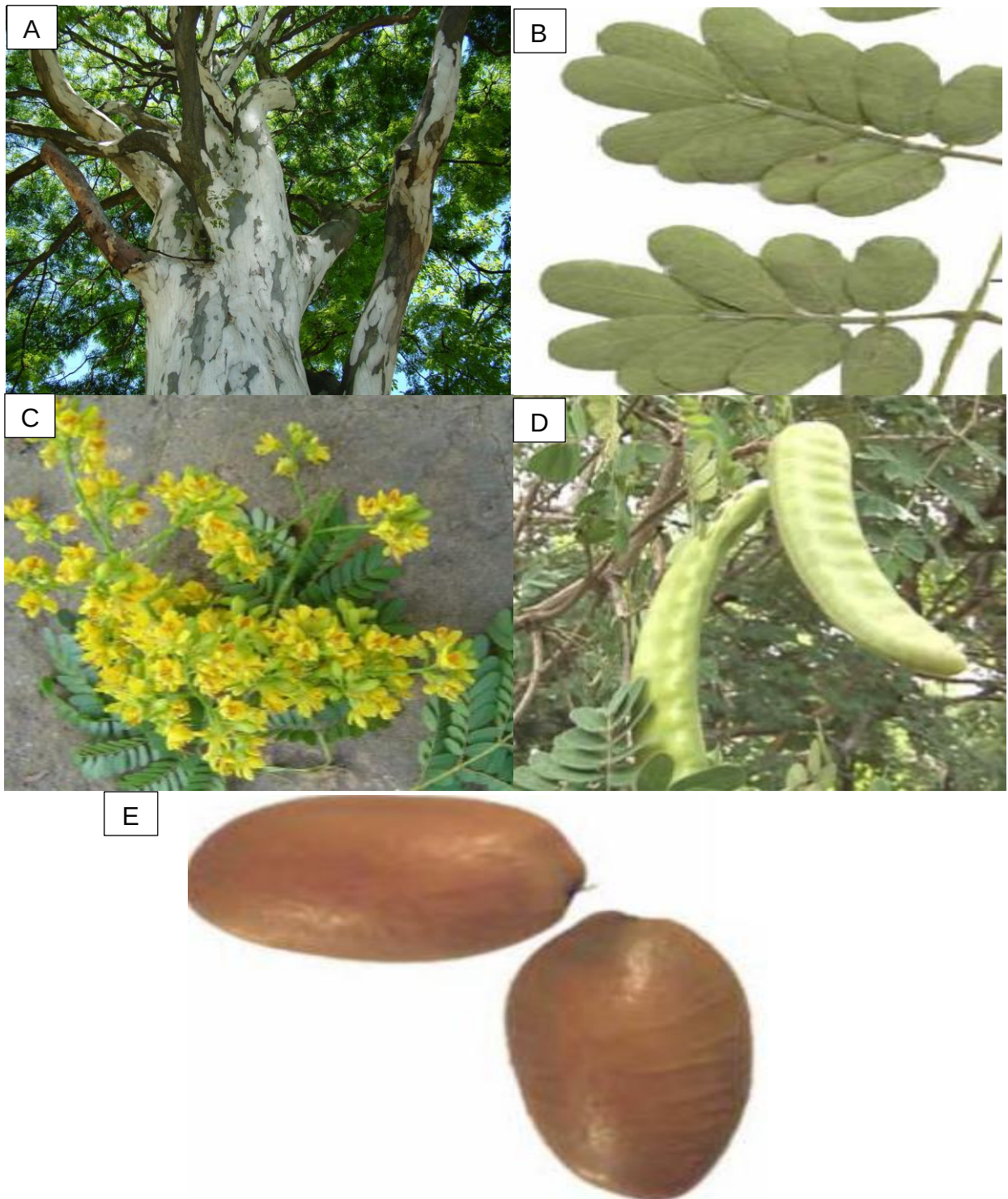
2.2.1 *Libidibia ferrea*

Espécie arbórea predominante da caatinga, possui inúmeras características medicinais, e vem auxiliando a população no tratamento de diversas doenças. Isso se deve às suas propriedades anti-inflamatórias, anti-cancerígenas, cicatrizante, hipoglicemiante, entre outras. Essas características estão relacionadas com a presença de metabólitos secundários, os quais são divididos em três grandes grupos: terpenos, fenóis e alcaloides, que serão apresentados de maneira completa mais adiante (SILVA; SILVA; MAIA, 2014; SILVA *et al.*, 2014).

Como particularidades físicas, a árvore atinge de 5 a 7 m de altura, possuindo tronco com diâmetro de 10 a 30 cm (Figura 1A). A casca é cinza-escuro, lisa e fina; as folhas (Figura 1B) são verde escuro na face adaxial e verde claro na parte abaxial, alternas, constituídas de 2 a 4 pares de pinas e cada pina possui de 4 a 6 pares de folíolos menores, oblongos e glabros (MAIA, 2004). Há presença de tricomas glandulares de coloração vermelha escura, dispersas na face abaxial nas folhas da plântula (GALDINO *et al.*, 2007). As flores (Figura 1C) são pequenas e amarelas, em panículas. O fruto (Figura 1D) é uma vagem, com 6-8 cm de comprimento e aproximadamente 1,5 cm de largura, coriácea e com polpa seca. As sementes são marrons e duras, conforme mostra a Figura 1E (MAIA, 2004).

Devido ao amplo uso popular e à presença de vários metabólitos secundários, como as saponinas, flavonoides, cumarina, antraderivados, fenóis, taninos, quinonas, triterpenos e alcaloides, a *L. ferrea* foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) (Rensis) divulgada pelo Ministério da Saúde em fevereiro de 2009 (BRASIL, 2009; SILVA, 2014).

Figura 1 - *Libidibia ferrea*, aspecto geral de: (A); folhas (B); flores (C); fruto (D); sementes de *L. ferrea* (E).



Fonte: <https://www.flickr.com/photos/><acesso em junho de 2017>

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VEGETAIS

O metabolismo representa o conjunto de reações químicas que está sempre ocorrendo em cada uma das células. Os compostos químicos que são degradados, formados ou transformados são nomeados de metabólitos (SIMÕES *et al.*, 2010), que por sua vez, podem ser divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários e os secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). O metabolismo primário engloba as várias reações químicas envolvidas na transformação de moléculas de nutrientes nas unidades constitutivas essenciais da célula (WATSON, 1965), reações essas que, se encontram envolvidas na manutenção fundamental da sobrevivência e do desenvolvimento celular (DIXON, 2001).

Os metabólitos secundários são substâncias originadas em menores quantidades, e, em comparação com os primários, não necessariamente estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo obrigatoriamente presente em todos eles. Além disto, são conhecidos por serem sintetizados em tipos celulares especializados e em diferentes etapas do desenvolvimento, tornando seu isolamento e purificação mais difíceis e trabalhosos. Estes constituintes químicos são extremamente diversificados: cada família, gênero, e espécie produz uma categoria química característica ou uma mistura delas, e elas, por vezes, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos para classificação das plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

A síntese dos metabólitos secundários é influenciada por vários fatores, como por exemplo, a sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, fatores estes que podem alterar a quantidade e, muitas vezes, até a natureza dos constituintes ativos presentes no vegetal (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Por isso, “como e quando um vegetal é coletado” é um dos requisitos de maior importância, visto que, as variações podem coordenar ou alterar a produção desses metabólitos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

Pesquisas sobre os metabólitos foram iniciadas pelos químicos orgânicos no final do século XIX e início do século XX, persistindo até os dias de hoje em vários campos da ciência em razão da busca por moléculas potencialmente úteis ao ser

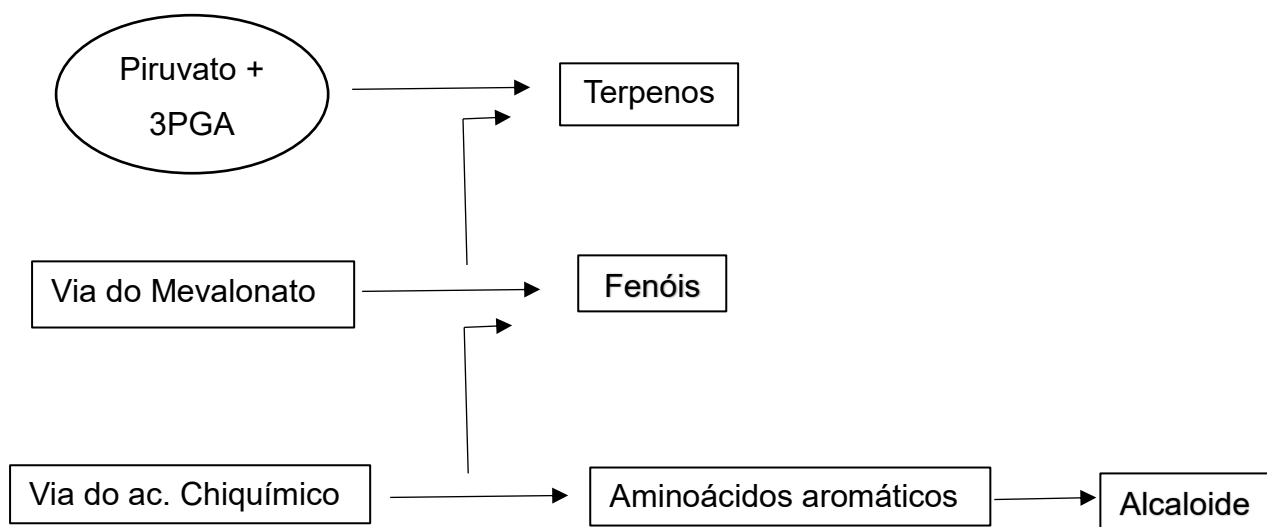
humano e suas múltiplas aplicações (SANTOS, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009). Grande parte dos metabólitos possui valor comercial tanto na indústria farmacêutica quanto nas áreas agrônômica, alimentícia, cosmética, entre outras (SIMÕES *et al.*, 2010).

A grande atuação dos metabólitos secundários dos vegetais mostra a necessidade e a grande importância do conhecimento que se deve adquirir sobre esses compostos. Entender suas atuações pode levar a inúmeras possibilidades de estudos que direcionem a busca pela solução de problemas considerados importantes (BEZERRA, 2008).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários, conforme representado na Figura 2: os compostos fenólicos, os terpenos e os alcalóides. Tais compostos químicos são comumente utilizados contra ataques bióticos ou abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e do ácido mevalônico. Os terpenos são formados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os alcaloides provêm dos aminoácidos aromáticos triptofano e tirosina, os quais são derivados do ácido chiquímico e dos aminoácidos alifáticos ornitina e lisina. Flavonoides, taninos e ligninas são constituintes dos compostos fenólicos; óleos essenciais, saponinas, carotenoides e grande parte dos fitorreguladores são terpenos; nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides (ALVES, 2001; PERES, 2004).

Figura 2 - Principais vias de biossíntese dos metabólitos secundários.



2.3.1 Compostos Fenólicos

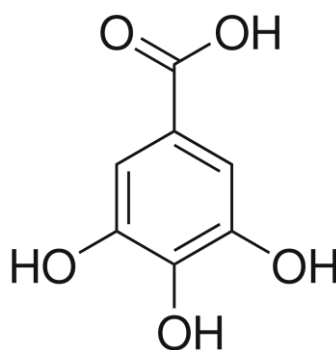
Os compostos fenólicos são constituídos de uma ou mais hidroxilas, conforme mostrado na Figura 3, ligadas ao benzeno, sendo a estrutura do fenol a base para todos os compostos fenólicos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

A condensação aldólica¹ do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato forma o ácido chiquímico, que por sua vez, pode ser metabolizado em ácido gálico ou ácido corísmico, dando origem aos aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina (SANTOS, 2003). A enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) catalisa a reação em que a fenilalanina perde uma molécula de amônia originando ao ácido cinâmico; nas reações posteriores há o adição de hidroxilas e outros substituintes, produzindo assim inúmeros compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As principais propriedades biológicas dos compostos fenólicos são atividade hepatoestimulante, antibacteriana, antitumoral, antiviral, anti-inflamatório, antioxidante, hepatoprotetor, analgésico tópico, hipoglicemiantes e hipercolesterolêmia, o que claramente justifica o interesse da indústria de fármacos (CARVALHO *et al.*, 2003).

Ainda em concordância com Carvalho e colaboradores (2003), os compostos fenólicos podem ser classificados em: fenilpropanóides, cumarinas, ácidos fenólicos (ex.: ácido gálicos e ácido salicílico), flavonoides, fenóis simples, taninos hidrolisáveis, ligninas e taninos condensados, entre outros.

Figura 3 - Estrutura da molécula de ácido gálico, composto pertencente à classe dos fenóis.



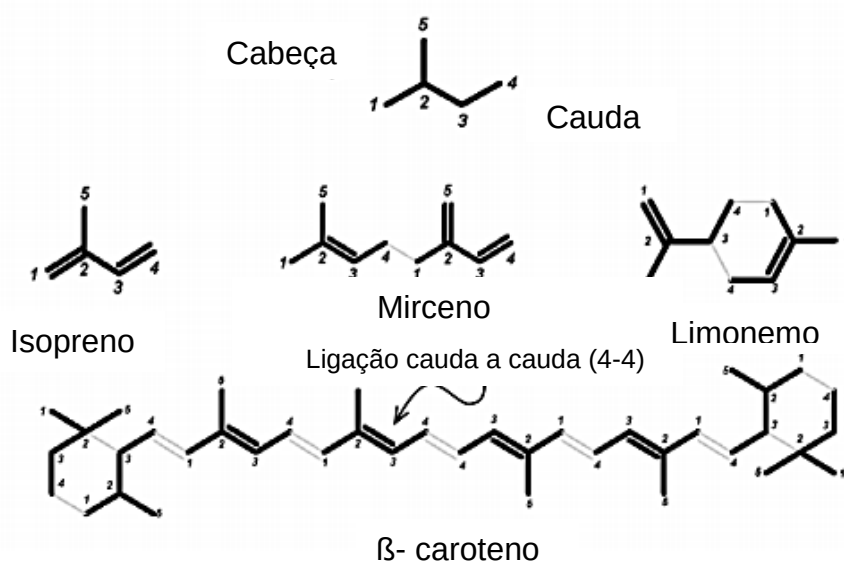
Fonte: <http://www.engquimicasantosp.com.br>

¹ A condensação aldólica é uma das ferramentas mais importantes da síntese orgânica para a construção de ligação C – C. Esta ligação é formada através da reação entre uma substância carbonílica enolizável que age como nucleófilo e outra substância carbonílica que age como eletrófilo.

2.3.2 Terpenos

Os terpenos (também conhecidos como terpenoides) são metabolitos que constituem uma classe de produtos naturais advindo das plantas que apresentam uma grande variedade funcional e estrutural (RAVEN *et al.*, 2001). Todos os terpenoides são constituídos pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos conforme exemplificado na Figura 4, e quando submetidos a altas temperaturas, podem se decompor em isoprenos, podendo assim referir-se a todos os terpenos como isoprenoides (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Figura 4 - Estrutura química de alguns terpenos com os resíduos de isopreno em destaque, exemplificando a “regra do isopreno”.

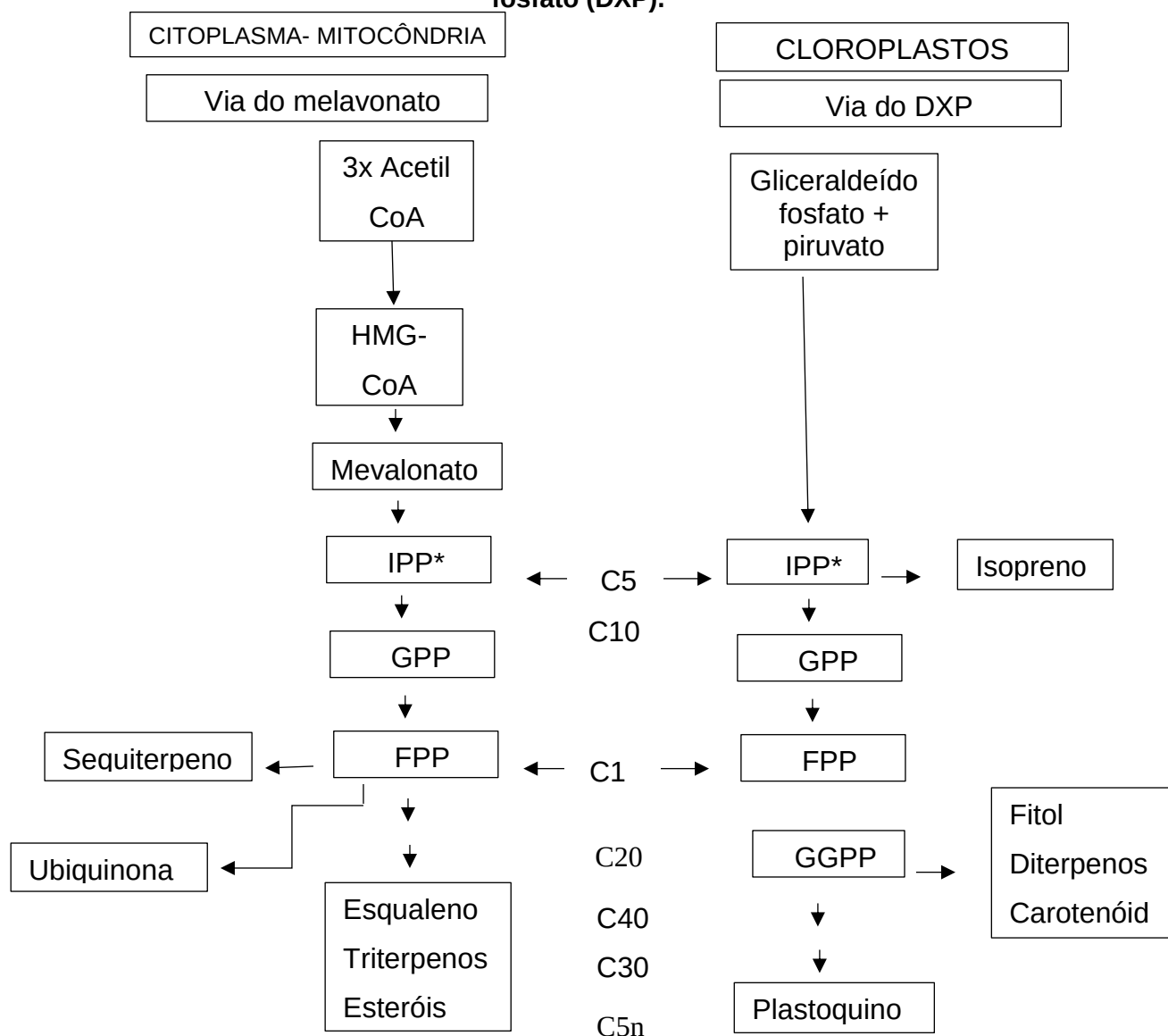


Fonte: FELIPE; BICAS, 2017.

Quanto à classificação dos terpenos, ela pode ser feita de acordo com o número de unidades de isopreno que vão se ligando entre si, orientadas em sentido inverso (cabeça-cauda) como mostrado na Figura 4, podendo ser: hemiterpenoides (C5), monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15), diterpenoides (C20), triterpenoides (C30) e tetraterpenos (C40), que serão mostradas mais detalhadamente adiante (OLIVEIRA *et al.*, 2003). O isopreno (IP) é produzido de forma natural, mas não está diretamente envolvido na formação dos produtos pertencentes a estas classes (NIERO; MALHEIROS, 2007).

Este tipo de derivação da estrutura química em unidades compostas de cinco carbonos, unidades essas que são comuns a todos os terpenos, é produto da sua origem bioquímica, devido a todos os seus carbonos serem provenientes do isopentenil pirofosfato (IPP) ou de seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). O IPP e o DMAPP são sintetizados por meio de duas rotas metabólicas distintas: a do mevalonato e via do 1-desoxixilulose 5-fosfato (DXP) (Figura 5), onde se originam os diferentes terpenos (FELIPE; BICAS, 2017).

Figura 5- Representação esquemática das duas rotas metabólicas referente à síntese de terpenos/terpenoides: via do mevalonato e via do 1-desoxixilulose-5-fosfato (DXP).



Fonte: FELIPE; BICAS. 2017.

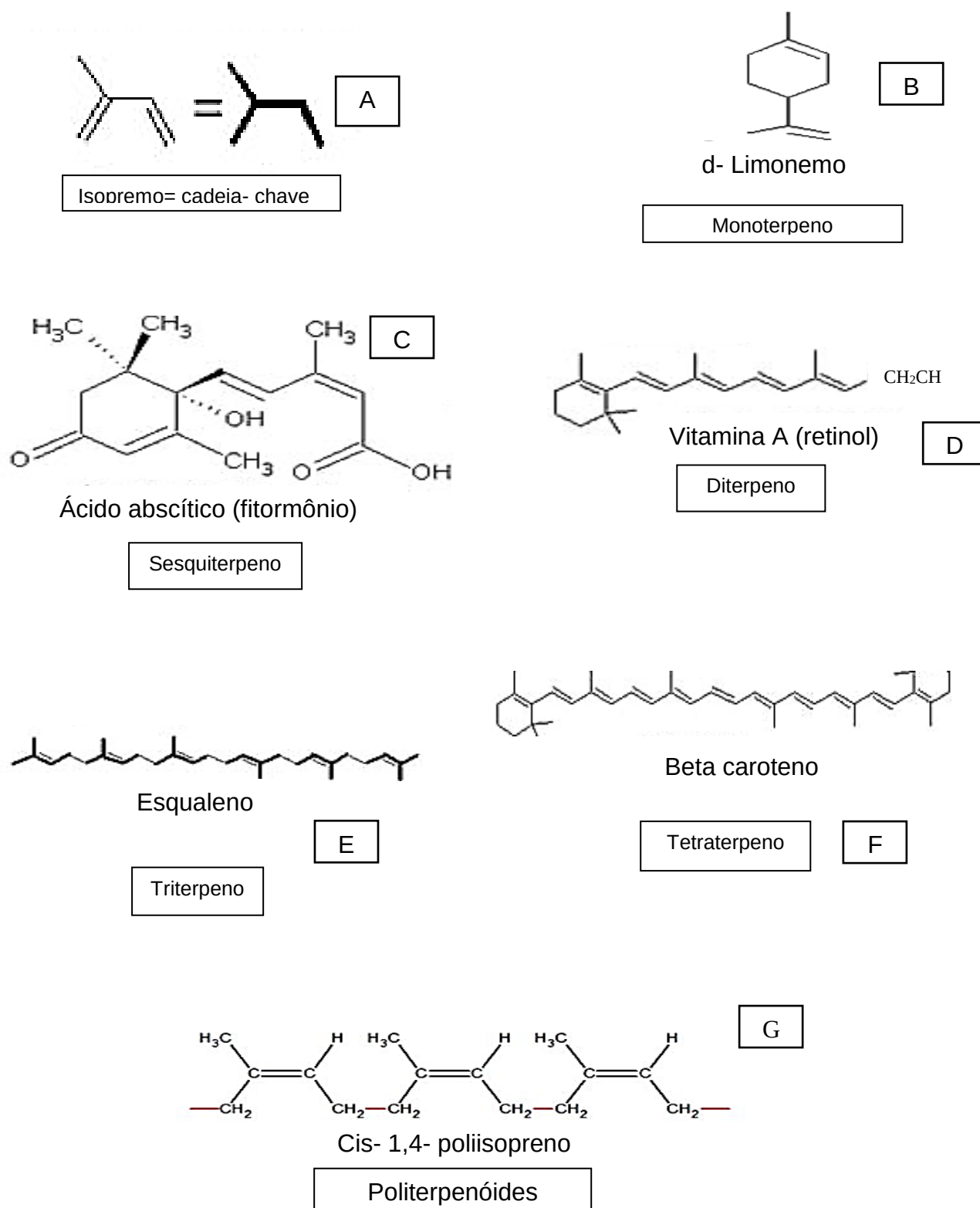
Os hemiterpenoides (C₅) são considerados o menor grupo dos terpenos, sendo o seu representante mais comum e estudado o isopreno (Figura 6A), um produto volátil que é liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU *et al.*, 2000). Os monoterpenoides (C₁₀), conforme apresentado na Figura 6B, são constituídos por duas unidades de isopreno. Devido ao seu baixo peso molecular, os monoterpenoides comumente são voláteis, sendo assim os constituintes dos óleos essenciais e das essências voláteis (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os sesquiterpenos (Figura 6C), no geral, podem atuar como compostos antimicrobianos contra fungos e bactérias (NIERO; MALHEIROS, 2007). Os diterpenoides exemplificados pela Figura 6D, formam um grande grupo de compostos não voláteis (ROBBERS *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Peres (2004) descreve que tudo leva a crer que o principal papel desempenhado por um diterpeno seja o das giberelinas, que é uma importante classe de hormônios vegetais responsáveis pela germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais.

Os triterpenoides (Figura 6E), originam os componentes das resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Entre os triterpenos está uma importante classe de substâncias, tanto para vegetais quanto para animais: os esteroides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides em mamíferos, plantas e insetos. Uma outra classe importante de triterpenos são as saponinas que desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microrganismos (PERES, 2004).

Como exemplos de tetraterpenos (Figura 6F), podem ser citados os carotenoides e as xantofilas, que possuem pigmentos intimamente ligados aos processos fotossintéticos e especialmente, na pigmentação de flores e frutos. Existe ainda um grupo complexo de terpenos cujas moléculas são resultantes da síntese de mais de oito unidades de isoprenoides, isso significa, mais 40 carbonos na sua estrutura, estes são chamados de politerpenoides (Figura 6G), que contêm compostos como coenzima Q₁₀ ubiquinona, poliprenoides e polímeros longos encontrados, por exemplo, no látex (ROBBERS *et al.*, 1997; CROTEAU *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Figura 6 - Representação esquemática dos terpenos, de acordo com o número de unidades de isopreno.



2.3.3 Alcaloides

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem em sua constituição pelo menos um átomo de nitrogênio (N) em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é feita de forma limitada entre os organismos vivos. São farmacologicamente ativos e encontrados predominantemente em angiospermas (HENRIQUES *et al.*, 2002). Estes produtos naturais de baixo peso molecular derivam de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos como a ornitina e a lisina (PERES, 2004), classificando-se assim de acordo com o aminoácido precursor e sua forma estrutural (DEWICK, 2002).

Esses metabólitos são de grande interesse para os pesquisadores, devido ao grupo possuir uma grande heterogeneidade química, distribuição restrita na natureza e grande potencial bioativo (ROBBERS *et al.*, 1997), sendo encontrados em aproximadamente 14,2% dos gêneros de plantas superiores (CORDELL *et al.*, 2001).

Apesar de existirem algumas características em comum, particularidades da bioquímica, biologia celular e biologia molecular comprovam as diferenças entre as subclasses que compõem os alcaloides. As reações envolvidas na biossíntese dos alcaloides são catalisadas por enzimas estereoespecíficas (formação de somente um isômero, em detrimento de outro arranjo espacial) e regioespecíficas (formação de somente um de dois produtos possíveis), com ação determinada sobre substratos altamente específicos (FACCHINI; LUCA, 2008; YANG; STÖCKIGT, 2010).

Ainda em concordância com Facchini e Luca (2008) e Yang e Stöckigt, (2010), os aminoácidos mais importantes e que estão diretamente ligados a este processo são a lisina, ornitina, tirosina e triptofano. Sozinhos ou em combinação com moléculas de secoiridoide, esteroide ou terpenoide, permitem a formação de inúmeras classes de alcaloides, algumas dessas classes são citadas a seguir na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais classes de alcaloides sintetizados pelas plantas.

Classe	Aminoácido precursor	Exemplos
Piperidínicos	Lisina	Coniina e Espectralina.
Indólicos	Triptofano	Vimblastina e Quinina
Isoquinolínicos	Tirosina	Morfina e Codeína
Tropânicos	Ornitina	Atropina e Codeína
Pirrolidínicos	Ornitina	Nicotina e Higrina

Fonte: Adaptado de Facchini; De Luca, (1998).

Os alcaloides piperidínicos têm como aminoácido precursor a lisina, a partir da qual é originado um anel piperidínico, resultantes da perda de um grupo carboxílico e um átomo de nitrogênio (GUPTA; SPENCER, 1969).

O triptofano é um aminoácido aromático derivado do corismato, sintetizado através da via do chiquimato, e que por ação de descarboxilase, origina triptamina. A condensação de triptamina com secologanina forma strictosidina, uma molécula intermediária na síntese dos alcaloides indólicos. A quinina (*Cinchona officinalis*), camptotecina (*C. acuminata*), estricnina (*Nux vômica*), vincristina e vimblastina (*Catharanthus roseus*) podem ser citadas como exemplos deste grupo (EL-SAYED; VERPOORTE, 2007).

Todos os alcaloides isoquinolínicos apresentam em sua composição núcleo tetrahydroisoquinolina, derivado da tirosina. Sendo assim, juntamente com os fenóis totais e os terpenos, os alcalóides formam as três grandes classes dos compostos secundários orgânicos que compõe os vegetais, e que são fortes candidatos para o desenvolvimento de novos compostos para tratamento de enfermidades, como o câncer, que vem aumento cada vez mais o número de óbitos principalmente em países considerados em desenvolvimento (FACCHINI; LUCA, 2008).

2.4 EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM MATERIAL DE ORIGEM VEGETAL

A radiação ionizante caracteriza-se por possuir energia suficiente para mover elétrons de seus átomos, produzindo íons, ou seja, ionização do meio onde houve interação com a radiação (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

O radioisótopo Co-60 é a principal fonte de radiação gama utilizada no tratamento de materiais orgânicos (ex: alimentos) devido à sua disponibilidade, apresentar-se na forma metálica e ser insolúvel em água, sendo assim confere maior segurança ambiental. Essas características fazem com que esse tipo de fonte venha sendo usada em aplicações voltadas para a radioecologia, radiobiologia e na área industrial para controle biológico, por exemplo: esterilização de material médico cirúrgico, odontológico, laboratoriais, processamento de alimentos, fitoterápicos, entre outros (SILVA *et al*, 2010).

A radiação gama, dependendo da dose utilizada, pode agir impedindo a multiplicação de microrganismos e provocar alterações a nível molecular destes seres como resultado da ação direta e/ou indireta sobre a fita de DNA. A ação indireta indica que a alteração do DNA ocorre como resultado da produção de radicais-livres iniciados em uma reação secundária, diferentemente da ação direta, onde as alterações sugerem uma interação direta da radiação com uma ou com as duas fitas de DNA (GOPAL, 1978).

O uso da radiação gama em produtos naturais, como na indústria alimentícia, visando à segurança alimentar pelo processo de esterilização microbiológica, iniciou-se por volta de 1920 (HALLMAN, 2011). No entanto, as pesquisas utilizando a radiação gama na descontaminação seja em produtos naturais ou materiais de uso hospitalar só foram publicadas após 1955, principalmente pelo exército dos Estados Unidos (MOREHOUSE; KOMOLPRASERT, 2004). No ano de 2008, cerca de 52 países permitiam e empregavam a radiação gama em aproximadamente 250 produtos naturais e alimentícios (SHIM *et al.*, 2009).

No Brasil, a primeira regulamentação sobre a irradiação de produtos naturais e/ou alimentos foi aprovada no ano de 1973, sendo este regulamento revisto e ampliado em 2001 (Resolução - RDC Nº 21, de 26 de janeiro de 2001). O regulamento brasileiro prevê que a dose de radiação absorvida seja suficiente para se alcançar o propósito pretendido, tanto na área alimentícia e industrial visando a

desinfestação, ou esterilização, quanto em produtos naturais (fitoterápicos) (ANVISA, 2001).

Em relação ao uso da radiação gama em fitoterápicos, estudos vem sugerindo alterações nas propriedades químicas e físicas de vegetais expostos a esse tipo de radiação. Isso resulta em uma condição de tensão ou estresse oxidativo, conseqüentemente, levando a formação de radicais livres, como o radical superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e íons moleculares de alta energia. Entre os estresses celulares originados por radicais livres, são normalmente encontradas as deficiências funcionais resultantes de alterações da viscosidade, carga de superfície, composição química e permeabilidade dos sistemas de membrana celular (SIDDHURAJU; MAKKAR; BECKER, 2002; MOREHOUSE; KOMOLPRASERT, 2004; JAN *et al.*, 2012).

Os efeitos resultantes do estresse celular causado pela interação da radiação gama sobre a matéria depende das características da fonte, tais como sua energia, dose e taxa de dose, e das propriedades do material irradiado, a exemplo de sua composição e do estado físico. A depender da dose, algumas substâncias podem apresentar uma certa resistência à radiação, principalmente quando presentes em materiais desidratados (GOPAL, 1978; RAZEM; KATUSIN-RAZEM, 2008). Entretanto, ainda de acordo com Gopal (1978) e Razem e Katusin-Razem (2008), estas mesmas substâncias podem sofrer decomposição quando irradiadas sob a forma de solução aquosa ou suspensão. Danos em virtude da radiação ionizante podem manifestar-se por alterações na coloração, alteração da atividade biológica, além do aumento relacionado à toxicidade.

O aumento da toxicidade pode ser causado pela decomposição de produtos radicalares sobre as ligações químicas dos compostos secundários presentes nas plantas, fazendo com que haja a quebra de macromoléculas em moléculas menores. Essas moléculas darão origem a compostos menores pertencentes à mesma classe de família da molécula original, levando assim ao aumento do número de moléculas presentes na amostra, e conseqüentemente levando ao provável aumento da toxicidade do material fitoquímico (RAZEM; KATUSIN-RAZEM, 2008; JAN *et al.*, 2012).

Embora o uso da radiação gama seja uma técnica aprovada por diversas agências reguladoras, tais como FDA, OMS, FAO e ANVISA, ainda não é comum o uso de plantas medicinais irradiadas. Tal fato provavelmente seja devido à falta de

conhecimento por parte da população, que muitas vezes acredita que o material vegetal ou alimento irradiado torna-se uma fonte emissora de radiação (BEHRENS *et al.*, 2009).

Entretanto, o interesse envolvendo o estudo dos efeitos produzidos pela interação da radiação ionizante em amostras de compostos orgânicos vegetais tem aumentado consideravelmente. Inúmeras questões relacionadas com mudanças na estrutura química e nas propriedades dos compostos, como é o caso do desenvolvimento de ranço oxidativo e do aumento das propriedades tóxicas, têm recebido bastante atenção da comunidade científica, passando a serem estudadas de forma mais intensificada, visando à descoberta de futuros compostos que possam promover ações curativas para o tratamento de enfermidades (SILVA *et al.*, 2012; ZÚÑIGA *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2013; VELASCO *et al.*, 2014; MOHAJER *et al.*, 2014).

2.5 ESTUDO DA TOXICIDADE E O USO DA *ARTEMIA SALINA* LEACH COMO BIOINDICADOR

Toxicidade é a propriedade de uma substância química ou biológica associada a sua capacidade de causar danos aos organismos vivos, em função da concentração e de duração da exposição (VERSON, 2011).

Quando nos referimos a toxicologia, algumas definições são levadas em consideração, por exemplo, toxicidade aguda e crônica. A primeira resulta da exposição a um agente tóxico, em um curto período, capaz de promover os efeitos indesejáveis, que vão desde uma simples tontura até mesmo à morte. Já a crônica está relacionada a exposições repetidas, de longa duração e doses frequentemente insuficientes para provocar uma intoxicação aguda, com os sintomas podendo manifestar-se após meses ou anos a partir do contato com o agente tóxico. Vale ressaltar que uma mesma substância pode provocar intoxicação aguda e após certo tempo, desencadear uma intoxicação crônica (OGA, 2014).

A maior parte do conhecimento relacionado à toxicidade das plantas remonta aos nossos antepassados. Atualmente existem grupos de plantas que são mais definidos de acordo com sua utilidade, por exemplo, ornamentais, comestíveis, medicinais, tóxicas, etc. Os grupos das plantas medicinais e tóxicas são tomados de forma indistinta, já que se parte do pressuposto de conterem princípios ativos, que a

dependem da concentração podem ser benéficos ou tóxicos para o organismo (SANCHEZ,1998).

Ainda segundo Sanchez (1998), as plantas tóxicas podem ser encontradas em todo nosso entorno, como nos parques e jardins, seja na forma silvestre ou em cultivos e alimentos do dia a dia. Assim, o risco de intoxicação é evidente seja para o homem ou animais domésticos. Os principais princípios ativos conhecidos como responsáveis pelos efeitos adversos causados pelas plantas são: alcalóides, cardenolídeos dentre outros.

Animadores têm sido os benefícios da medicina alopática ou alternativa, referente a algumas substâncias presentes nas plantas consideradas tóxicas, como a papoula (*Papaver somniferum*), cujas substâncias vem sendo isoladas e estudadas como um potente anestésico e analgésico; a digitalina (*Digitalis purpurea*) usada em pesquisas voltadas a afecções cardiovasculares, ou como regulador cardíaco; os alcalóides da beladona (*Atropa belladonna*) que atuam nos problemas oculares, e também agem como sedativos e anti-hipertensivos; e o óleo extraído das sementes de mamona (*Ricinus communis*) que é amplamente empregado como purgante (SCHVARTSMAN, 1992).

Até o momento, na literatura não consta trabalhos que caracterizem e diferenciem precisamente uma planta tóxica de uma planta considerada segura para uso medicinal. Ou seja, ninguém estabeleceu uma classificação toxicológica levando-se em consideração os níveis de toxidez em função da quantidade de parte tóxica, de forma a caracterizar o limite em que tal planta deixa de ser tóxica para ser não-tóxica e vice-versa (MARRAFFA *et al.*, 2012). Entretanto, testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com sua letalidade ou toxicidade. Além disso, outros parâmetros são investigados, por exemplo, o potencial tóxico em órgãos específicos e a identificação da tóxico-cinética e da relação dose- resposta (SILVEIRA *et al.*, 2008).

Dentre os ensaios de toxicidade *in vivo*, encontra-se o ensaio de letalidade com *Artemia salina* Leach, um microcrustáceo de água salgada comumente utilizado como alimento para peixes. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2008). Os ensaios de letalidade são largamente empregados em testes toxicológicos,

podendo-se obter a concentração letal mediana (CL50), que é a dose necessária para causar a morte de 50% de uma amostra em estudo (BEDNARCZUK et al., 2010). De acordo com MEYER *et al.*, (1982), este bioensaio, além de determinar a toxicidade geral, apresenta uma boa correlação com atividade citotóxica em alguns tipos de tumores sólidos, como o carcinoma de Erlich. Dessa forma, este teste pode servir como indicador de compostos bioativos para atividades antineoplásica. (MCLAUGHLIN *et al.*, 1998, PARRA *et al.*, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

Folhas da *Libidibia ferrea* foram coletadas na rua Benfica, localizada no bairro da Madalena, Recife-PE, Brasil. A coleta do material foi feita uma única vez e de apenas um exemplar. As folhas foram coletadas da base da planta e como critério de exclusão evitou-se coletar folhas com a presença de insetos (ou com evidências de herbivoria), fungos ou queimaduras causadas pelo sol. No momento da coleta, o solo estava seco, não havia chovido na época e o dia estava ensolarado. Tendo em vista que mudanças de clima, temperatura e sazonalidade são capazes de alterar a presença de metabólitos secundários nos vegetais, ressalva-se que tais mudanças não faziam parte do escopo deste estudo. Uma amostra do material botânico foi encaminhada ao Herbário PEUFR da UFRPE, onde foi identificado, confirmado e catalogado com o nº 53285. Após a identificação, o restante do material foi levado para secagem.

Figura 7 - Folhas de *Libidibia ferrea*



Fonte: Próprio autor

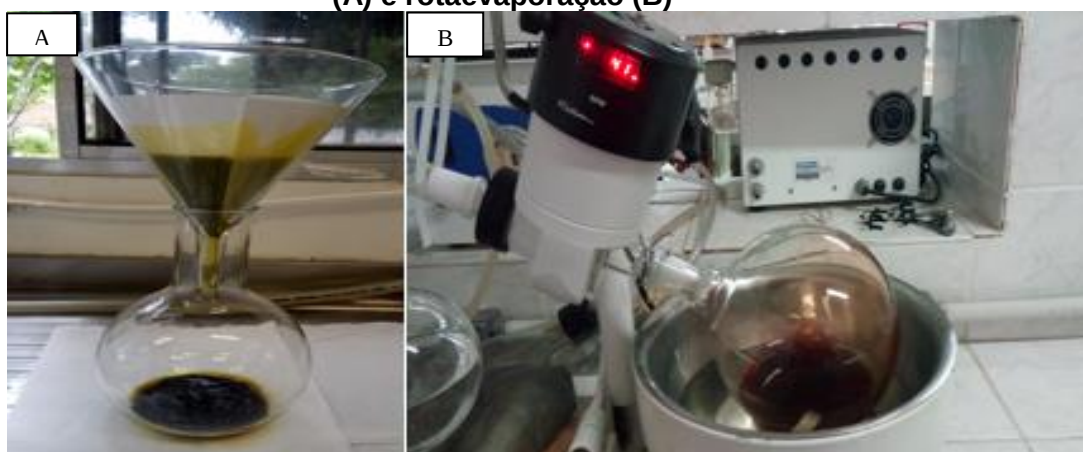
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

A secagem foi feita durante 10 dias à sombra e em local arejado, para se evitar a contaminação por fungos e a queimadura pelo sol. Em seguida, as folhas foram trituradas em moinho de facas mecânico e forrageira. O extrato hidroalcoólico

de *L. ferrea* (**EHLF**) foi obtido na proporção de 1:2 (1 kg de folíolos da planta para 2 litros de etanol, 70%). O preparado foi mantido em temperatura ambiente, agitado com o auxílio de um agitador automático, deixado em repouso por 3 dias, e posteriormente filtrado com o auxílio de um papel filtro e um funil para a extração de resíduos da amostra, conforme mostra a Figura 8A. Em seguida tal filtrado foi concentrado em um rotaevaporador (Figura 8B), a 70°C, pertencente ao Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica – LEAF (UFPE).

O processo de rotaevaporação é necessário para que haja a retirada do solvente (parte volátil – etanol 70%) do material em estudo. No entanto, esse procedimento não é capaz de retirar do material a parte não volátil (30% água), sendo necessária a realização do processo de liofilização para que haja a quebra e retirada das moléculas de água do material em estudo.

Figura 8 - Extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea* durante os processos de filtração (A) e rotaevaporação (B)



Fonte: Próprio autor

3.3 Processo de liofilização

Foi utilizado um liofilizador de bancada (série LV200 da TERRONI). Este equipamento possui: condensador em aço inox com capacidade de 3/5 kg de gelo por ciclo e temperatura de -55°C; três plataformas para bandejas, com aquecimento; três bandejas em aço inox com área de 0,080 m² cada; uma bomba de vácuo, que faz a pressão na câmara de secagem chegar a 120 µmHg no final do processo.

Também possui um painel em LCD para facilitar o controle do processo, permitindo controlar alguns parâmetros como o tempo de duração da secagem e o controle individual da temperatura de cada bandeja, além de indicar a pressão na

câmara de secagem, a temperatura do condensador, o tempo decorrido e a finalização do processo.

Foram utilizados 500 mL de extrato líquido, homogeneizado por 5 minutos e distribuído nas três bandejas do liofilizador, em camadas com cerca de 2 mm de espessura.

Em seguida, as bandejas foram cobertas com filme plástico de PVC e colocadas para congelar em um freezer a -25°C por 40 horas. Após o congelamento, as bandejas foram retiradas do freezer e colocadas imediatamente no liofilizador, que foi ligado 40 minutos antes para que o condensador alcançasse a temperatura adequada.

O tempo total do processo de liofilização foi de 10 horas. Finalizado o processo, o extrato desidratado foi rapidamente removido das bandejas e acondicionado em um recipiente de vidro estéril e armazenado a uma temperatura de aproximadamente 8°C . Este produto também apresentou estrutura porosa e quebradiça, e foi facilmente reduzido a pó, o que nos deu como resultado final cerca de 250g de material.

3.4 IRRADIAÇÃO DO EXTRATO

O extrato bruto foi separado em 8 recipientes de penicilina, contendo 3g do material em cada, e levado para o tratamento por radiação ionizante. Foram utilizadas oito diferentes doses de radiação (5, 7, 10, 12, 15, 20, 25, 30 kGy). A irradiação do material foi feita separadamente e a taxa de dose foi de 2,434 kGy/h.

Para a irradiação foi utilizado um irradiador Gammacell com fonte de Co-60 (Figura 9), pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da UFPE. Esse modelo de irradiador se enquadra de categoria I pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), em que a fonte selada é completamente encapsulada e blindada em um contêiner seco. O acesso à fonte radioativa selada ou à região de irradiação não é fisicamente possível, em função da sua configuração. Após o termino da irradiação, todo o material foi armazenado a uma temperatura de aproximadamente 8°C para testes posteriores.

Figura 9 - Irradiador Gammacell Cobalt-60 pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.



Fonte: Próprio autor

3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE POR *ARTEMIA SALINA* LEACH

O protocolo foi realizado segundo proposto por Meyer e colaboradores (1982), e os ensaios realizados no Laboratório de Avaliação da Contaminação do Solo (LACS), do Departamento de Energia Nuclear da UFPE. Foram utilizados cistos do microcrustáceo para eclodir em uma incubadora contendo água do mar, a uma temperatura de 25°C, durante 48 horas, com iluminação artificial e aeração constante. A incubadora foi parcialmente coberta com papel alumínio como mostrado na Figura 10A.

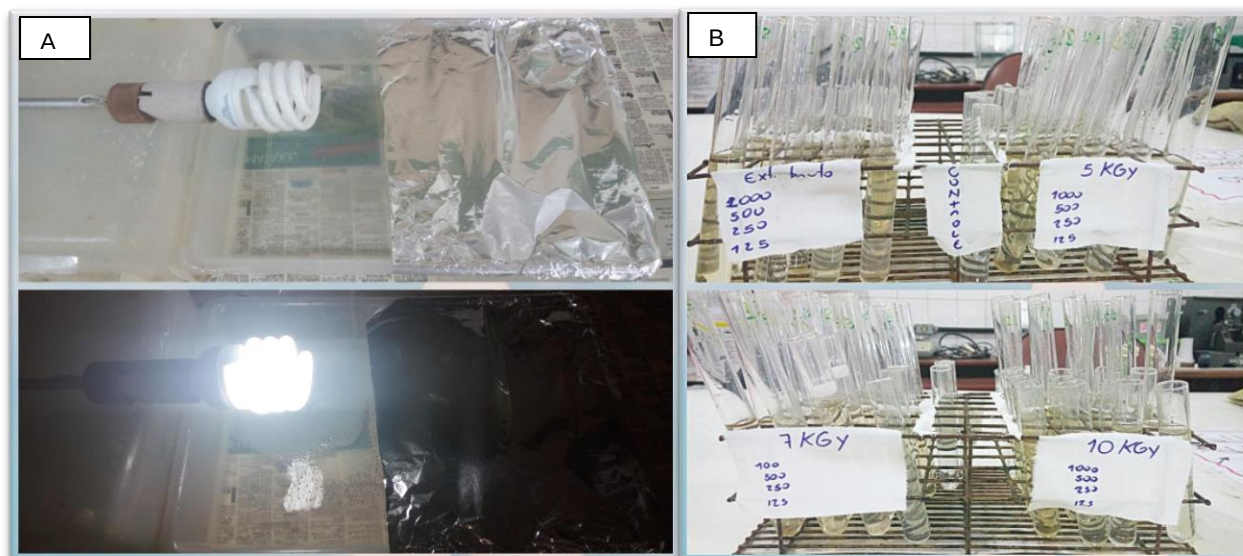
Após a eclosão, e com auxílio de uma pipeta Pasteur, cerca de 10 larvas de *A. salina* em fase de náuplio (Figura 11) foram distribuídas em tubos de ensaio contendo 9 ml de água do mar, conforme mostra a Figura 10B. O extrato hidroalcoólico de *L. ferrea* (EHLF) liofilizado, irradiado em oito doses (5, 7, 10, 12, 15, 20, 25, 30 kGy) ou não-irradiado, foi diluído em 1 mL água destilada e

adicionado ao tubo contendo as artêmias, de tal forma que se atingisse as seguintes concentrações finais: 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml e 100 µg/ml, para cada dose.

Foi utilizado como controle negativo a água do mar contendo artêmias sem adição do extrato, e como controle positivo, apenas a solução mãe que deu origem ao extrato em estudo (álcool 70%). O ensaio foi realizado em triplicata, com contagem das artêmias vivas e mortas após 24 horas, considerando-se mortos aqueles microcrustáceos que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do tubo.

Para avaliação da estabilidade do produto (tempo de prateleira), foi repetida toda a metodologia para o ensaio de toxicidade aguda descrita acima, 60 e 180 dias após o processo de irradiação das amostras.

Figura 10 - Incubadora para os ovos de *Artemia salina* contendo água do mar a 25°C, com iluminação artificial e aeração constante, parcialmente coberta (A); tubos de ensaio contendo diferentes concentrações de extrato irradiado a diferentes doses para avaliar a toxicidade *in vitro* (B).



Fonte: Próprio autor

Figura 11 - *Artemia salina* Leach



Fonte: Próprio autor

3.6 ANÁLISE DO PERFIL FOTOQUÍMICO

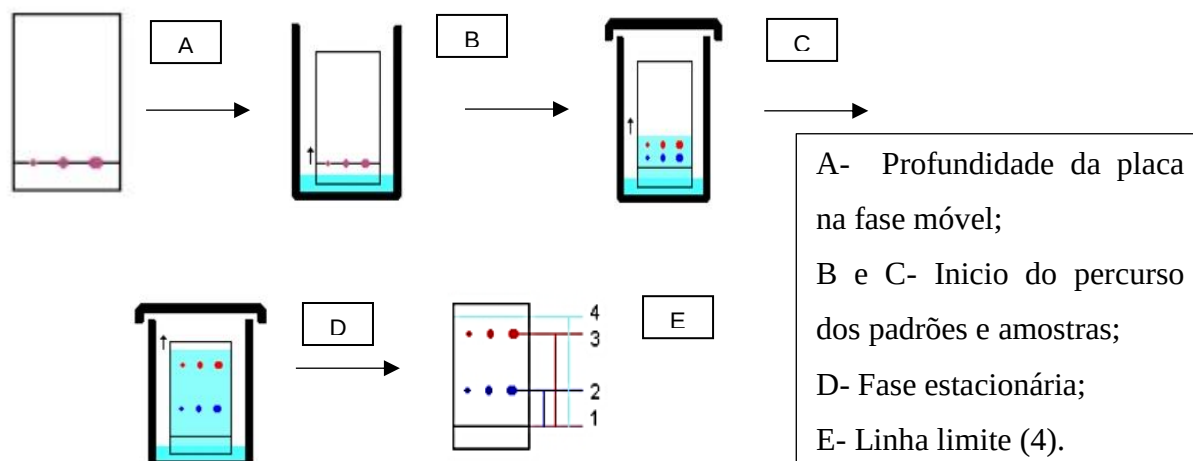
3.6.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Amostras do extrato não-irradiado e irradiado nas diferentes doses (5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy) foram aplicadas com o auxílio de um tubo capilar no lado direito da placa de cromatografia (Figura 12A), constituída por gel de sílica com dimensões 20 x 20 cm e 0,25 milímetros de espessura (Merck - Darmstadt, Alemanha).

O padrão correspondente a cada classe de metabólito foi aplicado no lado esquerdo da placa, também representado pela Figura 12A. Tanto o extrato quanto o padrão foram aplicados a um centímetro da base da placa e o líquido foi transferido por capilaridade sobre a superfície da fase estacionária, penetrando-o. Em seguida, através da técnica de ascensão, a placa cromatográfica foi imersa no solvente (fase móvel), a uma profundidade de aproximadamente 0,5 cm da base, conforme mostrado na Figura 12B.

Deste modo, a cromatografia foi desenvolvida com uma fase móvel movendo-se através da fase estacionária por capilaridade (Figuras 12C e 12D). Ao final do processo, as placas foram removidas da cuba cromatográfica, (Figura 12E) e postas a secar em temperatura ambiente. Em seguida, os reveladores apropriados foram aplicados por borrifamento, a fim de demonstrar a presença ou ausência de metabólitos secundários. Tal procedimento foi realizado no Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica (LEAF), do Departamento de Botânica- UFPE.

Figura 12 – Esquema representativo da Cromatografia em Camada Delgada (CCD).



Fonte: adaptado de <http://cromatografiafametro.fitoquimico.org>

3.6.2 Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS)

A cromatografia foi realizada com um cromatógrafo a líquidos de ultra performance (UPLC) Acquity H-Class (Waters) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Foi empregada uma coluna BEH 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,7 μ m. As fases móveis utilizadas consistiram de solução aquosa contendo 2% de Metanol, 5mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e solução metanólica contendo 0,1% de ácido fórmico (eluente B), que foram bombeadas a uma vazão de 0,3 mL/min. A eluição foi realizada em modo gradiente e a condição inicial (98% A/ 2% B) foi mantida por 25 minutos.

A proporção de B foi aumentando linearmente para 99% em 8,5 minutos, se mantendo em 99% de B por um minuto, seguida da imediata diminuição para 2% de B, onde foi mantida até 11 minutos. Dez microlitros de amostra foram injetados. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o auto injetor a 10 °C. O sistema UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa single quadrupolo SQ Detector 2 (Waters).

A voltagem do capilar foi de 3,5 kV, a voltagem do cone 30 V, a temperatura de dessolvatação foi de 450°C, com fluxo de gás da fonte de 650 L/h. A aquisição dos dados foi feita em modo fullscan, buscando massas entre 100 e 1000 Da, em

ionização negativa. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas foram feitos através do software MassLynx™ (Waters).

3.6.3 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Antes da análise, as amostras foram tratadas com BSTFA em piridina (30 min a 70 °C) para transformar todos os compostos contendo hidroxila no trimetilsililo correspondente (TMSi) derivado. A análise quantitativa foi registrada utilizando um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-17A, Kyoto, Jap), do Departamento de Antibióticos – UFPE, equipado com um detector de ionização por chama e uma coluna capilar VB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura de filme).

A temperatura inicial do GC foi de 70°C por 4 min, aumentada em 4°C/min até 280°C e mantida por 15 min. As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas em 280°C. O hélio foi usado como gás de transporte a uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min e 1:50 de divisão. Para a identificação de compostos no material estudado, foi utilizada a espectrometria de massa (MS), modelo (QPJ050), cuja detecção foi realizada com ionização de elétrons (EI) a 70 eV, operando no modo de aquisição de varredura completa na faixa de 30 a 400 m/z.

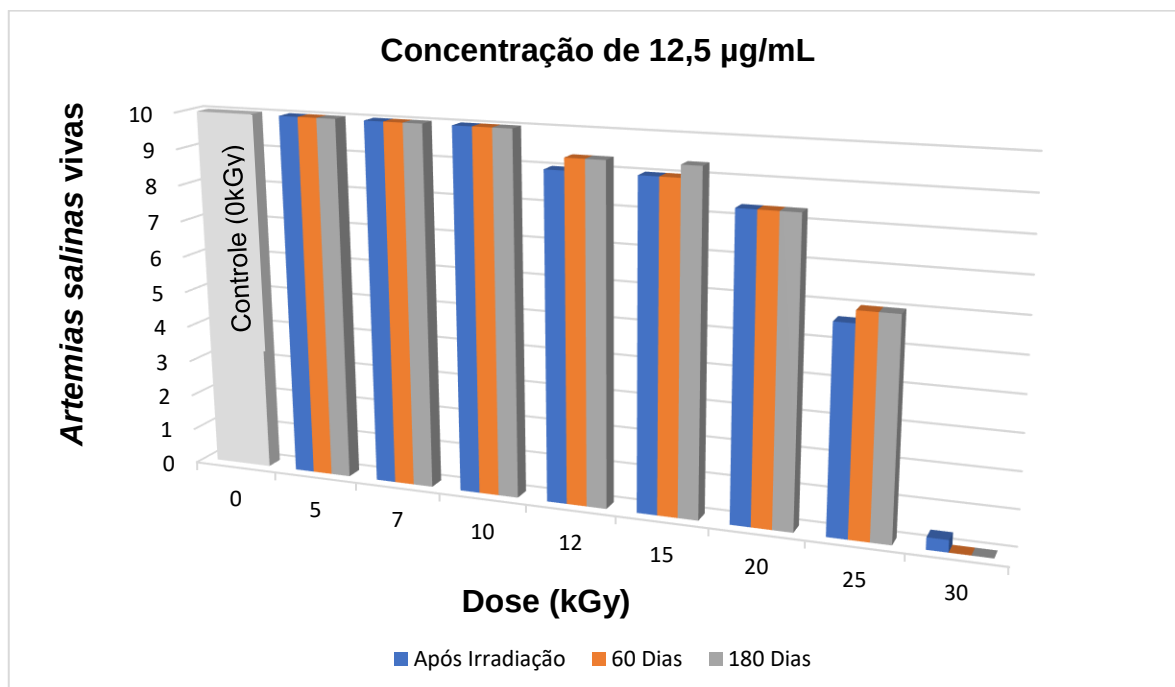
Os picos foram identificados por tempos de retenção semelhantes aos padrões conhecidos e pela comparação de seus espectros de massa de padrões e compostos no NIST11.lib (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Gaithersburg, MD), bases de dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TOXICIDADE E ESTABILIDADE DO MATERIAL

Os gráficos a seguir referem-se aos valores da média de três repetições. Os resultados apresentados na Figura 13 indicam que não há atividade tóxica do extrato controle, o que permanece inalterado para as doses de 5, 7 e 10 kGy. Porém, a partir de 12 kGy, percebe-se o aumento da toxicidade, sendo ela máxima (100%), nos extratos irradiado a 30 kGy.

Figura 13 – Quantidade de indivíduos de *Artemia salina* vivos após teste de toxicidade do extrato de folhas de *Libidibia ferrea* para a concentração de 12,5 µg/mL submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy) em três momentos distintos (após a irradiação; 60 e 180 dias depois).



Fonte: Próprio autor

Nas Figuras 14 e 15 é possível observar que para as concentrações de 25 e 50 µg/ mL, ocorre aumento da toxicidade para amostras irradiadas a partir de 10 kGy, sendo este aumento mais acentuado para a concentração de 50 µg/ mL.

Para a concentração de 100 µg/mL (Figura 16), é possível observar o aumento da toxicidade já para as amostras irradiadas a partir da menor dose utilizada, 5 kGy.

Figura 14 - Quantidade de indivíduos de *Artemia salina* vivos após teste de toxicidade do extrato de folhas de *Libidibia ferrea* para a concentração de 25 µg / mL submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy) em três momentos distintos (após a irradiação; 60 e 180 dias depois)

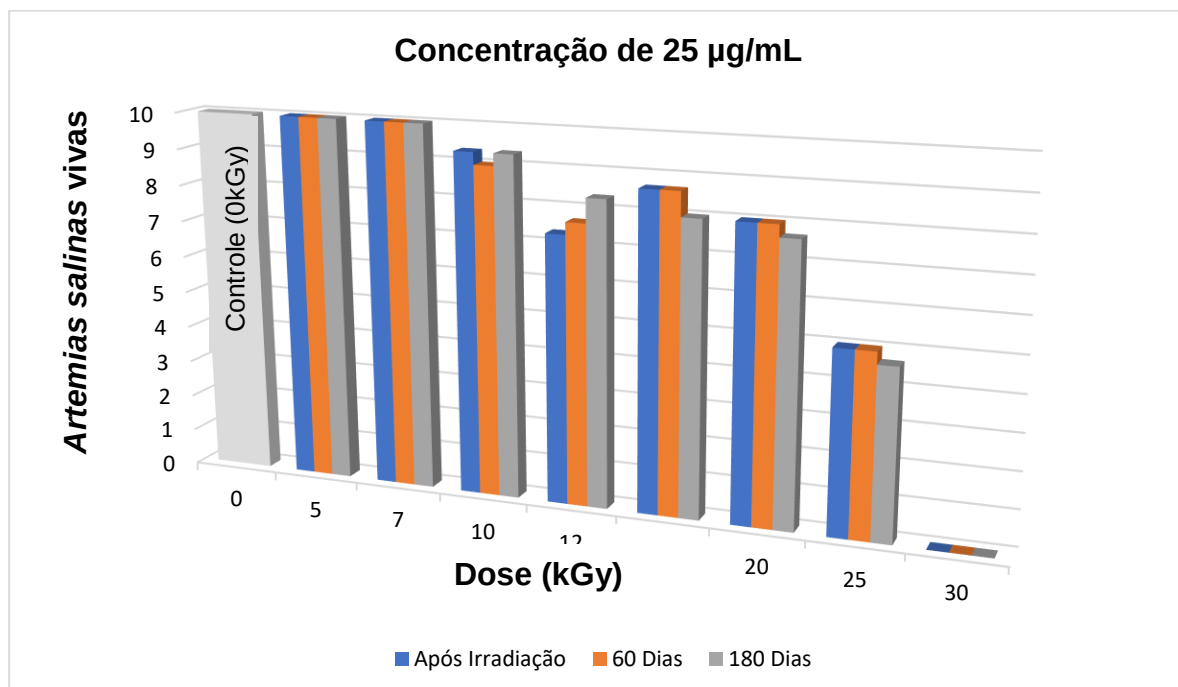


Figura 15 - Quantidade de indivíduos de *Artemia salina* vivos após teste de toxicidade do extrato de folhas de *Libidibia ferrea* para a concentração de 50 µg/mL submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy) em três momentos distintos (após a irradiação; 60 e 180 dias depois).

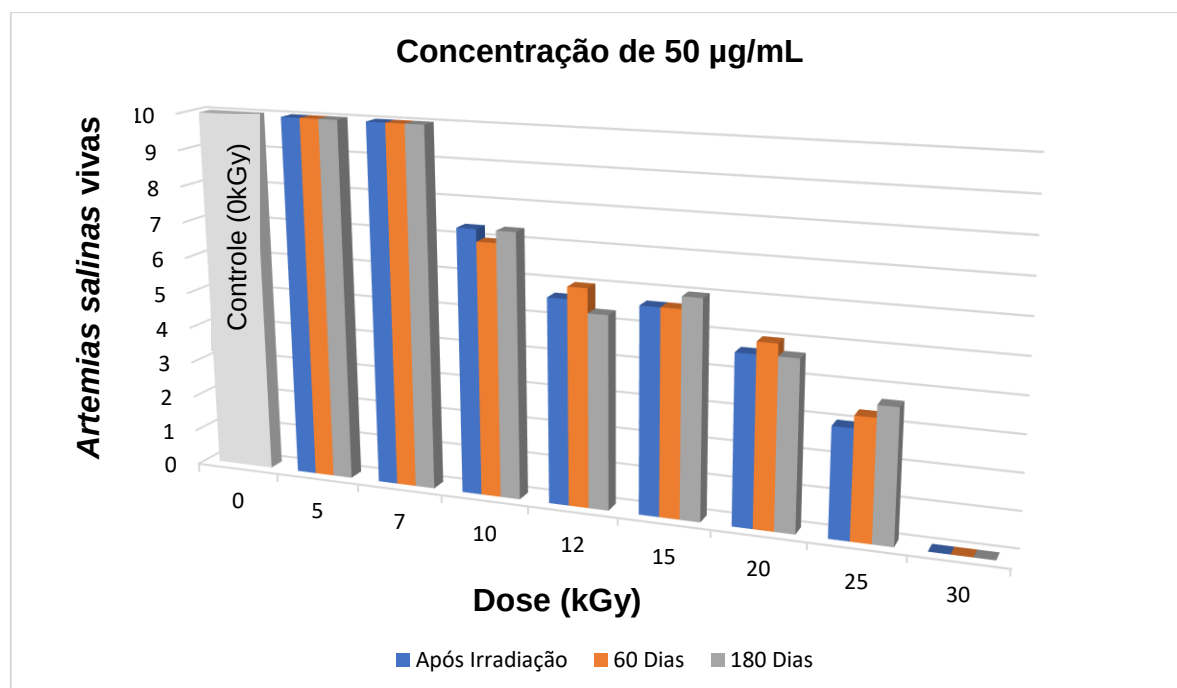
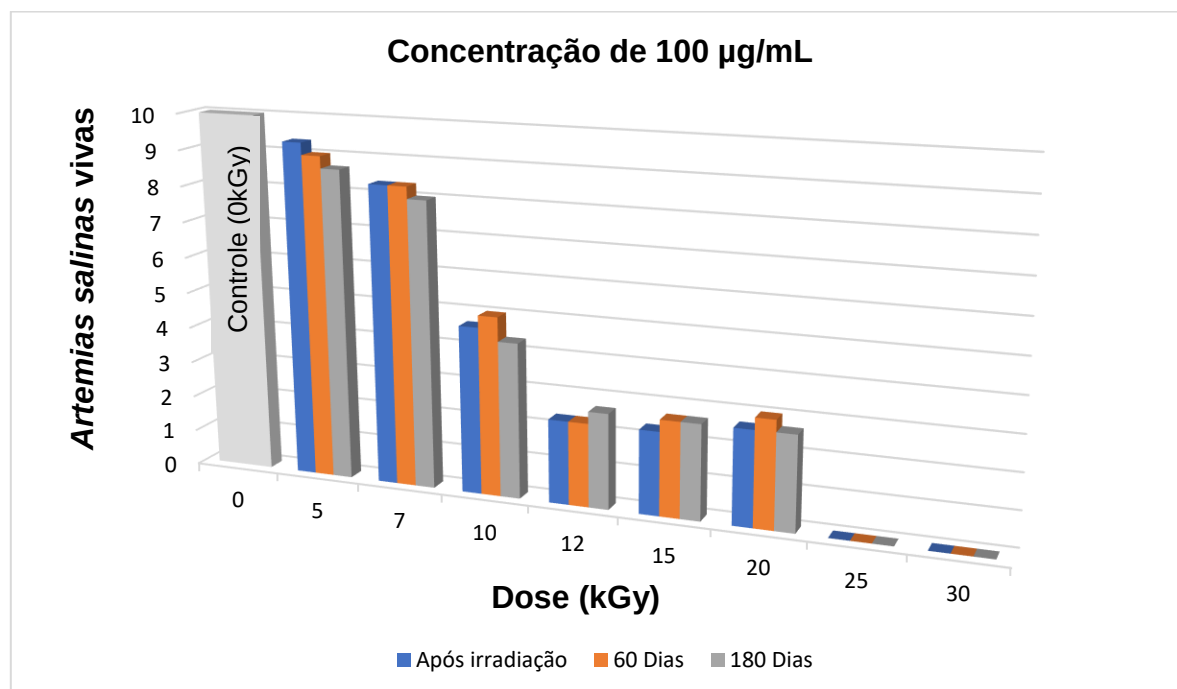


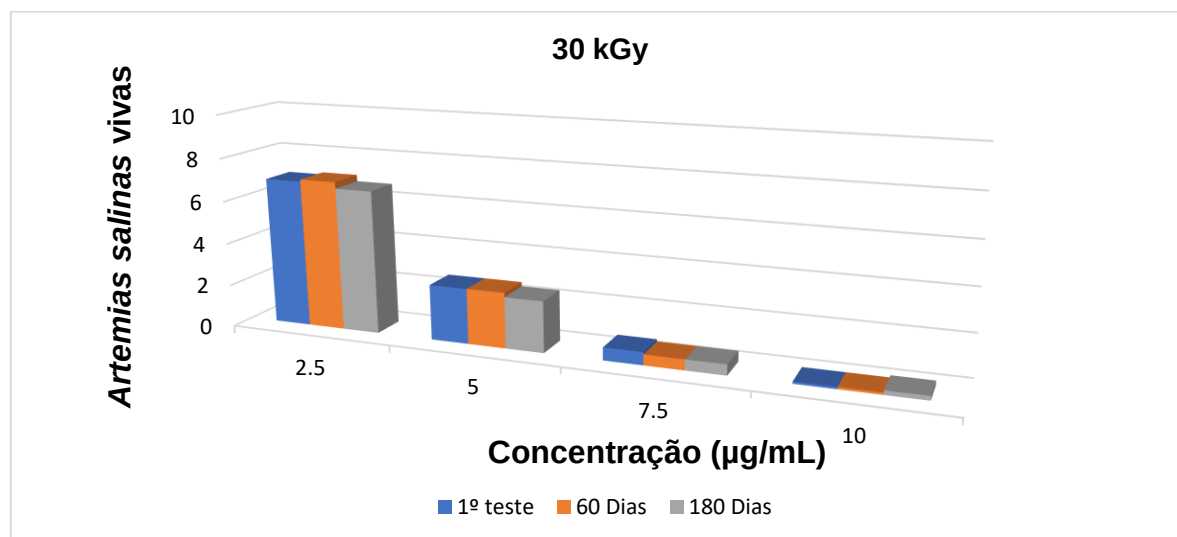
Figura 16 - Quantidade de indivíduos de *Artemia salina* vivos após teste de toxicidade do extrato de folhas de *Libidibia ferrea* para a concentração de 100 µg/mL submetida a diferentes doses de radiação gama (0, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 kGy) em três momentos distintos (após a irradiação; 60 e 180 dias depois).



Fonte: Próprio autor

Após o alto nível de toxicidade observado na dose de 30 kGy, optou-se por diminuir as concentrações e repetir o ensaio. Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que mesmo com concentrações menores foi observada alta toxicidade para as concentrações de 7,5 e 10 µg/mL. A concentração de 5 µg/mL também apresentou uma forte atividade tóxica, eliminando aproximadamente 80% da amostra, enquanto a menor concentração (2,5 µg/mL) mostrou atividade tóxica, porém, menor quando comparada às demais concentrações (aproximadamente 60% de mortalidade).

Figura 17 - Quantidade de indivíduos de *Artemia salina* vivos após teste de toxicidade do extrato de folhas de *Libidibia ferrea* na dose de 30 kGy para concentrações menores (10; 7,5; 5 e 2,5 µg / mL) em três diferentes tempos (1º teste; 60 e 180 dias após).



Fonte: Próprio autor

Para o teste de estabilidade do material em prateleira (Figuras 13-17) os resultados mostraram que não houve variações bruscas entre os períodos estudados, o que sugere uma boa estabilidade em relação ao tempo de armazenamento sob condições ideais.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com aqueles encontrados por Potenza e colaboradores (2003), os quais não observaram diferenças significativas entre o extrato bruto e os extratos irradiados de *Solano paniculatum*, *Dahlia pinnata*, *Lycopersicon esculentum*, *Nephrolepis pectinata*, *Ruta graveolens*, *Ficus elastica*, *Lavandula angustifolia*, *Rhododendro simssi*, *Agavi angustifolia*, *Ocinum basilicum*, *Coffea arabica* e *Hibiscus rosa-sinensis*, todos submetidos às doses de 5 e 7 kGy. De maneira semelhante, Santos e colaboradores (2013), que utilizaram radiação gama em doses de 5; 7,5 e 10 kGy no extrato de folhas de *Anacardium occidentale* Linn e testaram sua toxicidade em embriões de *Biomphalaria glabrata* e *Artemia salina*, observaram que a radiação não promoveu mudanças significativas na atividade tóxica do extrato nas doses de 5 e 7,5 kGy, apesar de a toxicidade ter aumentado de forma considerável na dose de 10 kGy quando comparado com as doses menores.

No entanto, esta pesquisa leva a conclusões diferentes dos resultados apresentados por Pessoa e colaboradores (2013), os quais mostram uma diminuição na toxicidade do extrato de *Caesalpinia pyramidalis* irradiado em relação ao extrato

não-irradiado, para determinação da toxicidade foram utilizados *Artemias salinas* e doses de 5, 7 e 10 kGy. Nenhum outro estudo foi encontrado na literatura que abrangesse essa temática.

4.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O extrato hidroalcoólico das folhas de *L. ferrea* foi caracterizado por uma coloração marrom escura e seu rendimento final foi de 250 g, após liofilizado. O extrato foi diluído em metanol para determinação quanto à presença de compostos secundários por cromatografia em camada delgada. As fases móveis e os padrões correspondentes a cada classe de metabólitos podem ser observadas na Tabela 2. Análises fitoquímicas revelaram a presença de fenóis, taninos e terpenos (Tabela 3).

Tabela 2 – Fases móveis e Padrões para determinação qualitativa da presença de metabólitos secundários em extrato vegetal (*Libidibia ferrea*).

Classe/ Molécula	Fase Móvel	Padrão
Taninos	Ácido fórmico; Metanol; Água (67:30:3)	Ácido Tânico
Flavonóides	Acetato de Etila; Ácido fórmico; Ácido acético glacial; Água (100:11:26)	Quercetina
Triterpenos	Tolueno; Clorofórmio; Etanol (40:40:20)	Lupeol
Óleos Essenciais	Tolueno; Acetato de Etila (93:7)	Alfavaca
Fenilpropanóide (Cumarina)	Tolueno; Éter (1:1)	Cumarina
Alcalóides	*	Escopolamina

Fonte: Próprio autor

* Teste de precipitação com Dragendorff

Tabela 3 – Detecção de classes de substâncias químicas presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de *Libidibia ferrea* pelo método cromatográfico de camada delgada (CCD).

Extrato Foliar de <i>Libidibia ferrea</i>									
Classes Químicas	Dose (kGy)								
	0	5	7	10	12	15	20	25	30
Taninos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonóides	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Triterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Óleos Essenciais	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenilpropanóides (Cumarinas)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-

– (Ausência) + (Presença) ++ (Presença Moderada) +++ (Presença Acentuada)

Fonte: Próprio autor

Taninos (+++), triterpenos (+) e óleos essenciais (+) foram encontrados sem diferença significativa entre os extratos irradiado e controle. Os flavonóides (+), em que a quercetina foi utilizada como padrão, apresentaram aumento da sua presença na placa de gel de sílica nos extratos tratados com diferentes doses de radiação (++) quando comparados ao material que não foi exposto ao tratamento por radiação ionizante (controle). Não houve presença de cumarinas e alcalóides em nenhum dos materiais analisados.

Magalhães e colaboradores (2003) estudaram as raízes, folhas, sementes e frutos de *Swartzia langsdorffii* Raddi (Leguminosae) e evidenciaram, na triagem fitoquímica, a presença dos seguintes metabólitos: triterpenóides, fenóis, taninos entre outros, os quais também foram encontrados no presente trabalho.

Dweck (2009) relata que, no estudo fitoquímico de materiais de origem vegetal, sua composição química pode variar de acordo com alguns fatores como a área de desenvolvimento da planta, solo, sazonalidade, tempo de colheita, preparo do material e parte da planta utilizada. No entanto, as classes de fenóis e taninos totais são geralmente encontradas em todos os testes fitoquímicos realizados, mostrando que esses compostos, provavelmente, estariam presentes nos extratos, independentemente das variáveis encontradas no momento da coleta e preparo do material.

Santos e colaboradores (2011) submeteram as cascas e folhas de *Anacardium occidentale* à radiação gama em doses variando de 5; 7,5 e 10 kGy e observaram que a radiação alterou o teor total de fenóis e taninos da casca e das folhas, mostrando uma maior significância, na presença quando comparado ao material não irradiado.

Nos estudos realizados por Mechi e colaboradores (2005), Miranda e colaboradores (2006), Stajner e colaboradores (2007) e Bhat e colaboradores (2007), também foi observado que a radiação ionizante foi capaz de alterar os níveis de metabólitos secundários das plantas. No entanto, Koseki e colaboradores (2002) relataram que, em seus resultados, nenhuma alteração de metabólitos secundários foi observada pela exposição à radiação ionizante, enquanto que, Brigide; Canniatti-Brazaca (2006) e Toledo e colaboradores (2007) relataram que houve diminuição de fenóis totais e taninos em suas amostras analisadas.

Segundo Stajner e colaboradores (2007), essa interação de radiação ionizante com material vegetal não segue um padrão fixo. Os resultados podem variar de acordo com alguns fatores, como a dose, densidade e tipo de material que será trabalhado (fresco ou seco).

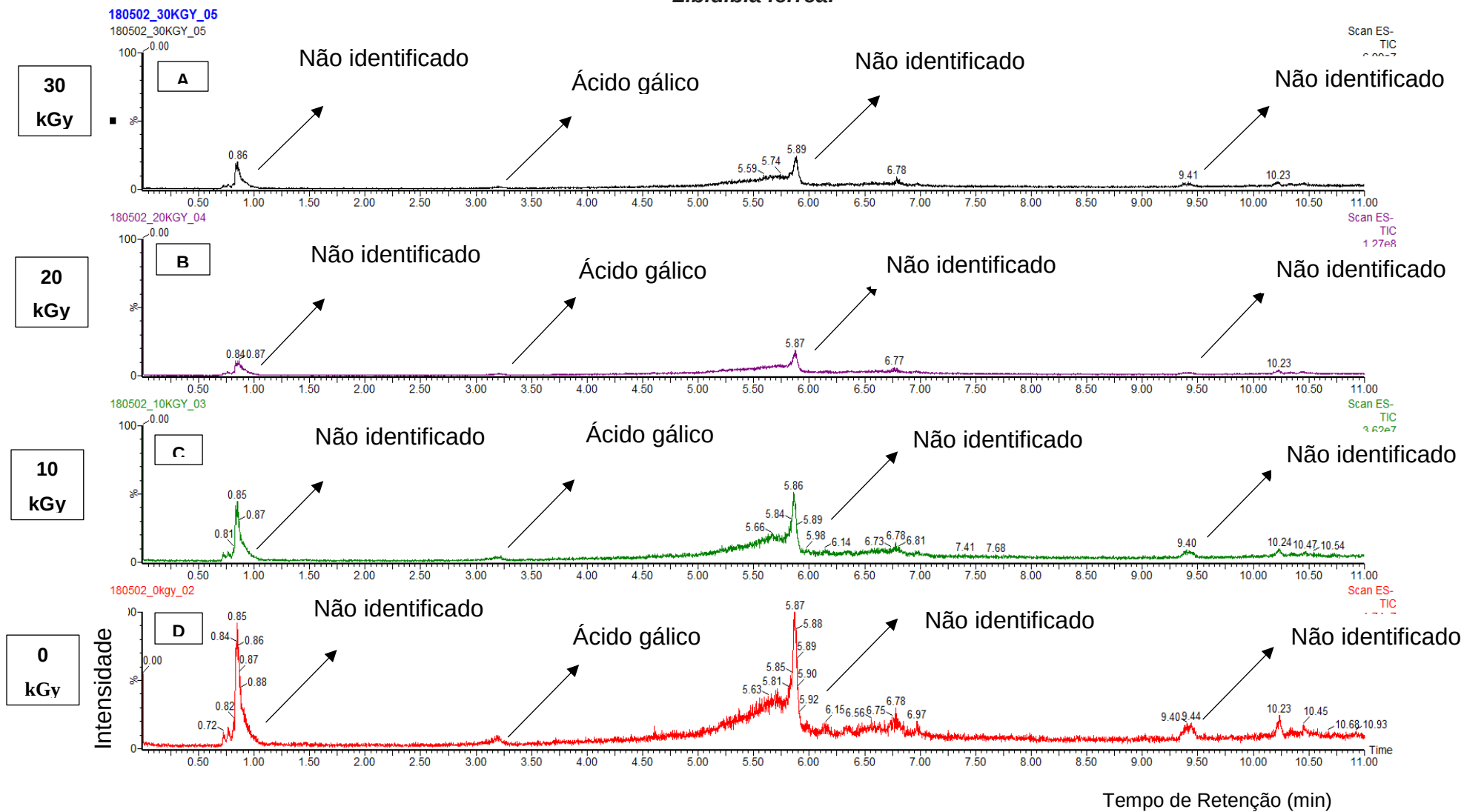
4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (UPLC-MS)

É possível observar claramente na Figura 18 uma degradação dos picos de compostos isolados pela técnica de UPLC-MS. Entre os picos que aparecem nos cromatogramas da Figura 18A, 18B, 18C e 18D, foi identificado apenas o ácido gálico através da biblioteca do equipamento, e comprovado pelo uso de um padrão, através de sua massa e tempo de retenção semelhantes. Este resultado sugere que a radiação gama é capaz de ocasionar a quebra de compostos maiores em menores, como pode-se observar na redução gradativa da altura dos picos à medida que há o aumento da dose de radiação aplicada. Provavelmente essa quebra ocasionou a formação de novas micromoléculas, o que justifica um aumento da toxicidade do material em relação à dose de radiação, uma vez que moléculas menores possuem uma maior difusão através do sistema em que são expostas. No entanto, não foi possível identificar ou mostrar a formação dessas novas

micromoléculas uma vez que o equipamento não é capaz de isolar moléculas menores que 100 Da.

Até o momento não foram encontrados na literatura trabalhos que abordem de maneira quantitativa a interação da radiação ionizante sobre a estrutura química de metabólitos secundários de plantas. No entanto, Soriane (2004) realizou uma análise quantitativa da presença de alguns compostos nos extratos de *Cynara scolymus* L., *Matricaria recutita* L., *Ginkgo biloba* L. e *Paullinia cupana* H.B.K., encontrando o composto 7-glicosil, que diminui de forma gradativa à medida que a dose de radiação foi aumentada (5; 7 e 15 kGy), de maneira semelhante aos resultados apresentados neste trabalho.

Figura 18 – Representação gráfica dos cromatogramas UPLC-MS dos extratos bruto (A) e irradiados a 10 (B), 20 (C) e 30 (D) kGy de *Libidibia ferrea*.

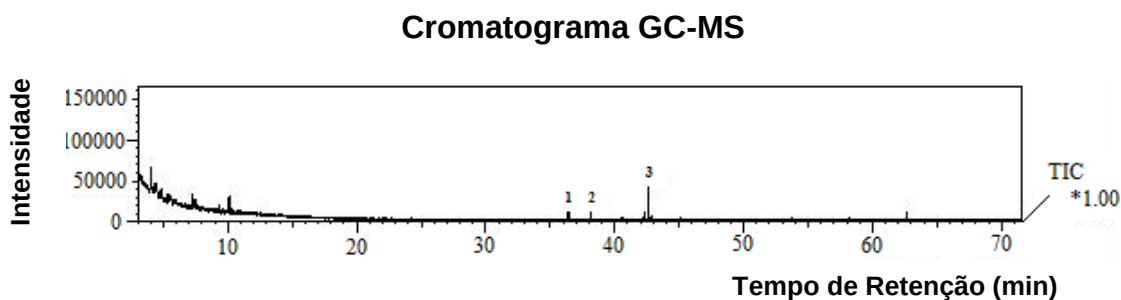


4.4 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

Os dados obtidos por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas mostraram que ocorreu modificação na estrutura molecular dos ácidos graxos, quando submetidos à radiação gama em qualquer dose, como pode ser visualizado nas Figuras 19, 20, 21 e 22.

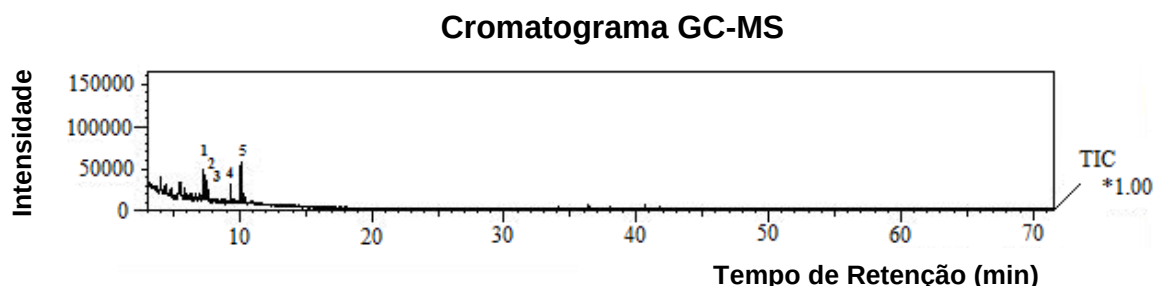
A Figura 19 apresenta o material que não foi submetido à radiação, é possível observar a presença de ácido carboxílico (ácido pentanóico; pico 1), presença de éster (ácido valérico; pico 2) e éter (1-trimetilsiloxi-3,7,11,15; pico 3). Na Figura 20, onde está o cromatograma do material submetido à dose de 10 kGy, é possível observar um aumento do número de picos e a presença de éster (éster de ciclohexil-isobutilico, pico 1; estér 1- metiletilico, pico 3), os picos 2 e 4 mostram hidrocarbonetos: 1-buteno e ciclohexano, respectivamente. O pico 5 mostra uma cetona, representada pela etanona.

Figura 19 - Representação gráfica dos picos de (1) Ácido Pentanóico (36.408 Min), (2) Ácido Valérico (38.125 Min) e (3) 1-Trimetilsiloxi-3,7,11,15 (42.642 min) do extrato não irradiado de *Libidibia ferrea* obtidos pelo método de GC-MS.



Fonte: Próprio autor

Figura 20 – Representação gráfica dos picos de (1) Estér de ciclohexil-isobutilico (7,233 min), (2) 1-Buteno (7,425 min), (3) Estér 1-Metiletílico (7,575 min), (4) Ciclohexano (9,308) e (5) Etanona (10.117) da amostra irradiada de *Libidibia ferrea* na dose de 10 kGy obtidos pelo método de GC-MS.

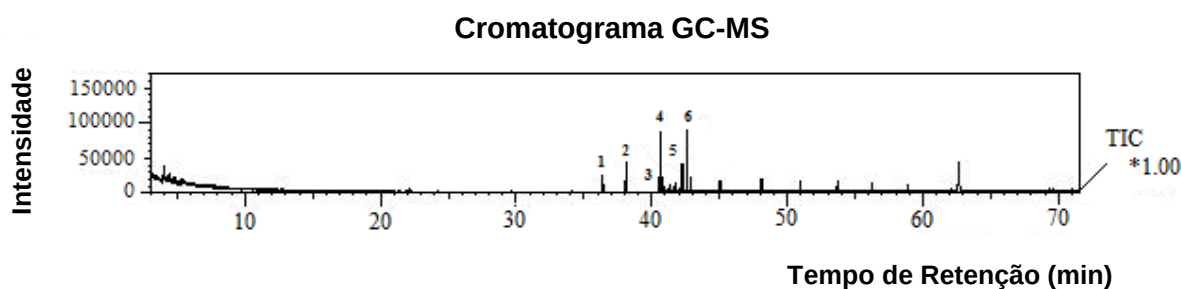


Fonte: Próprio autor

A dose de 20 kGy é representada pela Figura 21. É possível observar um aumento dos picos e da intensidade em relação às doses menores. Pode-se observar a presença de ésteres nos picos 1, 2 e 4, representados pelas moléculas Éster Metil, Ácido Tridecanóico e Éster Metil, respectivamente. O pico 3 revela um hidrocarboneto representado pela molécula Ciclo- hexilideno, o pico 5 está representando o Ácido Linoléico, e o pico 6 é representado pela molécula Silano.

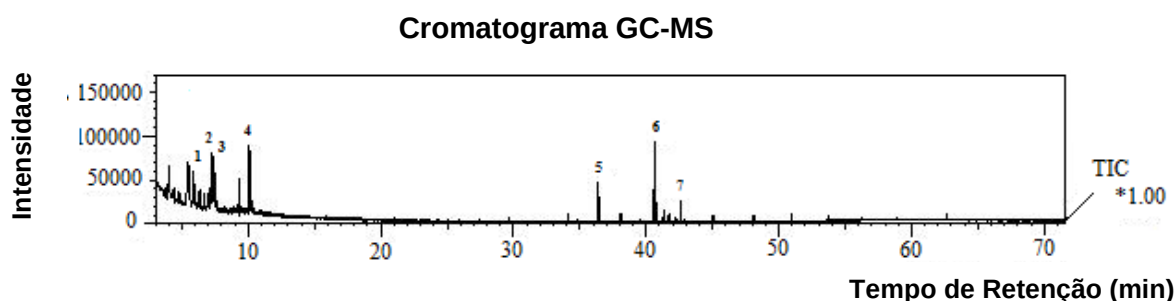
Para a dose de 30 kGy foi observado, além do aumento dos picos e da intensidade quando comparado com as doses menores, uma esterificação das moléculas (Figura 22). O pico 1 representa a molécula Éster de Ciclobutilo, o pico 2 representa a Éster Pentil de Ciclohexil e os picos 3, 4, 5, 6 e 7 representam a molécula de Éster Metil de ácido graxo.

Figura 21 - Representação gráfica dos picos de (1) Éster metil de ácido graxo (36,392 min), (2) Ácido tridecanóico (38,117 min), (3) Ciclohexilideno (40,542 min), (4) Éster metil de ácido graxo (40,700), (5) Ácido linoléico (42,267) e (6) Silano (42,625) da amostra irradiada de *libidibia ferrea* na dose de 20 kgy obtidos pelo método de gc-ms.



Fonte: Próprio autor

Figura 22 – Representação gráfica dos picos de (1) Éster de Ciclobutilo (5,850 min), (2) Éster Pentil de Ciclohexil (7,225 min), (3) Éster Metil de ácido graxo (7,408 min), (4) Éster Metil de ácido graxo (10,092), (5) Éster Metil de ácido graxo (36,392), (6) Éster Metil de ácido graxo (40,700) e (7) Éster Metil de ácido graxo (41,325) da amostra irradiada a uma dose de 30 kGy obtida pelo método de GC-MS.



Fonte: Próprio autor

Os resultados obtidos por cromatografia gasosa sugerem que houve uma alteração estrutural dos ácidos graxos causada pela radiação. Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem os efeitos da radiação sobre ácidos graxos. No entanto, Day; Papaioannou (1963) empregaram altas doses de radiação gama (15, 30 e 45 kGy) no leite, o que possivelmente ocasionou alterações muito intensas na estrutura dos lipídios, mas também não encontraram linearidade na quantidade de carbonilas livres pela técnica de Cromatografia Gasosa.

Outros autores confirmam a ocorrência de oxidação lipídica ocasionada pela radiação ionizante em produtos ricos em gorduras, como o leite e seus derivados, através de outras metodologias, como índice de peróxido, índice de iodo e cromatografia gasosa (DAY; PAPAIOANNOU, 1963), índice de peróxido (ABDEL BAKY *et al.*, 1986; IBRAHIM *et al.*, 1987; SEARLE; MCATHEY, 1989), e quantificação dos ácidos graxos saturados e insaturados após o tratamento por radiação (IBRAHIM *et al.*, 1987).

Nesses trabalhos verificou-se que no leite a radiação gama conduziu a um aumento dos valores de peróxido e ácidos graxos saturados, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho, em que a quantidade de ácidos graxos é aumentada à medida que se aumenta a dose de radiação (0, 10, 20 e 30 kGy).

5 CONCLUSÃO

- Os níveis de toxicidade do extrato de *Libidibia ferrea* aumentaram consideravelmente com a dose de radiação gama;
- As análises desses extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) permitiu a identificação de compostos pertencentes à classe dos fenóis e terpenos, mas sem diferença significativa entre os extratos bruto e irradiados. Por outro lado, a presença de flavonóides foi constatada, com diferenças significativas entre os extratos brutos e os irradiados;
- Os resultados obtidos por cromatografia gasosa, acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), evidenciaram um aumento na quantidade e intensidade dos picos (complexos químicos) com o aumento da dose de radiação.
- As análises por cromatografia líquida, de ultra performance acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS), constatou a presença do ácido gálico, tendo indicado também a presença de outros complexos, porém sem identificação;
- Não foram encontradas diferenças entre os níveis de toxicidade dos extratos logo após a irradiação, com os resultados obtidos 60 e 180 dias de estocagem, indicando que o material irradiado mante-se estável ao longo desse período.

REFERÊNCIAS

- ABDEL BAKY, A. *et al.* The manufacture of Ras cheese from gama irradiated milk. **Food Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 201- 212, 1986.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 144-140, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethno pharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76-91, 2007.
- ALCANTARA, R. G. L.; JOAQUIM, R. H. V. T.; SAMPAIO, S. F. Plantas medicinais: o conhecimento e uso popular. **Revista de APS**, v. 18, n. 4, p. 470-482, 2015.
- ALMEIDA, C. F. B. R. *et al.* Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, n. 1, p. 127-142, 2005.
- ALMEIDA, C. F. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciencia**, v. 27, n. 6, p. 276-285, 2002.
- ALVES, H. D. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10-15, 2001.
- ALVES, R. R. N. *et al.* Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 3, p. 175-198, 2007.
- BALBACH, A. **As plantas curam**: 1 ed. São Paulo: Editora Missionária, 1992.
- BARILLOT, I. *et al.* Impact on treatment outcome and late effects of customized treatment planning in cervix carcinomas: baseline results to compare new strategies. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 48, n. 1, p. 189-200, 2000.
- BEDNARCZUK, V. O. *et al.* **Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais**. Visão Acadêmica, Curitiba. v.11, n. 2, p.44, 2010.
- BEHRENS, J. H. *et al.* Brazilian consumer views on food irradiation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n.3, p. 383-389, 2009.

BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.** 2008. Dissertação (Mestrado em Zootecnia Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

BHAT, R.; SRIDHAR, K. R.; TOMITA-YOKOTANI K. Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*). **Food Chem**, v. 103, n. 3, p. 860- 866, 2007.

BRANDÃO, H. N. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Decreto nº 5.813 do ano de 2006, Brasília, 2013. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acessado em: 31/03/17.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº. 21. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2001

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2016/2017: **incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização mundial da saúde. Câncer no Brasil. **World cancer report da International Agency for Research on Cancer (IARC)**, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologias e insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. – Brasília: Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica – (**Série B. textos básicos de saúde**), 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologias e insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. – Brasília: Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica, (**Série B. textos básicos de saúde**), 2009.

BRIGIDE, P.; CANNIATI- BRAZACA, S. G. Antinutrients and *in vitro* availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chem**, v. 98, n. 1, p. 85- 89, 2006.

BURNHAM, R.J.; JOHNSON, K.R. South American palaeobotany and the origins of neotropical rainforests. **Philosophical Transaction Royal Society of London B** **359**, v.359, n. 1450, p. 1595-1610, 2004.

CALVO, W. A. P. **Desenvolvimento de sistema de irradiação em irradiadores multipropósito de cobalto- 60 tipo compacto**. 2005. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídicos**: 5ª ed. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2003. p. 519-535.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phythererapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183-205, 2001.

CÓRDULA, E.; QUEIROZ, L. P.; ALVES, M.; Diversidade e distribuição de leguminosae em uma área prioritária para a conservação da caatinga em Pernambuco – Brasil. **Revista Caatinga**, v.23, n. 3, 2010.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York,

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. New York: Americam Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DAY, E. A.; PAPAIOANNOU, S. E. Irradiation-Induced Changes in Milk Fat. **Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 11, p. 1201-1206, 1963.

DENTON A. S. *et al.* Gynaecology-Oncology Group National audit of the management and outcome of carcinoma of the cervix treated with radiotherapy in 1993. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 12, n. 6, p. 347–353, 2000.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**: 2. ed. London: John Wiley & Sons, 2002.

DIAS, G. T. *et al.* Toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides*. **Revista Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 8-12, 2017.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843–847, 2001.

DRUMOND, M. A. *et al.* **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da Caatinga (Documento para discussão no GT Estratégias para o uso sustentável)**. In: Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. Petrolina, 2000.

EL-SAYED, M.; VERPOOORTE, R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. **Phytochemistry reviews**, v. 6, n. 2-3, p. 277-305, 2007.

FACCHINI, P. J.; LUCA, V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 763-84, 2008.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à Análise Fitoquímica**: 2ª ed. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. p. 163-179.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Quím. nova**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FOKDAL, L. *et al.* Long-term bladder colorectal, and sexual functions after radical radiotherapy for urinary bladder cancer. **Radiother Oncol**, v. 72, n. 2, p.139–145, 2004.

FUKUMASU, H. *et al.* Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de toxicologia**, v. 21, n. 2, p.49-59, 2008.

FURGERI, C. *et al.* Evaluation of phenolic compounds in maté (*Ilex paraguariensis*) processed by gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, n. 7-8, p. 639-641, 2009.

GALDINO, G.; MESQUITA, M. R.; FERRAZ, I. D. K. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, n. 2, p. 747-749, 2007.

Globocan (IARC), Section of cancer information. França: **International Agency for Cancer Research**, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOPAL, N. G. S. **Radiation sterilization of pharmaceuticals and polymers. Radiation Physics and Chemistry**. v. 12, n. 1-2, p. 35-50, 1978.

GUNN, C. R. Fruits and seeds of genera in the subfamily Mimosoideae (Fabaceae). **Technical Bulletin 1681**, v.1, p.194, 1984.

GUPTA, R. N.; SPENCER, I. D. Biosynthesis of the piperidine nucleus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 1, p. 88-94, 1969.

HALLMAN, G. J. Phytosanitary Applications of Irradiation. Phytosanitary Applications of Irradiation. **Comprehensive reviews in food science and food safety**. v. 10, n. 2, p. 143 -151, 2011.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: generalidades e aspectos básicos**: 4^a ed. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2002. p.651-666.

IBRAHIM, M. K. ; EL-BATAWY, M. A.; EL-SAYED, S. A. Comparative studies on gamma irradiated fatty dairy products. **Egyptian Journal of Dairy Science**, v.15, n.2, p.221-228, 1987.

JAN, S.; PARWEEN, T.; SIDDIQI, T. O. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. **Environmental Reviews**, v. 20, n. 1, p. 17-39, 2012.

JUDD, W.S. *et al.* **Plant Systematics. A phylogenetic approach**. Sunderland, Sinauer Associates, 1999.

HELDT, H. W. **Plant Biochemistry**. Elsevier Academic Press. Third Edition, 2005.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull**: 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

KOSEKI, P. M. *et al.* Effect of irradiation in medicinal and eatable herbs. **Radphy chem**, 63, n. 3-6, p. 681- 684, 2002.

KUMMAR, V. *et al.* **Pathology Basis of Disease**: 7a. ed. WB Saunders: China, 2004.

LUNA, J. S. *et al.* **A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil**. *Journal of Ethnopharmacology*. v.97, p. 199-206, 2005.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARRAFFA, J. M.; COHEN, V.; HOWLAND, M. Antidotes for toxicological emergencies: A practical review. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v. 69, p. 199-212, 2012.

MAGALHÃES, A. F. *et al.* Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 713-718, 2003.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**: 1ª ed. São Paulo: D & Z Computação Gráfica e Editora, 2004.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. **The use of biological assays to evaluate botanicals**. *Drug Inf. J.*, v. 32. p513-524, 1998.

MECHI, R.; CANIATTI- BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiado. **Cien Tecnol Alim**, v. 25, n. 1, p. 109-114, 2005.

MIRANDA, M. B.; HORRI, J.; ALCARD, A. R. Estudos do efeito da radiação gama (60Co) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. **Cien Tecnol Alim**, v. 26, n. 4, p. 772- 778, 2006.

MOHAJER, S. *et al.* Stimulatory Effects of Gamma Irradiation on Phytochemical Properties, Mitotic Behaviour, and Nutritional Composition of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). **The Scientific World Journal**, doi org/10.1155/2014/854093, 2014.

MOREHOUSE, M. K.; KOMOLPRASERT, V. Irradiation of Food and Packaging: An Overview. ACS Symposium Series. **American Chemical Society**, p. 1-11, 2004.

NAKANO, T. M. D. *et al.* Long-term results of high-dose rate intracavitary brachytherapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Câncer**, v. 103, n. 1, p. 92-101, 2004.

NASCIMENTO, J. E. *et al.* **Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae).** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v. 29, p. 143-148, 2008.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. **Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos.** In: CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia.** Itajaí: Editora Universidade do vale do Itajaí/Univali, 2007. p. 239-257.

OGA, S. *et. al.*, **Fundamentos de Toxicologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014.

OKUNO, E., YOSHIMURA, E. **Física das radiações.** São Paulo: Oficina de Textos, 2010.

OLIVEIRA, R. B., GODOY, S. A. P., COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes.** Ribeirão Preto: Editora Holos, 2003.

PARRA, L. A. *et al.* **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts.** *Phytomedicine.* v. 8, p. 395-400, 2001.

PESSOA, J. G. *et al.* **Avaliação da toxicidade do extrato metanólico de *caesalpinia pyramidalis*, submetido à radiação gama, frente à artemias salinas.** International Nuclear Atlantic Conference – INAC. Associação Brasileira de Energia Nuclear – ABEN, 2013. p. 24-29.

PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento:** 5ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2001.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário.** Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1-10, 2004.

PINOTTI, J.A. Câncer de mama. **Compêndio de mastologia.** São Paulo, p.100-126, 1991.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C.H. **Evolution and systematics of the Leguminosae.** In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P. H. *Advances in Legume Systematics.* Kew, **Royal Botanic Gardens**, 1981.

POTENZA, M. R. *et al.* Avaliação de produtos naturais irradiados para o controle de *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: blattellidae). **Arq. Inst. Biol.**, v.71, n.4, p.485-492, 2004.

POTTER, R.; HAIE-MEDER, C.; VAN LIMBERGEN, E. Recommendations from gynaecological (GYN). **Radiother Oncol**, v. 78, n. 1, p. 67–77, 2006.

PRICHARD, E.; MACKAY, G. M.; POINTS, J. Trace analysis: a structured approach to obtaining reliable results. Cambridge: **The Royal Society of Chemistry**, 1996.

QUEIROZ, L. G. **Leguminosas da caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana. 467p, 2009.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906 p, 2001.

RAZEM, D.; KATUSIN-RAZEM, B. The effects of irradiation on controlled drug delivery controlled drug release systems. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 77, n. 3, p. 288-344, 2008.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. **Diversidade e domesticação de plantas medicinais**: 5ª ed. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.*; Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2033. p. 45-74.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia & Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editora Premier, 1997.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

ROUTLEDGE, J. A. *et al.* Evaluation of the LENT-SOMA scales for the prospective assessment of treatment morbidity in cervical carcinoma. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 56, n. 2, p. 502-510, 2003.

SANTOS, R. I. **Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários**: 4ª ed. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia – da planta ao medicamento.. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2000. p. 333-365.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. **Taninos**: 5ª ed. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2003. p. 615-655.

SARTORI, E.; ZANAGNOLO, V. Complications following radical hysterectomy for cervical carcinoma. **Ricenti. Prog. Med.**, v. 94, n. 12, p. 562-567, 2003.

SAMPAIO, E., RODAL, M. J. **Fitofisionomias da Caatinga**. (Documento para discussão no GT Botânica). In: Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. Petrolina, 2000.

SANTOS, G. H. F. *et al.* Influence of gamma radiation on the antimicrobial activity of crude extracts of *Anacardium occidentale* rich in tannins. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 444-449, 2011.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. 5ª ed. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC. 2003. p. 615-655.

SCHVARTSMAN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos. **Editora Sarvier, 2ª Edição**: São Paulo – Brasil, 1992.

SEARLE, A. J. F.; McATHEY, P. Treatment of Milk by Gamma Irradiation – Effect of Anoxia on Lipid Peroxidation and the Survival of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the science of Food and Agriculture**, v. 48, n. 3, p. 361-367, 1989.

SHARMA, C. *et al.* Indian traditional therapies and bio-prospecting: their role in drug development research. **International Journal of Pharmaceutica I Sciences and Research**, v. 5, n. 3, p. 730-741, 2014.

SHIM, S. L. *et al.* Effect of γ -irradiation on the volatile compounds of medicinal herb, *Paeoniae radix*. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, n. 7-8, p. 665-669, 2009.

SIDDHURAJU, P.; MAKKAR, S. P. H.; BECKER, K. The effect of ionising radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. **Food Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 187-205, 2002.

SILVA, F. A. **Simbiose micorrízica arbuscular em pau-ferro (*Libidibia ferrea* (Mart. exTul.) L.P. Queiroz var. *ferrea*) visando maximização da produção de**

fitoquímicos foliares com potencial medicinal 2014. Tese (Doutorado em biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, F. A.; SILVA, F. S. B.; MAIA, L. C. Biotechnical application of arbuscular mycorrhizal fungi used in the production of foliar biomolecules in ironwood seedlings (*Libidibia ferrea*(Mart. ex Tul.) L.P.Queiroz var. *ferrea*). **J. Med. Plants Res**, v. 8, n. 22, p. 814-819, 2014.

SILVA, F. A. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi increase gallic acid production in leaves of field grown *Libidibia ferrea* (Mart. ExTul.) L. P. Queiroz. **J. Med. Plants Res**, v. 8, 2014.

SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 3, p. 57-60, 2008.

SILVA, M. A. *et al.* Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) associadas a fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota). **Acta botânica brasileira**, v. 18, p. 981-985, 2004.

SILVA, M. L. C. *et al.* Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, T. M. *et al.* Changes in the essential oil composition of leaves of *Echinodorus macrophyllus* exposed to γ -radiation. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 4, p. 600-607, 2013.

SILVA, T. M. *et al.* Effect of the γ -radiation on phenol fractions obtained from the leaves of *Echinodorus macrophyllus* Mich. **Radiation Physics Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 22-26, 2012.

SILVEIRA, P. F; BANDEIRA, M. A. M; ARRAIS, P. S. D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade**. Rev Bras Farmacogn. v. 18, p. 618-626, 2008.

SORIANE, R. R. **Irradiação de drogas vegetais: aspectos microbiológicos e químicos**. 2004. Dissertação (Mestrado em Farmaco e medicamentos). São Paulo, SP: Universidade de São Paulo.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, Editora Plantarum. Spjut, R.W. 1994. A systematic, 2005.

SOUEN, J. S. **Oncologia Genital Feminina**: 2 ed. São Paulo: Editora LEMAR, 2001.

STAJNER, D.; MILOCEVIC, M.; POPOVIC, B. M. Irradiation Effects on Phenolic Content, Lipid and Protein Oxidation and Scavenger Ability of Soybean Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 7, p. 618-627, 2007.

STEVENS, P.F. **Angiosperm phylogeny**, 2006. website. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**: 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**: 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry. **Springer**, 2006.

VENSON, R. *et al.* Avaliação econômica das anticitocinas adalimumabe, etanercepte e infliximabe no tratamento da artrite reumatoide no Estado do Paraná. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**. v. 21, p. 359-376, 2011.

VELASCO, F. G. *et al.* Gamma radiation effects on molecular characteristic of vegetable tannins. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 299, n. 3, p. 1787-1792, 2014.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin layer chromatography in phitochemistry. **Chromatographic Science Series**: 1ª ed. CRC Press, 2008.

WATSON, J. D. **Molecular biology of the gene**: 1ª ed. New York: W. A. Benjamin, 1965.

YANG, L.; STÖCKIGT, J. Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 27, n. 10, p. 1469-79, 2010.

ZUANAZZI, J.A.S. **Flavonóides**: 2^a ed. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2000. p. 489-515.

ZÚÑIGA, G. E. *et al.* Effect of ionizing energy on extracts of *Quillaja saponaria* to be used as an antimicrobial agent on irradiated edible coating for fresh strawberries. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 64-69, 2012.

Anexo A – Registro de comprovação da espécie vegetal**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
HERBARIUM PEUFR**

Fam: Fabaceae (Leguminosaeae)

Esp.: *Libidibia ferrea* var *ferrea* (Registo nº 53285)

Det.: Data:

Local: Praça Euclides da Cunha, Rua: Benfica, Madalena, Recife-PE, Brasil.

Habitat: Zona urbana do Recife- PE, brasil, praça Euclides da Cunha.

Nome vulgar: Pau-ferro

Col.: Data: Luiz da Silva Maia Neto/ 01/12/2016

Obs.: A casca é cinza-escuro, lisa e fina, as folhas são verde escuro por cima e verde claro por baixo, alternas, constituídas de 2 a 4 pares de pinas e cada pina possui de 4 a 6 pares de folíolos menores, as flores são pequenas e amarelas, em panículas, o fruto é uma vagem, com 6-8 cm de comprimento e aproximadamente 1,5 cm de largura, coriácea e com polpa seca, as sementes são marrons e duras.