



Universidade Federal
de Campina Grande

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

JAIR DANTAS ALVES

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Sida santaremnensis* ATRAVÉS DO
BIOENSAIO COM *Artemia salina* LEACH**

CUITÉ - PB

2014

JAIR DANTAS ALVES

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Sida santaremnensis* ATRAVÉS DO
BIOENSAIO COM *Artemia salina* LEACH**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de bacharelado em farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, como requisito obrigatório à obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Sousa Oliveira

CUITÉ – PB

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

A474i Alves, Jair Dantas.

Investigação da toxicidade de *Sida santaremnensis* através do bioensaio com *Artemia salina* leach. / Jair Dantas Alves. – Cuité: CES, 2014.

51 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2014.

Orientador: Fernando de Sousa Oliveira.

1. *Artemia salina*. 2. Toxicidade. 3. *Malvaceae*. I. Título.

CDU 615.1

JAIR DANTAS ALVES

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Sida santaremnensis* ATRAVÉS DO
BIOENSAIO COM *Artemia salina* LEACH**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Farmácia,
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Fernando de Sousa Oliveira

Orientador (a)-UFCG/CES

Profª Dra. Júlia Beatriz Pereira de Souza
UFCG/CES

Profº Dr. Renner de Souza Leite
UFCG/CES

DEDICO,

*Aos meus pais, familiares, amigos e namorada por todo apoio, dedicação,
amor e carinho que me ofereceram, pelo incentivo, compreensão,
e pela orientação nas decisões tomadas.*

*Ao meu orientador, Profº Fernando de Sousa Oliveira,
por todo o incentivo e orientação. Um professor e amigo que tenho
grande respeito e admiração, o qual sou muito grato por tudo.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, pela dádiva da vida e por proporcionar essa conquista;
- ❖ Aos meus pais Rita Dantas e João Dantas, pela dedicação, apoio e confiança, que sempre estiveram ao meu lado e acreditaram em minhas decisões;
- ❖ A minha namorada Amaria Vitória, pela paciência, dedicação, compreensão, carinho, companheirismo e incentivo, que sempre me acolheu com muito amor;
- ❖ As minhas tias Ivone Dantas e Hozana Dantas pelo apoio, carinho, pelas orientações e incentivo durante todos esses anos;
- ❖ Ao meu orientador Fernando de Sousa Oliveira, pela orientação, dedicação, paciência no esclarecimento de dúvidas, pela disponibilidade e atenção desde o PIBIC até a conclusão deste trabalho;
- ❖ Ao meu grande amigo, Igor de Oliveira Maia, pela amizade, por toda ajuda prestada, pelos seus conselhos e principalmente pelas suas ações durante todos esses anos;
- ❖ As amigas e colegas, Jackelne Pasquino, Jéssica Lima e Laisla Rangel, pelo apóio durante;
- ❖ Aos meus companheiros de casa, Talles Wikley, Jurandir Neto, Marcos Dantas e ao meu primo Hugo Garcia pela boa convivência e ajuda durante todo o curso;
- ❖ A todos os meus professores pela construção e disponibilidade em diversos conhecimentos;
- ❖ A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho;

Muito Obrigado.

Roda Gigante

*A fúria da memória é perturbante;
A imagem de um passado conflitante;
Na cabeça ideias, no coração uma amante;
Nas entrelinhas todo um contexto de sentimento errante.*

*Da janela lateral, sob vidro, uma imagem espectral;
A imagem é clara, é simples, é unidirecional;
Como flechas de um filme, a memória é transcendental;
Arrastam das entranhas as mágoas do passado prejudicial.*

*O gira e volta da roda gigante da vida gira;
Quem está por baixo vai para o meio, vai para cima;
Quem estava por cima desce tão rápido que nem imagina;
Que perde as rédeas da situação e seu mandato já termina.*

*Coração ferido e com a cabeça rente ao chão;
Nessa altura do campeonato já vale até pedir perdão;
Não se sabe o paradeiro, não se tem absorção;
Cresce as chagas da alma e o vazio do coração.*

(Jair Dantas)

RESUMO

Desde os primórdios da humanidade, plantas medicinais são utilizadas como recurso terapêutico. Cerca de 60-80% da população dos países em desenvolvimento, depende de plantas para cuidar de sua saúde. Poucas espécies, 5% têm sido cientificamente estudadas sobre suas potencialidades terapêuticas e tóxicas. É necessário buscar alternativas que auxiliem na descoberta da toxicidade das plantas utilizadas pela população. O presente trabalho teve como objetivos, avaliar o potencial toxicológico de do extrato etanólico bruto e frações (hexânica, diclorometânica, acetatoetílica e hidroalcoólica) de *Sida santaremnensis*, de forma a contribuir para sua avaliação toxicológica, visando à utilização mais segura em estudos farmacológicos posteriores e determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) do extrato etanólico bruto e das frações oriundas dessa planta como parâmetro de toxicidade. Para tanto, foi realizado o bioensaio com os cistos de *Artemia salina* descrita por Meyer. O extrato etanólico bruto apresentou uma CL₅₀ = 24,44(20,00 – 28,88) µg.ml⁻¹, a fração diclorometânica uma CL₅₀ = 123,7 (77,87 – 196,4) µg.ml⁻¹, a fração hidroalcoólica uma CL₅₀ = 566,0 (509,4 – 629,0) µg.ml⁻¹, a fração hexânica uma CL₅₀ = 256,2 (188,6 - 372,9) µg.ml⁻¹ e a fração acetatoetílica CL₅₀ = 100,0 (92,98 - 107,6) µg.ml⁻¹.As frações diclorometânica e hexânica, apresentaram toxicidade moderada, a fração hidroalcoólica, apresentou baixa toxicidade, a fração acetatoetílica e o extrato etanólico bruto apresentaram maior toxicidade.

Palavras-chave: Malvaceae, Toxicidade e *Artemia salina*.

ABSTRACT

Since the dawn of humanity, medicinal plants are used as therapeutic resource. Circa 60-80% of the population of developing countries, depend on plants to take care of your health. A few species, 5% have been scientifically studied for their potential therapeutic and toxic. It is necessary to seek alternatives to aid in the discovery of the toxicity of the plants used by the population. The present work aims to evaluate the toxicological potential of crude ethanol extract and phases (hexanic, dichlorometanic, acetatoetíllica and hydroalcoholic) of *Sida santaremnensis*, so as to contribute to their toxicological evaluation, aiming at safer use in pharmacological studies and determine the 50% lethal concentration (LC_{50}) of crude ethanol extract and the phases from this plant as parameter of toxicity. To this end, bioassay was applied with the cysts of *Artemia salina* described by Meyer. The crude ethanol extract presented an $LC_{50} = 24,44$ (20,00 - 28,88) $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, the dichlorometanic phase a $LC_{50} = 123,7$ (77,87 - 196,4) $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, the hydroalcoholic phase a $LC_{50} = 566,0$ (509,4 - 629,0) $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, the hexanic phase a $LC_{50} = 256,2$ (188,6 - 372,9) $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, and the acetatoetíllica phase $LC_{50} = 100,0$ (92,98 - 107,6) $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. The diclorometânica phases and hexanic, showed moderate toxicity, the hydroalcoholic phase, presented low toxicity, the acetatoetíllica phase and the crude ethanolic extract demonstrated higher toxicity.

Keywords: Malvaceae, toxicity, brine shrimp

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------------------|------------------------------|
| AcOEt | Acetato de etila |
| BST | Brine Shrimp Test |
| °C | Grau Celsius |
| CES | Centro de Educação e Saúde |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| CL ₅₀ | Concentração letal mediana |
| Cm | Centímetro |
| CP | Consulta Pública |
| DL ₅₀ | Dose letal mediana |
| EEB | Extrato etanólico bruto |
| EtOH:H ₂ O | Hidroalcoólica |
| g | Gramma |
| h | Horas |
| Hex | Hexânica |
| Mg | Miligramma |
| mL | Mililitro |
| nº | Número |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |

| | |
|------|--|
| p. | página |
| UFCG | Universidade Federal de Campina Grande |
| UFPB | Universidade Federal da Paraíba |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| W | Watts |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - <i>Sida santaremnensis</i> (H. Monteiro). Foto: Daniel Dias Rufino Arcanjo, abril de 2007, no Parque Piauí, Teresina/PI..... | 24 |
| FIGURA 2 - <i>Artemia salina</i> Leach..... | 26 |
| FIGURA 3 - Incubadora com divisória contendo furos..... | 28 |
| FIGURA 4 - Parte recoberta do sistema contendo os cistos..... | 29 |
| FIGURA 5 - Incubadora sob exposição à luz..... | 29 |
| FIGURA 6 - Viabilidade das larvas de <i>Artemias salina</i> em função da concentração da fração diclorometânica- CH_2Cl_2 de <i>Sida santaremnensis</i> | 36 |
| FIGURA 7 - Viabilidade das larvas de <i>Artemias salina</i> em função da concentração da fração hidroalcoólica - EtOH:H ₂ O de <i>Sida santaremnensis</i> | 37 |
| FIGURA 8 - Viabilidade das larvas de <i>Artemias salina</i> em função da concentração da fração hexânica – (Hex) de <i>Sida santaremnensis</i> | 38 |
| FIGURA 9 - Viabilidade das larvas de <i>Artemias salina</i> em função da concentração da fração acetatoetílica - (AcOEt) de <i>Sida santaremnensis</i> | 39 |
| FIGURA 10 - Viabilidade das larvas de <i>Artemias salina</i> em função da concentração do extrato etanólico bruto - EEB de <i>Sida santaremnensis</i> | 40 |

LISTAS DE QUADROS

QUADRO 1 - Triagem fitoquímica das partes aéreas de *Sida santaremnensis* H. Monteiro O sinal (+) indica presença e (-) ausência do constituinte químico..... 25

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - Número de <i>Artemia salina</i> mortas..... | 35 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 18 |
| | 2.1 Objetivo geral..... | 18 |
| | 2.2 Objetivos específicos..... | 18 |
| 3 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 19 |
| | 3.1 Características do uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica..... | 19 |
| | 3.2 Perfil toxicológico das plantas medicinais..... | 20 |
| | 3.3 Considerações sobre o ensaio com <i>Artemia salina</i> | 22 |
| | 3.4 Considerações gerais sobre a família <i>Malvaceae</i> | 22 |
| | 3.5 Considerações sobre o gênero <i>Sida</i> | 23 |
| | 3.6 Considerações sobre a espécie <i>Sida santaremnensis</i> | 23 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODO..... | 26 |
| | 4.1 Local da pesquisa..... | 26 |
| | 4.2 <i>Artemia salina</i> Leach..... | 26 |
| | 4.3 Investigação da toxicidade com <i>Artemia salina</i> | 27 |
| | 4.4 Obtenção dos extratos e frações..... | 27 |
| | 4.5 Vidraria e acessórios..... | 27 |
| | 4.6 Aparato..... | 28 |
| | 4.6.1 Incubadora..... | 28 |
| | 4.7 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> | 29 |
| | 4.8 Preparação do extrato etanólico bruto e frações..... | 30 |
| | 4.8.1 Cálculo para determinar a concentração da solução mãe..... | 30 |
| | 4.8.2 Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 60 µL da solução mãe..... | 30 |
| | 4.8.3 Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 120 µL da solução mãe..... | 31 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.8.4 | Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 240 µL da solução mãe..... | 31 |
| 4.8.5 | Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 480 µL da solução mãe..... | 32 |
| 4.8.6 | Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 960 µL da solução mãe..... | 32 |
| 4.8.7 | Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 1920 µL da solução mãe..... | 32 |
| 4.8.8 | Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 3840 µL da solução mãe..... | 33 |
| 4.9 | Padronização dos valores de CL₅₀..... | 33 |
| 4.9.1 | Grupo controle | 33 |
| 5 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 34 |
| 6 | RESULTADOS..... | 35 |
| 6.1 | Resultado para o número de larvas de <i>Artemia salina</i> mortas..... | 35 |
| 6.2 | Resultado com a fração diclorometânica – (CH ₂ Cl ₂)..... | 36 |
| 6.3 | Resultado com a fração hidroalcoólica – (EtOH:H ₂ O)..... | 37 |
| 6.4 | Resultado com a fração hexânica – (Hex)..... | 38 |
| 6.5 | Resultado com a fração acetatoetílica – (AcOEt)..... | 39 |
| 6.6 | Resultado com o e extra etanólico bruto – (EEB)..... | 40 |
| 7 | DISCUSSÃO..... | 41 |
| 8 | CONCLUSÃO..... | 44 |
| | REFERÊNCIAS..... | 45 |

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as plantas são utilizadas como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem o homem, de modo a aumentar suas chances de sobrevivência através da melhoria da saúde (CARVALHO et al., 2010).

Na antiguidade, os recursos terapêuticos eram constituídos basicamente por plantas medicinais. Entretanto, no século XIX, a química experimental permitiu a síntese laboratorial de novas substâncias orgânicas, que desencadeou a produção acelerada de novos medicamentos. À medida que derivados mais puros e concentrados de plantas se tornavam disponíveis, priorizavam-se os fármacos sintéticos, passando-se a desconsiderar o papel importante dos extratos e substâncias de origem vegetal (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2005). A planta denominada papoula (*Papaver somniferum* L.) é um exemplo disto; dela foi isolada em 1806 a morfina, utilizada até hoje nos tratamentos da dor, e tem papel importante para os pacientes terminais diagnosticados com vários tipos de câncer, por amenizar as dores intensas peculiares a estas enfermidades (RODRIGUES et al., 2010).

Apesar da grande evolução da medicina, a partir da segunda metade do século XIX, a população carente não possuía acesso aos centros de atendimentos hospitalares, exames e medicamentos. Este motivo, associado à fácil obtenção e grande tradição das plantas medicinais, contribuiu para seu uso nos países em desenvolvimento (CORDELL, 1995; FRANÇA et al., 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2005).

No Brasil, 20% da população consomem 63% dos medicamentos alopáticos, o restante encontra nos produtos naturais, especialmente nas plantas, uma fonte alternativa de medicação (FOGLIO et al., 2006). Plantas bioativas contêm um ou mais de um princípio ativo que lhe confere atividade terapêutica. Caso os princípios ativos não sejam conhecidos e, ainda assim, a planta apresente atividade medicinal satisfatória, ela pode ser utilizada desde que não apresente efeito tóxico (LORENZI; MATOS, 2011).

O conceito errôneo de que as plantas são medicamentos naturais e, portanto, livre de riscos e efeitos colaterais deve ser reavaliado. Assim como as plantas podem representar medicamentos poderosos e eficazes, o risco de intoxicação causado pelo uso indevido deve ser sempre levado em consideração (LORENZI; MATOS, 2011). Diversas espécies de plantas bioativas de conhecido uso popular apresentam propriedades tóxicas, e deve-se ter cuidado não só na identificação correta das espécies no ato da aquisição, como também nas dosagens, para evitar riscos à saúde (AZEVEDO; MOURA, 2010).

A toxicidade de plantas medicinais é um sério problema de saúde pública. As reações adversas, possíveis adulterações e toxicidade, ação sinérgica e interação medicamentosa ocorrem comumente, pois pesquisas para a avaliação do uso seguro são incipientes, assim como, o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2005).

Diversas pesquisas sobre a utilização de plantas em tratamentos terapêuticos têm sido realizadas. Entretanto, ainda há muito a se conhecer sobre o uso terapêutico, eficácia e segurança comprovada dos produtos derivados de plantas (USTULIN, 2009).

A fim de estabelecer a toxicidade de novos produtos naturais, vários ensaios podem ser utilizados, como o ensaio de letalidade com o micro crustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (SILVA et al., 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial toxicológico do extrato etanólico bruto (EEB) e frações obtidas do particionamento de *Sida santaremnensis* utilizando o bioensaio com *Artemia salina* Leach.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade do extrato etanólico bruto (EEB) e das frações hexânica (Hex), diclorometânica (CH_2Cl_2), acetatoetílica (AcOEt) e hidroalcoólica (EtOH:H₂O) da *Sida santaremnensis*, visando à utilização mais segura em estudos farmacológicos posteriores;
- Determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) do extrato e frações citadas de *Sida santaremnensis* como parâmetro de toxicidade.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Características do uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica

Se a população dos países mais pobres utiliza as plantas medicinais por tradição e ausência de alternativas econômicas viáveis, nos países mais desenvolvidos observa-se um maior uso de fitomedicamentos influenciado pelos modismos de consumo de produtos naturais. Este modismo favoreceu a difusão das promessas de cura através das plantas medicinais para males como a impotência, a ansiedade e a obesidade, algumas vezes em um único extrato. O conceito mais perigoso surgido por esta época foi o de que as plantas medicinais não representam quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e terem sido testadas através de séculos de utilização pela população de todo o mundo (VEIGA JR et al.; 2005). Para população em geral, as terapias alternativas são as principais formas de tratamento, e as plantas medicinais, os principais medicamentos (AGRA et al.; 2007; BIAVATTI et al.; 2007).

No entanto, é comum observar que ainda perdura o mito de que “o que é natural, não faz mal”, ou mesmo “se não fizer bem, mal não faz”, São muitas as espécies medicinais que apresentam toxidez, a depender do preparo e uso. (BOCHNER et al., 2012).

A atenção dirigida pelas autoridades e administrações de saúde para o uso de plantas medicinais aumentou consideravelmente nos últimos anos, por diferentes razões e em diferentes setores. Incentivo em investimentos públicos em plantas medicinais tem sido feito pela OMS desde 1978, observando-se crescente aceitação da fitoterapia por profissionais de saúde da atenção básica assim como a observação do aumento de seu uso pela população (HOMAR, 2005). Nos países em desenvolvimento, isto resultou principalmente na decisão de levar mais a sério a medicina tradicional e de explorar a possibilidade de utilizá-la em cuidados primários de saúde. Em outros países as autoridades de saúde foram obrigadas a adotar medidas impostas pelo interesse do público no uso de plantas medicinais (GUIMARÃES et al., 2006; CARVALHO et al., 2008).

Atualmente, com a publicação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a ANVISA publicou duas Consultas Públicas (CP), ambas em 12 de

junho de 2009, com o objetivo de fazer a notificação de plantas medicinais. A CP nº 35 estabelece as regras para notificação e quais espécies podem ser notificadas, enquanto a CP nº 36 delinea os procedimentos e as práticas que devem ser aplicadas para assegurar que as instalações, métodos, processos, e sistemas de controle usados para a fabricação de droga vegetal notificada sejam adequados, de modo a garantir qualidade e segurança.

No Brasil, diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais e implantando a fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS). Para que essa inclusão ocorra é essencial que os profissionais da área de saúde conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro, de acordo com os costumes, tradições e condição sócio-econômica da população. (SILVA et al., 2006).

Poucos são os incentivos no Brasil para as pesquisas em avaliação de segurança desses produtos, assim como é grande a dificuldade em se estabelecer a identificação de reações adversas relacionadas ao uso dos mesmos, uma vez que raramente propõe-se correlação direta entre o uso desses produtos, considerados naturais, e o desenvolvimento de algum sintoma (BALBINO e DIAS,; 2010),

3.2 Perfil toxicológico das plantas medicinais

Apesar da quantidade de plantas existentes no planeta, a maioria é desconhecida do ponto de vista científico, visto que apenas 5% foram estudadas fitoquimicamente, e uma percentagem ainda menor foi avaliada sob os aspectos biológicos, incluindo o potencial farmacológico e toxicológico. Desta forma, este é um fator de incentivo ao estudo das plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2005).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com

freqüência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. (LÓPEZ, 2006).

O ciclo vital das plantas faz com que, em diferentes épocas do ano, certos compostos estejam presentes em maior ou menor quantidade. Também diferentes partes da planta possuem diferentes constituintes ou diferentes percentagens do mesmo constituinte, dependendo da sua função. (CHUN-E et al.; 2010).

De acordo com a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como a dose administrada ou absorvida, tempo e freqüência de exposição (dose única ou múltipla) e via pela qual é administrada. A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar algum desequilíbrio, um dano grave ou morte (GRAFF, 2006).

Os efeitos prejudiciais de plantas medicinais no organismo, conhecidos como efeitos tóxicos, são objetos de estudo da Farmacologia e Toxicologia, qualquer que seja a substância química causadora. A Toxicologia trabalha dentro de um princípio que consiste em conhecer os riscos da exposição humana às mais diversas substâncias químicas para estabelecer condições seguras de exposição a estes agentes (GRAFF, 2006; MARIZ, 2007).

Os estudos de toxicidade aguda buscam conhecer a concentração ou dose letal mediana (CL_{50} ou DL_{50} , respectivamente), ou seja, dose ou concentração capaz de causar mortalidade em 50% dos organismos em estudo. Entretanto, este parâmetro vem sofrendo várias críticas por alguns fatores, por exemplo, o alto número de animais usados e pelo fato do evento morte ser o pior de todos os efeitos tóxicos (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Quais extratos são realmente ativos, como e quando podem ser prescritos e como devem ser preparados são questões que misturam o conhecimento popular ao científico e que devem ser respondidas através das comprovações científicas e da ampliação dos estudos das plantas brasileiras, principalmente nas áreas de fitoquímica e etnofarmacologia (MACIEL et al., 2002).

A utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contraindicações ou uso concomitante de outros medicamentos (CORDEIRO et al., 2005; AMORIM et al., 2007).

3.3 Considerações sobre o ensaio com *Artemia salina*

O primeiro trabalho utilizando o bioensaio com *Artemia salina* foi publicado em 1956, e depois disso, numerosos artigos têm sido relatados na literatura em estudos ambientais, o uso de produtos e toxinas naturais, incluindo extratos de plantas. (ALMEIDA-CORTEZ et al., 2004; NUNES et al., 2009).

O ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina* é utilizado como método alternativo para a determinação da toxicidade, pois demonstra a sensibilidade da *A. salina* a substâncias tóxicas (UTYAMA et al., 2007). Os testes de toxicidade são necessários para avaliar a poluição aquática, uma vez os testes físico-químicos não são eficazes para detectar os efeitos deletérios causados à biota, bem como não detectam várias classes de compostos químicos poluentes (BARBIERI 2004).

Devido a sua ampla distribuição geográfica e resistência ambiental, a *Artemia salina* é utilizada para inúmeros estudos de ecotoxicidade e na avaliação de produtos como pesticidas, derivados de petroquímicos e dispersantes, metais pesados, derivados carcinogênicos e metabólitos de microorganismos desde a década de 50 (BEVILACQUA et al., 2008).

A principal razão desse crustáceo de água salgada ser amplamente utilizado para testes de toxicidade de extratos de plantas é devido à disponibilidade comercial de ovos (cistos). As larvas e cistos são usados em todo o mundo na aquicultura e em aquariologia como alimento vivo para peixes juvenis. Os ovos de *Artemia salina* podem permanecer viáveis por muitos anos e são, portanto, uma fonte biológica adequada para bioensaios rápidos, simples e baratos. Um inconveniente deste bioensaio, no entanto, é que o meio salino diminui a solubilidade e biodisponibilidade de algumas substâncias, limitando, assim, a detecção de eventuais constituintes bioativos da planta (MAYORGA, et al., 2010).

3.4 Considerações gerais sobre a família *Malvaceae*

A família Malvaceae é constituída por 243 gêneros e 4225 espécies (STEVENS, 2003), que se apresentam como ervas, subarbustos, arbustos e raramente árvores (BARACHO, 1998).

Investigações fitoquímicas de espécies de Malvaceae descreveram o isolamento de ácidos graxos, óleos essenciais, sesquiterpenóides, triterpenos, compostos fenólicos, flavonoides, entre muitos outros compostos (SILVA et al., 2006; COSTA et al., 2007; SILVA et al., 2010).

3.5 Considerações sobre o gênero *Sida*

O gênero *Sida* apresenta ampla distribuição neotropical com várias espécies bem representadas nas Américas. No Brasil, este gênero possui cerca de 35 gêneros e 400 espécies, com exemplares nas regiões Nordeste e Sul e, em menor proporção, nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste (BARROSO et al., 1991; SILVA et al., 2006).

Estudos etnofarmacológicos relatam o uso de espécies do gênero *Sida* para uma infinidade de enfermidades, dentre elas a dificuldade no trabalho de parto, devido à propriedade abortiva (KAMATENESIS-MUGISHA; ORYEM-ORIGA, 2007). Possui ainda propriedades tônicas (HANSEN et al.; 1995), estomáquica (SCARPA, 2004), adstringente (SHINWARI et al.; 2000), antiinflamatória hipoglicêmica e diurética (MEDEIROS et al.; 2006).

Sida é um gênero botânico inserido na família Malvaceae, pertencente à ordem Malvales (STEVENS, 2003), que se apresentam como ervas, subarbustos, arbustos e raramente árvores (BARACHO, 1998). O gênero *Sida* apresenta ampla distribuição neotropical com várias espécies bem representadas nas Américas. No Brasil, este gênero possui muitos representantes nas regiões Nordeste e Sul e, em menor proporção, nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste (BARACHO, 1998).

Investigações fitoquímicas com espécies do gênero *Sida* mostraram a presença de alcaloides (MEDEIROS et al., 2006 apud MOURA, 2010), diterpenos, compostos nitrogenados, flavonoides, esteroides, cumarinas e ácidos fenólicos (SILVA et al., 2006).

3.6 Considerações sobre a espécie *Sida santaremnensis*

Sida santaremnensis (figura 01) é encontrada na região Nordeste do Brasil, sendo conhecida popularmente como guanxuma ou vassourinha. Segundo estudos realizados com o extrato etanólico bruto (EEB) de *Sida santaremnensis*, este

apresentou atividade vasorelaxante (ARCANJO et al., 2011), antiulcerogênica (OLIVEIRA et al., 2008), antinociceptiva (MENDES et al., 2008) e antiedematogênica (MOURA, 2010).

Figura 1 – *Sida santaremnensis* (H. Monteiro). Foto: Daniel Dias Rufino Arcanjo, abril de 2007, no Parque Piauí, Teresina/PI.



Uma prospecção fitoquímica realizada com o extrato etanólico bruto e as frações hexânica, diclorometânica, acetatoetílica e hidroalcoólica de *Sida santaremnensis* mostrou a presença de classes importantes de metabólitos secundários, conforme pode-se observar no (quadro 1). Os resultados foram considerados positivos pela formação de turvação ou precipitados e surgimento de coloração ou espuma, sendo classificados em fraco positivo (+), moderado positivo (++) e forte positivo (+++), pela intensificação destes e negativo (-) pela ausência dos mesmos. (MELO, 2013).

Baseado nas atividades farmacológicas evidenciadas nesta espécie é de grande importância o estudo fitoquímico de *Sida santaremnensis*, uma vez que na literatura não há relatos sobre isolamento de seus constituintes químicos, de modo a tornar possível a realização de estudos farmacológicos mais detalhados com seus constituintes isolados.

Quadro 1 - Triagem fitoquímica das partes aéreas de *Sida santaremnensis* H. Monteiro O sinal (+) indica presença e (-) ausência do constituinte químico (MELO, 2013).

| PESQUISA | | RESULTADO | | | | |
|-----------------------|--------------------|-----------|----------|--------------------------------------|------------|----------------------------|
| METABÓLITO SECUNDÁRIO | TESTE | EEB | FASE HEX | FASE CH ₂ Cl ₂ | FASE ACOET | FASE ETOH:H ₂ O |
| Esteroides | Lieberman-Burchard | ++ | ++ | ++ | - | - |
| Triterpenos | Lieberman-Burchard | + | + | + | ++ | - |
| Flavonoides | Shinoda | + | - | + | ++ | +++ |
| Taninos | Gelatina | + | - | - | ++ | +++ |
| Alcaloides | Dragendorff | ++ | - | ++ | + | ++ |
| Saponinas | Índice de Espuma | + | - | - | ++ | ++ |

O extrato etanólico de *Sida santaremnensis* (SSan-EtOH), apresentou atividade anti-edematogênica evidenciada nos modelos de edema de orelha e de pata. (MOURA, 2010).

O estudo fitoquímico da fração acetato de etila de *Sida santaremnensis* levou ao isolamento e caracterização estrutural de um flavonoide glicosilado: o canferol 3-O-β-D-glicopiranosose (6''-1''') α-L-ramnopiranosídeo, isolado pela primeira vez no gênero *Sida*. (MELO, 2013).

Algumas espécies do gênero *Sida* possuem atividade anti-hipertensiva, contudo, sobre a espécie *Sida santaremnensis* não existem estudos sobre seus efeitos no sistema cardiovascular. (ARCANJO, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité.

4.2 *Artemia salina* Leach

Os cistos de *Artemia salina* foram provenientes do Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Esses foram armazenados sob resfriamento a 5 °C até a execução dos experimentos. As larvas de *Artemia salina* foram utilizadas na forma de náuplio para determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade toxicológica (LOPES et al., 2002).

A *Artemia salina* é um micro crustáceo da ordem Anostraca (Figura 02) de fácil cultivo e estudo, encontrado em águas salinas e salobras de todo o mundo. Seus cistos são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado desidratado (MEYER et al., 1982).

Figura 2 – *Artemia salina* Leach



4.3 Investigação da toxicidade com *Artemia salina*

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida (MEYER et al., 1982; CASTELLO-BRANCO, 2009). O bioensaio utilizando suas larvas na forma de náuplios (Brine Shrimp Test – BST) caracteriza-se por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas, além de requerer apenas pequena quantidade da amostra. Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90. Adicionalmente, o bioensaio com *A. salina* tem sido amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa para determinação da toxicidade de extratos, frações e compostos isolados de plantas, uma vez que ele se apresenta como um método alternativo para a determinação da toxicidade considerando o alto custo e o sofrimento causado aos animais experimentais durante testes *in vivo* utilizando roedores (PARRA et al., 2001).

O ensaio com *Artemia salina* é utilizado rotineiramente em laboratórios de todo o mundo para investigação de extratos de plantas com propriedade medicinal, por exemplo, antimicrobianos ou antiparasitários, bem como para fracionamento biomonitorado de constituintes bioativos de plantas extratos e para a detecção de efeitos citotóxicos (MOSHI et al; 2004.; OLIVA et al., 2007).

4.4 Obtenção dos extratos e frações

Os extratos e frações de *Sida santaremnensis* foram preparados e cordialmente cedidos pela Profa. Dra. Danielly Albuquerque da Costa do Laboratório de Farmacognosia da Unidade Acadêmica de Saúde - CES/UFCG.

4.5 Vidraria e acessórios

- ❖ Balão volumétrico de 1 L;
- ❖ Balões volumétricos de 5 mL;
- ❖ Bastão de vidro;
- ❖ Béquers de 250 mL;
- ❖ Espátulas;

- ❖ Funil;
- ❖ Galeria para tubos de ensaio;
- ❖ Incubadora com divisória contendo furos;
- ❖ Luminária com lâmpada de 40W;
- ❖ Pipetas de Pasteur com pêra;
- ❖ Pipetas volumétricas (2 - 1000 μL);
- ❖ Provetas 10 mL;
- ❖ Tubos de ensaio de 10 mL;
- ❖ Vidro de relógio;

4.6 Aparato

4.6.1 Incubadora

A incubadora para eclosão dos cistos de *Artemia salina* consistiu em um recipiente retangular de vidro com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura e distribuídos uniformemente (Figura 03).

Figura 3 – Incubadora com divisória contendo furos.



4.7 Bioensaio com *Artemia salina*

O bioensaio com *A. salina* foi baseado na técnica descrita por Meyer e colaboradores (1982). Para realização dos ensaios com *Artemia salina*, os cistos foram mantidos em uma incubadora, onde foi adicionada água salina artificial preparada pela solubilização de 38 g de sal marinho (Marinex®) em 1 litro de água destilada. O recipiente permaneceu sob iluminação através de uma lâmpada incandescente (40 W) e foram incubados durante 24 horas (22 – 29 °C) em um dos lados do recipiente. A parte do sistema contendo os cistos foi recoberta com papel alumínio, para que as larvas, após a eclosão dos cistos, fossem atraídas pela luz do outro lado do sistema, forçando-as a atravessar a divisória, e assim sendo, então coletadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur (Figuras 04 e 05).

Figura 4 – Parte recoberta do sistema contendo os cistos.



Figura 5 – Incubadora sob exposição à luz.



4.8 Preparação do extrato etanólico bruto e frações

O extrato etanólico bruto e as frações avaliados foram solubilizados em água salina artificial a fim de se obter uma solução mãe de 4 mg/mL. Para a solubilização da fração acetatoetílica e hexânica foram utilizados um volume de 20 µL de cremofor (solvente). A partir desta, foram efetuadas diluições para concentrações no intervalo de 60 – 1738 µg/mL adicionando-se 5 mL de soluções salina em cada tubo de ensaio, nos quais foram adicionados 10 náuplios de *Artemia salina*. Cada concentração foi testada em triplicata e repetida em três experimentos. O conjunto permaneceu sob incubação em contato com as soluções testes sob luz artificial durante 24 h e em seguida foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas, para posterior determinação da CL_{50} (concentração que produziu 50 % de letalidade).

4.8.1 Cálculo para determinar a concentração da solução mãe

Massa do extrato/frações = 20 mg

Volume de solução salina (diluyente) = 5 mL

Aplicando-se a relação $C = m.V^{-1}$, onde C representa a concentração, m a massa do extrato ou frações e V o volume de solução salina, temos:

$$C = 20 \text{ mg} \cdot 5 \text{ mL}^{-1}$$

$$C = 4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\therefore C = 4.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

4.8.2 Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 60 µL da solução mãe

Aplicando-se $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, temos:

$$C_1 = 4.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$V_1 = 0,06 \text{ mL}$$

$$C_2 = ?$$

$$V_2 = 5,0 \text{ mL} + 0,060 \text{ mL}$$

Portanto,

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 \cdot V_2^{-1}$$

$$C_2 = 4.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot 0,06 \text{ mL} / 5,060 \text{ mL}$$

$$C_2 = 47 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

4.8.3 Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 120 μL da solução mãe

$$C_1 = 4.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$V_1 = 0,12 \text{ mL}$$

$$C_2 = ?$$

$$V_2 = 5,0 \text{ mL} + 0,12 \text{ mL}$$

Portanto,

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 \cdot V_2^{-1}$$

$$C_2 = 4.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot 0,12 \text{ mL} / 5,120 \text{ mL}$$

$$C_2 = 94 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

4.8.4 Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 240 μL da solução mãe

$$C_1 = 4.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$V_1 = 0,24 \text{ mL}$$

$$C_2 = ?$$

$$V_2 = 5,0 \text{ mL} + 0,24 \text{ mL}$$

Portanto,

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 \cdot V_2^{-1}$$

$$C_2 = 4.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot 0,24 \text{ mL} / 5,240 \text{ mL}$$

$$C_2 = 183 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

4.8.5 Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 480 μL da solução mãe

$$C_1 = 4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$V_1 = 0,48 \text{ mL}$$

$$C_2 = ?$$

$$V_2 = 5,0 \text{ mL} + 0,48 \text{ mL}$$

Portanto,

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 \cdot V_2^{-1}$$

$$C_2 = 4.000 \mu\text{g.mL}^{-1} \cdot 0,48 \text{ mL} / 5,480 \text{ mL}$$

$$C_2 = 350 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

4.8.6 Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 960 μL da solução mãe

$$C_1 = 4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$V_1 = 0,96 \text{ mL}$$

$$C_2 = ?$$

$$V_2 = 5,0 \text{ mL} + 0,96 \text{ mL}$$

Portanto,

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 \cdot V_2^{-1}$$

$$C_2 = 4.000 \mu\text{g.mL}^{-1} \cdot 0,96 \text{ mL} / 5,960 \text{ mL}$$

$$C_2 = 644 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

4.8.7 Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 1920 μL da solução mãe

$$C_1 = 4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$V_1 = 1,920 \text{ mL}$$

$$C_2 = ?$$

$$V_2 = 5,0 \text{ mL} + 1,920 \text{ mL}$$

Portanto,

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 \cdot V_2^{-1}$$

$$C_2 = 4.000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot 1,920 \text{ mL} / 6,920 \text{ mL}$$

$$C_2 = 1110 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

4.8.8 Cálculo para a determinação da concentração teste a partir da diluição de 3840 μL da solução mãe

$$C_1 = 4.000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$V_1 = 3,840 \text{ mL}$$

$$C_2 = ?$$

$$V_2 = 5,0 \text{ mL} + 3,840 \text{ mL}$$

Portanto,

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 \cdot V_2^{-1}$$

$$C_2 = 4.000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot 3,840 \text{ mL} / 8,840 \text{ mL}$$

$$C_2 = 1738 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

4.9 Padronização dos valores de CL_{50}

Foi adotado um parâmetro para os valores de Cl_{50} , onde, foi considerada de baixa toxicidade, quando a dose letal Cl_{50} foi superior a $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; moderada para Cl_{50} entre 100 a $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ e muito tóxico quando a Cl_{50} foi inferior $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. (MCLAUGHLIN et al.; 1993). Para valores de CL_{50} acima de $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, estas foram consideradas atóxicas (MEYER et al., 1982).

4.9.1 Grupo controle

Para cada ensaio foi realizado um grupo controle contendo a solução salina e os dez náuplios de *A. salina*. O grupo controle para a fração acetatoetílica e hexânica foi preparado contendo o volume de $20 \mu\text{L}$ de Cremofor (solvente).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de CL_{50} foram calculados através da expressão dos resultados como uma percentagem dos controlos, e determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.04.

6 RESULTADOS

6.1 Resultado para o número de larvas de *Artemias salina* mortas

Com a obtenção dos dados, pode-se contabilizar o número de larvas mortas de *Artemia salina* de acordo com o aumento gradual das concentrações, das frações diclorometânica (CH_2Cl_2), hidroalcoólica (EtOH:H₂O) hexânica (Hex), acetatoetílica (AcOEt) e do extrato etanólico bruto (EBE), como pode ser visto na tabela 1, logo abaixo, num total de 90 *Artemias salina* para cada fração e/ou extrato analisado.

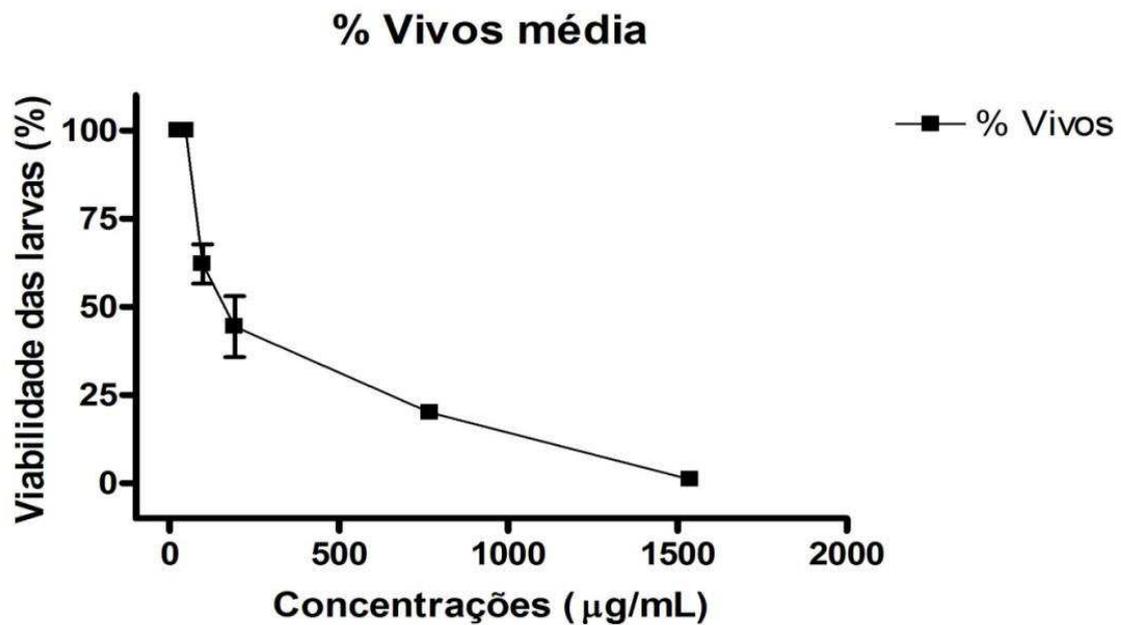
Tabela 1: Número de *Artemia salina* mortas.

| EXTRATOS E FRAÇÕES | 47 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ | 94 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ | 183 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ | 350 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ | 644 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ | 1110 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ | 1738 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| (CH_2Cl_2) | 0 | 34 | 48 | 50 | 78 | 90 | 90 |
| (EtOH:H ₂ O) | 0 | 1 | 19 | 37 | 68 | 90 | 90 |
| (Hex) | 0 | 6 | 21 | 38 | 53 | 62 | 63 |
| (AcOEt) | 0 | 27 | 57 | 63 | 65 | 67 | 66 |
| (EEB) | 49 | 70 | 85 | 90 | 90 | 90 | 90 |

Com base nos dos dados coletados, pode-se determinar graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%, a CL_{50} para *Artemia salina* frente às frações, diclorometânica (CH_2Cl_2) (figura 1), hidroalcoólica (EtOH:H₂O) (figura 2), hexânica (Hex) (figura 3), acetatoetílica (AcOEt) (figura 4) e ao extrato etanólico bruto (EBE) (figura 5), logo a baixo.

6.2 Resultado com a fração diclorometânica – (CH₂Cl₂)

Figura 6: Viabilidade das larvas de *Artemias salina* em função da concentração da fração diclorometânica- CH₂Cl₂ de *Sida santaremnensis*.



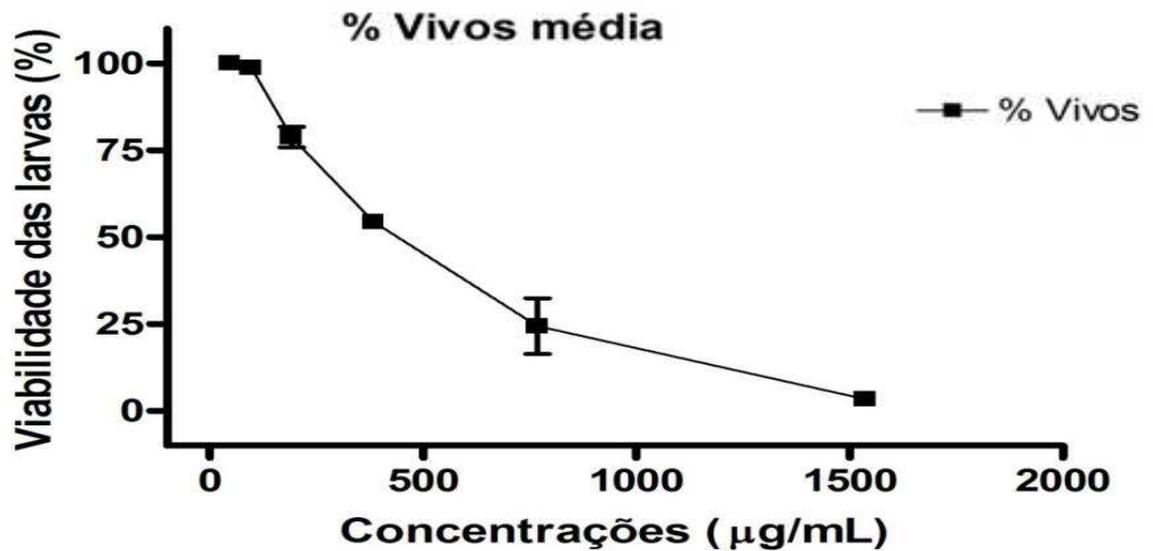
$$CL_{50} = 123,7 (77,87 - 196,4) \mu\text{g/mL}$$

De acordo com a figura 6, é possível observar que, com o aumento da concentração da fração diclorometânica, houve o aumento da mortalidade das

Artemias salina. Pode-se determinar graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%, a CL₅₀ com o valor de 123,7, com intervalo de confiança entre 77,87 a 196,4 µg.mL⁻¹.

6.3 Resultado com a fração hidroalcoólica – (EtOH:H₂O)

Figura 7: Viabilidade das larvas de *Artemias salina* em função da concentração da fração hidroalcoólica - EtOH:H₂O de *Sida santaremnensis*.

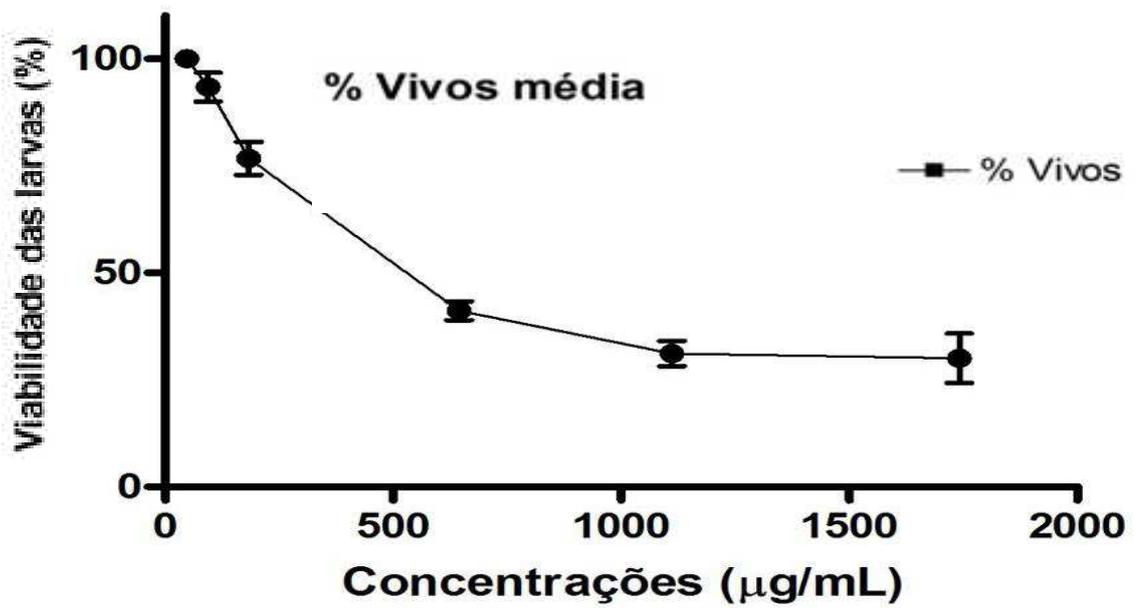


$$CL_{50} = 566,0 (509,4 - 629,0) \mu\text{g/mL}$$

Na figura 7, observa-se também uma mortalidade das larvas de *Artemia salina* frente a fração hidroalcoólica, onde, pode-se determinar a CL_{50} com o valor de 566,0, com intervalo de confiança entre 59,4 a 629,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

6.4 Resultado com a fração hexânica – (Hex)

Figura 8: Viabilidade das larvas de *Artemias salina* em função da concentração da fração hexânica – (Hex) de *Sida santaremnensis*.

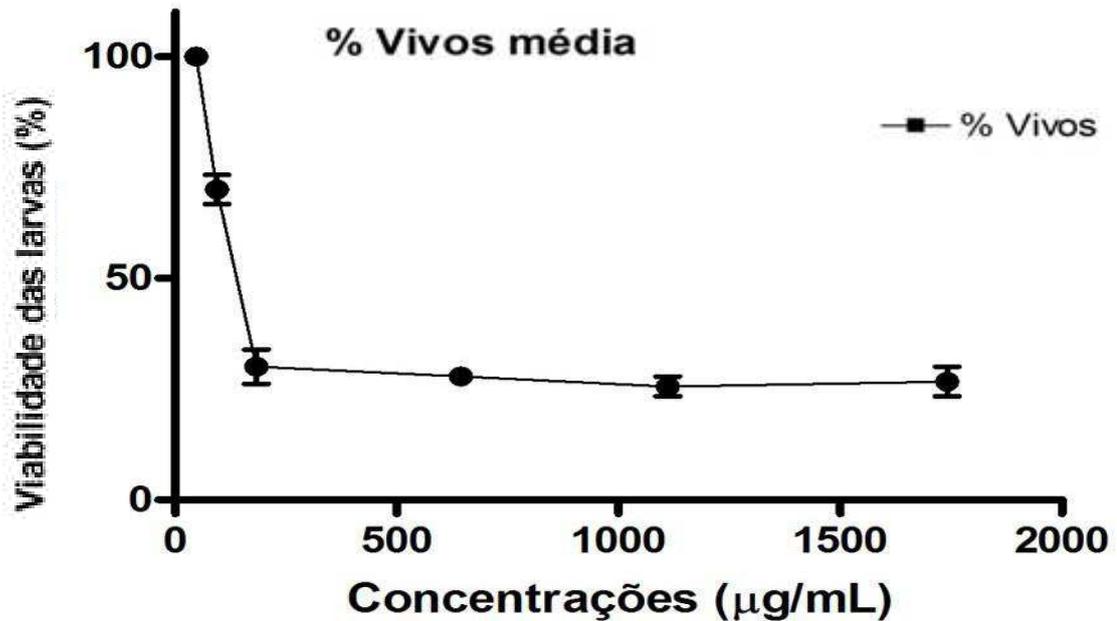


$$CL_{50} = 265,2 (188,6 - 372,9) \mu\text{g/mL}$$

Na figura 8, constata-se a mortalidade das larvas de *Artemia salina* frente a fração hexânica. Através da análise estatística, pode-se determinar a CL_{50} com o valor de 256,2, com intervalo de confiança entre 188,6 a 372,9, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

6.5 Resultado com a fração acetatoetílica – (AcOEt)

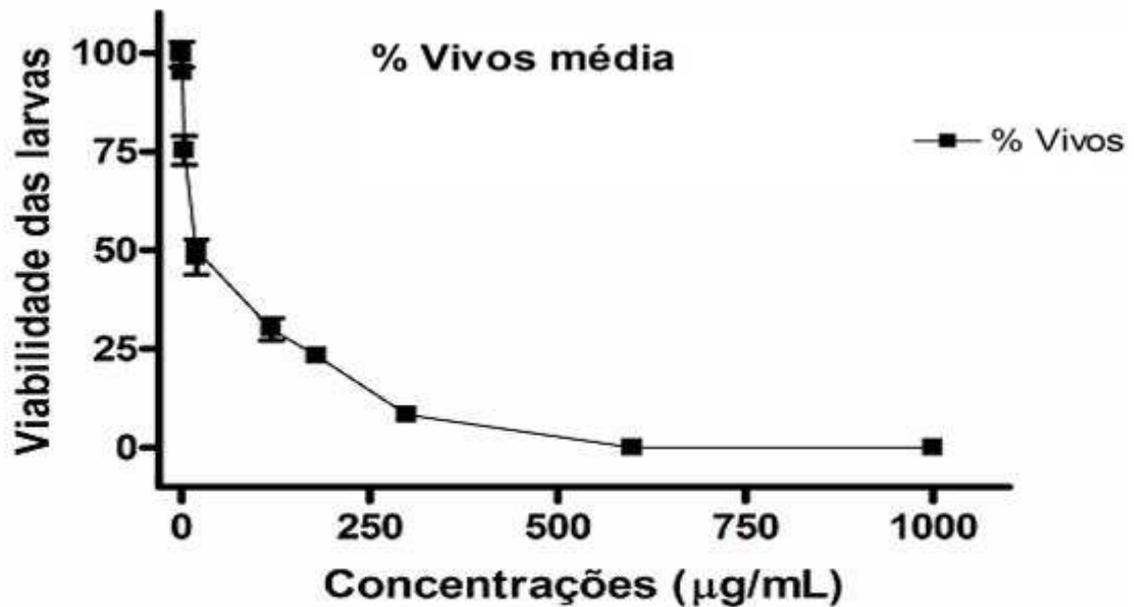
Figura 9: Viabilidade das larvas de *Artemias salina* em função da concentração da fração acetatoetílica - (AcOEt) de *Sida santaremnensis*.



Na figura 9, pode-se notar o perfil da mortalidade das larvas de *Artemia salina* frente a fração acetatoetílica, bem como, pode-se determinar a CL_{50} com o valor de 100,0, com intervalo de confiança entre 92,98 a 107,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

6.6 Resultado com o extrato etanólico bruto – (EEB)

Figura 10: Viabilidade das larvas de *Artemias salina* em função da concentração do extrato etanólico bruto - EEB de *Sida santaremnensis*.



$$CL_{50} = 24,44 (20,00 - 28,88) \mu\text{g/mL}$$

Na figura 10, verifica-se a mortalidade das larvas de *Artemia salina* frente ao extrato etanólico bruto, bem como, pode-se determinar estatisticamente a CL_{50} com o valor de 24,44 com intervalo de confiança entre 20,00 a 28,88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

7 DISCUSSÃO

O conhecimento médico baseado nas plantas foi crescendo ao redor do mundo, onde cada povo desenvolvia seu campo de conhecimentos e tornava a fitoterapia cada vez mais um sistema poderoso de assistência, até que no século XVIII esta passou a ser incorporada no mundo das pesquisas, a fim de unir o conhecimento tradicional ao científico e aprimorar esta prática (SINGH; ERNST, 2013).

Esta foi a primeira vez que frações e extrato, obtidos da espécie *Sida santaremnensis* foi submetido ao ensaio de toxicidade aguda utilizando larvas de *Artemia salina*, bem como a determinação da CL_{50} de cada uma delas.

De acordo com a tabela 1, a mortalidade das *A. salina* seguiu uma proporcionalidade de acordo com o aumento das concentrações das frações e extrato etanólico bruto, onde, pode-se observar que as frações diclorometânica, hidroalcoólica e extrato etanólico bruto, atingiram valores de mortalidade de 100% nas cocentrações mais altas, o mesmo não foi observado para as frações hexânica e acetatoetílica, onde, ambas não atingiram 100% de mortalidade mesmo nas mais altas concentrações.

A fração diclorometânica de *S. santaremnensis* apresentou uma toxicidade moderada, com uma $CL_{50} = 123,7 (77,87 - 196,4) \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Figura 6), de acordo com McLaughlin et al.; (1993), que pouco difere do extrato diclorometânico da espécie *Sida acuta* com uma $CL_{50} = 99,4 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. (ORECH et al.; 2005).

A fração hidroalcoólica de *S. santaremnensis* apresentou uma baixa toxicidade, com uma $CL_{50} = 566,0 (509,4 - 629,0) \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Figura 7), semelhante ao estudo com extratos aquosos de 118 plantas medicinais indianas selecionados para o bioensaio com *Artemia salina*, dentre elas, a espécie *Sida cordifolia*, que apresentou baixa toxicidade com uma CL_{50} de $2.650 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para as larvas de *Artemia salina*. (KRISHNARAJU et al.; 2006). O mesmo, mostrou-se com baixa toxicidade em camundongos, mesmo em doses de 1000 mg/Kg. (FRANCO et al., 2005).

A fração hexânia de *S. Santaremnensis* apresentou um perfil de toxicidade moderada, com uma $CL_{50} = 256,2 (188,6 - 372,9) \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Figura 8), já a fração acetatoetílica de *S. santaremnensis* apresentou maior toxicidade com uma $CL_{50} =$

100,0 (92,98 - 107,6) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figura 9), equivalente a fração acetato de etila de *Sida rhombifolia* L, que apresentou uma $\text{CL}_{50} = 94,11$ (80,96 - 111,73) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, considera por tanto muito tóxica. (BRUGÉS e REZA.; 2007).

O extrato etanólico bruto (EEB) da *S. santaremnensis* apresentou uma $\text{CL}_{50} = 24,44$ (20,00 – 28,88) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figura 10), considerada por tanto, com elevada toxicidade. Diferentemente do extrato bruto de *Sida cordata*, que apresentou uma significativa toxicidade frente ao bioensaio com *Artemia salina*, com uma $\text{CL}_{50} = 263,02$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. (ISLAM et al.; 2014), e semelhante a análise toxicológica do extrato etanólico bruto da espécie *Sida rhombifolia* Linn, que apresentou toxicidade elevada para os náuplios de *Artemia salina*, com uma CL_{50} e CL_{90} de ($\text{CL}_{50} = 40$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $\text{CL}_{90} = 80$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), respectivamente. (RAHMAN et al.; 2011). Extratos etanólico da espécie *Sida rhombifolia* L, apresentou genotoxicidade elevada ($\text{CL}_{50} = 35$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), (BRUGÉS e REZA ,2007). Em contra partida, o extrato etanólico bruto não apresentou toxicidade aguda em camundongos, bem como citotoxicidade em eritrócitos de ratos. (ARCANJO, 2009).

A alta toxicidade do extrato etanólico bruto (EEB) de *S. santaremnensis*, evidência a necessidade de controle sobre preparações por infusão feitas com essa planta, diferentemente da espécie *Sida rhombifolia* L, que seus extratos aquosos foram praticamente não tóxicos ($\text{CL}_{50} > 1000$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), bem como os extratos aquosos das folhas ($\text{CL}_{50} = 900$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), sugerindo que podem ser utilizados com segurança em infusões. (BRUGÉS e REZA ,2007).

Essa característica de toxicidade elevada em extratos brutos pode estar associada a maior quantidade de metabólitos secundários existentes nesses extratos, bem como a interação farmacológica, e a possível ação sinérgica que esses compostos conferem uns aos outros, refletindo assim, uma maior potencialidade tóxica da planta, o que explica o fato de que alguma fração separadamente apresentaram baixa, moderada ou maior toxicidade. Semelhando ao raciocínio de que isoladamente, cada óleo essencial apresenta diversos compostos, e quando dois óleos são combinados, a interação entre as diversas substâncias químicas pode provocar sinergismo, adição ou efeitos antagônicos. (FU et al.; 2007).

As plantas medicinais possuem substâncias químicas, os bioativos que além de apresentar potencial terapêutico podem causar danos à saúde, devido a uma interação não esperada ou mesmo a uma dosagem excessiva. (MENDIETA et al.; 2011).

Deve-se considerar que a variabilidade química sazonal pode afetar o teor de princípios ativos de plantas medicinais cultivadas, sendo por isso um importante fator a ser estudado para o estabelecimento de critérios de qualidade para essas plantas (YARIWAKE et al., 2005).

Existem vários fatores limitantes no uso de produtos naturais na busca de fármacos, quando comparados ao uso de compostos sintéticos (MOREIRA e ALMEIDA, 2008), como, por exemplo, interações entre os componentes da mistura (antagonismo, sinergismo) podem ocorrer, levando a resultados que algumas vezes não são observados quando se testa a substância pura. (YUNES et al.; 2001).

A espécie *Sida santaremnensis* apresentou um perfil tóxico diversificado, e a (s) substância (s) que confere (m) atividade tóxica pode (m) ser associada (s) a frações de polaridade intermediária, que é o caso da fração acetatoetílica que apresentou maior toxicidade entre as frações. Tal perfil não foi observado nas frações hidroalcoólica, proporcionando uma maior margem de segurança em seu uso como matéria prima para novos fitoterápicos.

Mesmo o extrato bruto e a fração acetatoetílica, ambas apresentando características de maior toxicidade, não implica dizer que não possam ser avaliados e utilizados em estudos que busquem sua utilização na produção de novos fármacos, desde que, esses estudos utilizem concentrações dentro de uma margem de segurança, pois a atividade tóxica expressada por eles, também pode ser entendida como ação de compostos bioativos que podem vir a ter valor terapêutico ou para fins de diagnóstico, seja, em compostos isolados ou em baixas concentrações do extrato bruto e/ou fração.

Este trabalho propiciou uma avaliação do perfil tóxico do extrato e frações de *Sida santaremnensis*, o que oferecem de forma preliminar, conhecimentos que podem vir a ser utilizados posteriormente em futuras avaliações e aplicações desta espécie em estudos posteriores.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados e a determinação da CL_{50} , observa-se, portanto que:

- ❖ As frações diclorometânica e hexânica apresentaram toxicidade moderada;
- ❖ A fração hidroalcoólica apresentou baixa toxicidade;
- ❖ A fração acetatoetílica e o extrato etanólico bruto apresentaram maior toxicidade;
- ❖ Pode-se sugerir uma relação direta entre a toxicidade e/ou bioatividade do extrato etanólico bruto e suas frações com suas características de polaridade, onde, o extrato etanólico bruto e a fração acetatoetílica, ambos de caráter hidrofílico, apresentaram maior toxicidade.
- ❖ As frações mais apolares, hexânica e diclorometânica apresentaram menor toxicidade, o que reforça a hipótese de que constituintes com características lipofílicas conferem menor toxicidade em relação aos compostos hidrofílicos.
- ❖ É notória a importância de estudos mais detalhados sobre *Sida santaremnensis*, que avaliem o potencial farmacológico e tóxico, não só de seus extratos ou frações, mas também de compostos isolados, para uma melhor distinção de suas propriedades químicas e biológicas.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 35, de 12 de junho de 2009. Aprova a notificação de drogas vegetais. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12, junho, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 36, de 12 de junho de 2009. Aprova o regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12, junho, 2009.

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. 2007. Synopsis of the plants Known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17: 114-10.

ALMEIDA-CORTEZ, J. S., SHIPLEY, B.; ARNASON, J. T. 2004. Growth and chemical defense in relation to resource availability: tradeoffs or common responses to environmental stress? **Brazilian Journal of Biology**, vol. 64, no. 2, p. 187-194. PMID:15462290.

AMORIM, M. F. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, M. S. T.; PITA, J. C. L. R.; DANTAS, J. G.; RAMALHO, J. A.; XAVIER, A. L.; PALOMARO, T. V.; JÚNIOR, N. L. B. 2007. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17:448-454.

ARCANJO, D. D. R.; OLIVEIRA, N. N. P. M.; FERREIRA-FILHO, E. S.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; BORGES, A. C. R.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, R. C. Vasorelaxant response induced by *Sida santaremnensis* H. Monteiro etanol extract on rat superior mesenteria artery. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 65, p. 14587-14597, 2011.

ARCANJO, D.D. R.; **Avaliação do efeito vasorrelaxante do extrato etanólico das partes aéreas de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (*Malvaceae*) em artéria mesentérica isolada de rato / Daniel Dias Rufino Arcanjo. – Teresina, 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, 2009.**

AZEVEDO, C.D.; MOURA, M.A. **Cultivo de Plantas Mediciniais** – Guia Prático. Niterói: Programa Rio Rural. Manual Técnico. 2010. 20p.

BALBINO, E. E.; DIAS, M.F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.

Curitiba-PR, v. 20, n. 6, p. 992-1000, dez. 2010

BARACHO, G. S. Taxonomia do gênero *Sida* L. seção *Cordifolie Fryxell* (Malvaceae) no Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 1998.

BARBIERI, E. Emprego de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) e *Artemia salina* (Crustacea) para determinar a toxicidade aguda da água de produção de petróleo em Sergipe, Brasil. 2004. **Biologia Geral e Experimental** 5: 26-29.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, A. C. Sistemática de Angiospermas no Brasil 2. **Imprensa universitária**, 1991.

BEVILACQUA, A.H.V.; SUFFREDINI, I.B. & BERNARDI, M.M. 2008. Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), em *Artemia arva* SP: comparação da preparação comercial e do óleo puro. 2008. **Revista Instituto Ciências Saúde** 26: 157-160.

BIAVATTI, M. W.; MARENSI, V.; LEITE, S. N.; REIS, A. 2007. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potencial cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17: 640-653.

BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; ASSIS, M. A.; AVELAR, K. E.S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 2012; 14(3):537-47.

BRUGÉS, K.; REZA, M. T. R. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. **Revista Colombiana de Biotecnología**, vol. IX, núm. 1, julio, 2007, pp. 5-13.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18:314-319.

CARVALHO, M. C. G.; PIRES, R. L.; FLORINDO, W. S.; CAVALCANTI, A. S. S. Evidências para o uso de Indigo naturalis no tratamento da psoríase tipo placa: uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v. 8, n. 3, p. 127-131, 2010.

CASTELLO-BRANCO, A. C. S. **Avaliação da toxicidade crônica pré-clínica de**

Foeniculumvulgaremill. 2009. 136f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

CHUN-E, H.; JIANHE, W.; YUE, JI.; SHILIN, CHEN. (2010) Bioactive components of the roots of *Salvia miltiorrhizae*: Changes related to harvest time and germplasm line. **Industrial Crops and Products**, 32 (3), 313–317.

CORDEIRO, C. H. G; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. 2005. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15:272-278.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1585-1612, 1995.

COSTA, D. A.; SILVA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (*Malvaceae*) and the relaxant activity of kaempferol-3-o- β -d-(6''-E-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. **Química Nova**, v. 30, n. 4, 901-903, 2007.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. Multiciências: **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, v.7, p.10-28, 2006.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, p. 201-208, 2008.

FRANCO, C. I. F.; MORAIS, L. C. S. L.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, R. N.; ANTONIOLLI, A. R. CNS pharmacological effects of the hydroalcoholic extract of *Sida cordifolia* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 3, p. 275-279, 2005.

FU, Y., ZU, Y., CHEN, L., SHI, X., WANG, Z., SUN, S., & EFFERTH, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, 21, 989-994.

GRAFF, S. **Fundamentos de toxicologia clínica**. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. 157p.

GUIMARÃES, J.; MEDEIROS, J. C.; VIEIRA, L. A. 2006. **Programa fitoterápico**

farmácia viva no SUS-Betim, Minas Gerais. Divulgação em Saúde Pública para Debate 36: 41-47.

HANSEN, K.; NYMAN, U.; SMITT, U. ADSERSEN, A.; GUDIENSEN, L.; RAJASEKHARAN, S.; PUSHANGADA, P. In vitro screening of traditional medicines for anti-hypertensive affect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, p, 43-51, 1995.

HOMAR JC 2005. **Medicinas complementarias o alternativas? Un dilema para el sistema público**. Atención Primaria 35: 389-391.

ISLAM, R.; REZA, A.; CHAWDHURY, K. A. A.; UDDIN, J.; Farhana, k. evaluation of in vitro antioxidant activity and cytotoxicity of methanolic extract of Sida cordata Leaves. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**. 2014; 5(2): 196-200.

KAMATENESIS-MUGISHA, M.; ORYEM-ORIGA, H. Medicinal used to induce labour during childbirth in western Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, p. 1-9, 2007.

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D.; VANISREE, M.; TSAY, H.; SUBBARAJU, G. V. Biological screening of medicinal plants collected from eastern ghats of india using artemia salina (Brine Shrimp Test). **International Journal of Applied Science and Engineering**. 2006. 4, 2: 115-125.

LÓPEZ, CAA., 2006. **Considerações gerais sobre plantas medicinais. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, vol. 1, no. 1, p. 19-27.

LOPES, W. B; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Horizonte Científico**, v. 1, 2002. Disponível em: <<http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **As Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas** – 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 544p. 2011.

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

MARIZ, S.R. **Estudo toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L.** 2007. 186f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MAYORGA, P.; PÉREZ, K. R.; CRUZ, S. M.; CÁCERES, A. **Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening.** 2010. 898p.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. 1993. Simple Bench-Top Bioassays (BS & PD) for Discovery of Plant Antitumor Compounds - Review of Recent Progress, p. 112-137. In: Kinghorn, A.D.; Balandrini, m.F. (eds). **Human Medicinal Agents from Plants**, oxford University Press, new York, USA.

MEDEIROS, I. A.; SANTOS, M. R. V.; NASCIMENTO, N. M. S.; DUARTE, J. C. **Cardiovascular effects of *Sida Cordifolia* leaves extract in rats.** Fitoterapia. v. 77, p. 19 - 27, 2006.

MELO, J. F. S.; **Estudo preliminar da fase acetato de etila de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae).** / Josefa Fabiana Silva Melo. – Cuité: CES, 2013. 46 fl. Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2013.

MENDES, R. M. B.; FIGUEIREDO, K. A.; LOPES, L. S.; PEREIRA, S. S.; OLIVEIRA, A. P.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F.R. C. **Estudo do efeito antinocicptivo de *Sida santeremnensis* (Malvaceae).** In: 40° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008, Águas de Lindóia, SP. Anais eletrônicos, Disponível em < http://asp.spfte.org.br/pub/media/setor_07_2008.pdf > Acesso em: 28 de jan. 2014.

MENDIETA, M. C.; VARGAS, N. R. C.; SOUZA, A. D. Z.; CEOLIN, T.; HECK, R. M. **Plantas tóxicas referidas por agricultores de base ecológica da região Sul do Rio Grande do Sul.** XX Congresso de Iniciação Científica e III Mostra Científica UFPEL. Pelotas-RS, 2011.

MEYER, B. N.; FERRIGNI N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOREIRA, C. P. S.; ALMEIDA, V. L. Utilização de espécies vegetais para o desenvolvimento de medicamentos: fitofármacos e fitoterápicos. **Revista da Fundação Ezequiel Dias**, v. 3, n. 2, jul./dez. 2008

MOSHI, M. J.; COSAM, J. C.; MBWAMBO, Z. H.; KAPINGU, M.; NKUNYA, M. H. H. 2004. Testing beyond ethnomedical claims: brine shrimp lethality of some Tanzanian plants. **Pharm Biol** 42: 547-551.

MOURA, W. R. A. **Ensaio Farmacológico das atividades anti-inflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda de *Copaifera Lueltzelburgai*, Harm e *Sida santaremnensis* Monteiro**, Tese (Doutorado), universidade Federal do Piauí, 69 f, 2010.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O.; ARCANJO, D. D. R.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM-NETO, P. J. 2009. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 19, no. 2B, p. 524-529.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008. 677p.

OLIVA, M. L. M.; GALLUCCI N, Z.; DEMO, M. S. 2007. Cytotoxic activity of Argentinean essential oils on *Artemia salina*. **Pharmaceutical Biology** 45: 259-262.

OLIVEIRA, E. T.; BRITO, C. A.; OLIVEIRA, M. R. C.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. **A. Atividade antiedematogênica de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) em modelos animais**. In: 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008, águas de Lindóia, SP. Anais eletrônicos. Disponível em <http://hasp.sbfte.org.br/pub/media/stor_05-2008.pdf> Acesso em 11 de fev. 2014.

ORECH, F. O.; AKENGA, T.; OCHORA, J.; FRIIS, H.; HANSEN, J. A. Potential toxicity of some traditional leafy vegetables consumed in nyang'oma division, western Kenya. **African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development**, Vol. 5, No.1, 2005.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. 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. **Phytotherapy**, v. 8, p. 395-400, 2001.

RAHMAN, A.; PAUL, L. C.; SOLAIMAN, M.; RAHMAN, A. A. Analgesic and cytotoxic activities of *Sida rhombifolia* Linn. **Pharmacologyonline** 2: 707-714 (2011).

RODRIGUES, E.; ALMEIDA, J. M. D.; PIRE, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de** 20(6): 897-903, Dez. 2010.

SCARPA, G. F. **Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 115 - 135, 2004.

SHINWARI, M. I.; KHAN, M. A. Folk use of medicinal herbs of Margalla Hills National Park, Islamabad. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 69,p. 45-56, 2000.

SILVA, A. C. O et al. An approach to chemotaxonomy to the fatty acid content of some *Malvaceae* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38 , p. 1035–1038, 2010.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M. S.; LINS, A. C. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F. V. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ULBR. (MALVACEAE). **Química Nova**. V. 29, N. 6, 1250-1254, 2006.

SILVA, L. N. M.; NOGUEIRA, J. C. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Estudo Farmacognóstico Da Raiz De *Sida Cordifolia* L Malvaceae. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 2, n2, p 161-163, 2005.

SILVA, T. M. S.; BATISTA, M. M; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F. 2005. Molluscicidal activity of some *Brazilian Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 4: 419-425.

SINGH, S.; ERNST, E. **Truque ou Tratamento**. Verdades e mentiras sobre a medicina alternativa. Rio de Janeiro: Record, 2013.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 4, Maio 2003. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/> Acesso em: 29 de fev. de 2014.

USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B. B.; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 19(3): 805-813, Jul./Set. 2009.

UTYAMA, I.K.A; ANDRADE, D. DE; WATANABE, E.; PIMENTA, F.C. & ITO, I.Y. 2007. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. **Revista Eletrônica de Farmácia IV**: 202-207.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E. C.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C. 2005. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15: 162-168.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEI-FILHO, V. A. Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.