



Prospecção fitoquímica, potencial anti-helmíntico e análise toxicológica de Macaé (*L. sibiricus* L.)

Phytochemical screening, anthelmintic potential and toxicological analysis of Macae (*L. sibiricus* L.)

Recebido em 23/03/2010

Aceito em 18/08/2012

Bruno Henrique Ferrão¹, Renata de Fátima Molinari¹, Michelle Bicalho Teixeira¹, Camila Miranda Martins¹, Klécila Rejane Portes Reis¹, Gabriel Domingos Carvalho² & Camilo Amaro de Carvalho^{1*}

¹Departamento de Farmácia (FITOFÁRMACOS), União de Ensino Superior de Viçosa, UNIVIÇOSA, Viçosa, MG, Brasil

²Instituto Federal Norte de Minas Gerais (IFNMG - Campus Salinas), Salinas, MG, Brasil

RESUMO

As folhas de *Leonurus sibiricus* L. (Macaé) foram coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais, selecionadas, limpas, secas (40°C) e trituradas. Os extratos foram preparados em água destilada à 10% (m/v) e submetidos à extração por uma hora. Os filtrados foram submetidos às análises química (prospecção fitoquímica e espectrofotométrica) e biológicas (atividade ovicida, larvicida e ensaios de toxicidade frente a *Artemia salina*). O extrato aquoso das folhas de *L. sibiricus* L. demonstrou-se eficaz no controle de estrongilídeos, apresentando redução da eclodibilidade dos ovos (62%), além de baixa toxicidade *in vitro* frente a *Artemia salina* L. O estudo revela uma promissora fonte de novos fármacos com atividade larvicida e aplicação veterinária.

Palavras-chave: *Leonurus sibiricus* L.; *Artemia salina*; espectrofotometria

ABSTRACT

The leaves of *Leonurus sibiricus* L. (Macaé) were collected in Viçosa, Minas Gerais, selected, cleaned, dried (40°C) and crushed. The extracts were prepared in distilled water at 10% (w/v) and subjected to extraction for one hour. The filtered subjected to chemical analysis (prospecting and phytochemistry, spectrophotometric) and biological (activity ovicidal, larvicidal and toxicity testing in the brine). The aqueous extract of leaves of *L. sibiricus* L. shown to be effective in controlling strongyle, a reduction in hatchability of eggs (62%) when analyzed counts of larvae stool cultures, and low toxicity *in vitro* against *Artemia salina* L. The study reveals a promising source of new drugs with larvicidal activity and veterinary application.

Keywords: *Leonurus sibiricus* L.; *Artemia salina*; spectrophotometry

INTRODUÇÃO

A história da humanidade é acompanhada pela utilização de plantas medicinais (Carvalho, 2006), porém, apenas recentemente tem se estudado às suas variadas propriedades medicinal (Torres *et al.*, 2008).

A *Leonurus sibiricus* L. (Macaé) pertence à família Lamiaceae e ordem Lamiales (Larcher, 2000). É uma planta ereta, ramificada de hastes quadranguladas, de folhas simples e bem divididas e flores labiadas de cor azulada, com sépalas rígidas, reunidas em inflorescências axilares fasciculadas. Nativa da China, Sibéria e Japão se expandiu em todo território brasileiro pelo seu crescimento espontâneo (Lorenzi & Matos, 2002). Produz terpenóides e substâncias fenólicas com efeitos alelopáticos (Larcher, 2000), sendo considerada planta daninha quando cresce em lavouras agrícolas (Lorenzi & Matos, 2002). A utilização

como erva medicinal é indicada, com base na tradição popular (Castellucci *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2011).

A análise fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais ou avaliar sua presença nos mesmos, permitindo assim identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes (Silva *et al.*, 2010).

No estudo de princípios ativos de uma planta é muito importante a escolha de uma metodologia capaz de elucidar estruturalmente as inúmeras moléculas que podem vir a constituir – lá (Carvalho *et al.*, 2008). Atualmente tem-se utilizado a espectrofotometria na região UV-VIS para esta finalidade, em função de sua robustez, custo e grande número de aplicações desenvolvidas (Rocha & Teixeira, 2004). É um método de análise baseado na pro-

* Contato: Camilo Amaro de Carvalho, Departamento de Farmácia (FITOFÁRMACOS), União de Ensino Superior de Viçosa, UNIVIÇOSA, Viçosa, MG, Brasil, E-mail: camiloamaro@yahoo.com.br

priedade de que espécies iônicas ou moleculares absorvem radiações na região do ultravioleta e visível (Proença, 2007).

Os helmintos gastrointestinais são os principais parasitos de eqüídeos (Hodgkinson, 2006; Parreira, 2009), sendo os estrongilídeos, membros da superfamília Strongyloidea, família Strongylidae, os de maior importância (Parreira, 2009). Os helmintos podem causar desde um pequeno desconforto abdominal até episódios fulminantes de cólicas e morte (Klei & Chapman, 1999; Duarte et al, 2008).

As plantas que apresentam substâncias biodisponíveis capazes de causar alterações metabólicas no organismo sendo denominadas plantas tóxicas. Tais alterações são reconhecidas como sintomas de intoxicação, que em alguns casos podem causar sérios transtornos e até mesmo levar a óbito (Vasconcelos *et al.*, 2009).

Na avaliação da toxicidade têm sido empregados diferentes bioensaios e organismo-teste (Costa & Olivi, 2008). A avaliação prévia de toxicidade em *Artemia salina* Leach, um microcrustáceo, em substâncias candidatas à novas drogas vem tendo a sua importância reconhecida, além disso, esta metodologia é altamente econômica e de fácil implementação laboratorial (Vasconcellos *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi realizar a prospecção fitoquímica e análise espectrofotométrica do extrato aquoso das folhas de *L. sibiricus* L., avaliar a eficácia deste extrato *in vitro* no controle de estrongilídeos em eqüinos, pelo método de coprocultura quantitativa e avaliar sua toxicidade frente à *A. salina* L.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas de *Leonurus sibiricus* L. (Macaé) foram coletadas no município de Viçosa localizado na Zona da Mata Norte (649 metros acima do nível do mar e apresenta temperaturas médias anual de mínima em torno de 13,2°C e máxima de 25,6°C. A área do município é de 279 km², latitude a 20 graus 45' 20" S, longitude a 42 graus 52'40"O), Minas Gerais – Brasil. Uma excisata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa - UFV, para identificação taxonômica, sob número 34.316.

Obtenção do extrato vegetal

As folhas do vegetal foram selecionadas, limpas e secas em estufa a 40°C e trituradas em moinho de facas (Marconi® - Modelo 340). Os extratos foram preparados em água destilada à 10% (m/v) e submetidos à extração por uma hora em ultrassom (Unique® - MaxiClean 1400). Posteriormente foram filtrados à vácuo e em seguida submetidos às análises (Carvalho et al., 2008).

Prospecção Fitoquímica

O extrato vegetal foi submetido a uma série de reações de caracterização de: açúcares redutores, alcalóides, compostos antracênicos, compostos fenólicos, cumarinas, flavonóides, heterosídeos cardiotônicos, naftoquinonas, saponinas, taninos e triterpenos e esteróides, tendo sido realizadas em triplicata. Os testes se baseiam em reações

cromáticas e de precipitação conforme descrito por Simões *et al.* (1999).

Análise espectrofotométrica

Para as análises espectrofotométricas o extrato vegetal preparado à concentração de 0,1% (m/v - planta/solvente). Os espectros foram medidos em espectrômetro FEMTO 800XI®, com cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, varreduras de 200 a 700 nm com intervalos de 2 nm.

Atividade ovicida e larvicida

Obtenção das amostras de fezes

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais (eqüídeos) que se encontravam estabulados nas dependências do Hospital Veterinário da FACISA/UNIVICOSA. Retiraram-se amostras para a contagem de ovos nas fezes dos animais através do método OPG (método de contagem de ovos por grama de fezes de Gordaon & Whithlock).

Fezes com alta contagem de ovos de parasitos foram selecionadas para realização da coprocultura ou cultura de fezes de acordo com o método de Loss modificado por Araújo (2006). Pelo exame de OPG identificou-se ovos de estrongilídeos, confirmando que a amostra era positiva, estando os animais parasitados. A média dos resultados dos exames de OPG foi 1.340 ovos por grama de fezes.

Realização da Coprocultura e Método de Baermann

Para a análise de eficiência de *L. sibiricus* L. na eclodibilidade dos ovos e mortalidade de larvas de estrongilídeos foram realizadas coproculturas e recuperação das larvas com o extrato vegetal.

Após a realização dos OPGs pela carga parasitaria realizou-se a coprocultura usando vermiculita segundo método de Loss modificado, de acordo com Araújo (2006). Foram realizadas 18 coproculturas, possuindo seis repetições para cada um dos três grupos de tratamento, onde se tem:

- Grupo 1 (controle negativo): realizou-se seis coproculturas para a recuperação das larvas, adicionando 8mL de água mineral em cada amostra.
- Grupo 2: utilizou-se seis coproculturas com 8 mL de extrato das folhas de *L. sibiricus* L. a 10%.
- Grupo 3: foram feitas seis coproculturas usando 8 mL de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) a 0,33 M, como grupo positivo para inativação das larvas, segundo técnica descrita por Carvalho et al. (2009).

As coproculturas foram colocadas em estufa de crescimento a 25°C por sete dias, e após este período foi realizado o método de Baermann de acordo com Araújo (2006), onde o conteúdo das coproculturas foi colocado em contato com água a 45°C no aparelho de Baermann. O sedimento oriundo deste método foi colocado em lâminas para análise da eficácia do extrato de *L. sibiricus* L. na eclodibilidade dos ovos e/ou mortalidade de larvas infectantes de estrongilídeos.

Ensaios de toxicidade – *Artemia salina* Leach

Foi utilizada a metodologia de Meyer *et al.* (1982) adaptada por Ruiz *et al.* (2005). Uma solução salina (com

sal marinho) na concentração 3,5% (m/v) foi preparada, sendo o pH ajustado entre 8,0 – 9,0 adicionando-se gotas de uma solução 0,1 M NaOH (Merck®). Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *A. salina* L. e no preparo das outras diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina, por 48 horas, com aeração constante e temperatura controlada de 25 °C.

Foram transferidas 10 larvas de *A. salina* L. para tubos de ensaio contendo a solução salina e amostras a serem testadas, nas seguintes concentrações do extrato de 250, 500, 1000, 1500 e 2500 mg.L⁻¹. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24h. Por se tratar de um crustáceo ativo em água salina, a falta de movimento e sedimentação são os indicadores de morte do mesmo.

O teste foi acompanhado de controle negativo, somente com água salina, e positivo com uma solução de K₂Cr₂O₇ 0,1 mol.L⁻¹ (dicromato de potássio). A DL₅₀ foi estimada a partir de regressão linear simples, por meio da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração do extrato.

Análise dos Dados

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o método de Lilliefors, para se comprovar a normalidade. Uma vez verificado a normalidade dos dados, realizou-se a análise de variância para verificar o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros e o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação das médias por meio do pacote estatístico Sistema para Análise Estatística SAEG (2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da prospecção fitoquímica de *L. sibiricus* L. indicaram a presença de metabólitos secundários que podem estar relacionados à sua ação no tratamento de diversos distúrbios (Tabela 1).

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de isolamento e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente substâncias provenientes do metabolismo secundário, sendo responsáveis, ou não, pela ação biológica (Toledo *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2009).

Os compostos produzidos pelos vegetais podem ser agrupados genericamente em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos e os secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais e alcalóides entre outros (Simões *et al.*, 2004). Esses compostos secundários são, em sua maioria, responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos das plantas, além de apresentarem grande importância ecológica, pois atuam na atração de polinizadores e na ativação da defesa química da planta contra estresse ambiental (Baladrin *et al.*, 1985; Di Stasi, 1996; Peres *et al.*, 2009).

Alguns metabólitos secundários verificados neste estudo podem ser apontados como ponto de partida para identificação da potencialidade da planta e sua possível ação medicinal. A partir dessas informações é possível especificar ainda mais o conhecimento sobre a espécie, tendo que são poucos os dados sobre a planta e muitas as

suas utilizações na medicina popular.

Aliado aos dados da prospecção fitoquímica uma análise espectrofotométrica do extrato da folha a 10% (m/v) (Figura 1) foi realizada afim de obter o perfil espectral do extrato. O mesmo apresentou absorvância em diferentes comprimentos de onda ou faixas espectrais que corresponde a uma vasta variedade de compostos.

Tabela 1. Prospecção fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *L. sibiricus* L.

Testes [†]	Resultado ^{**}	
Açúcares Redutores	A-I	+++
Alcalóides	B-I	+++
	B-II	---
	B-III	+++
Compostos antracênicos	C-I	---
	C-II	---
Compostos Fenólicos	D-I	+++
Cumarinas	E-I	---
Flavonóides	F-I	+++
	F-II	+++
Heterosídeos cardiotônicos	G-I	+++
	G-II	---
Naftoquinonas	H-I	---
Saponinas	I-I	---
Taninos	J-I	+++
	J-II	+++
Triterpenos e Esteróides	K-I	+++

* A-I: Reagente de Fehling A e Fehling B; B-I: Reagente Drangendorf; B-II: Reagente Mayer; B-III: Reagente Wagner; C-I: NaOH; C-II: acetato de magnésio; D-I: cloreto férrico; E-I: KOH-fluorescência; F-I: fragmentos de magnésio em fita; F-II: AlCl₃ - fluorescência; G-I: ácido pícrico; G-II: Reagente de Kedde; H-I: NH₄OH; I-I: formação de espuma; J-I:HCl e gelatina salgada; J-II: acetado de chumbo; K-I: anidro acético-ácido sulfúrico.

** (+) resultado positivo e (-) resultado negativo, em triplicata de amostras.

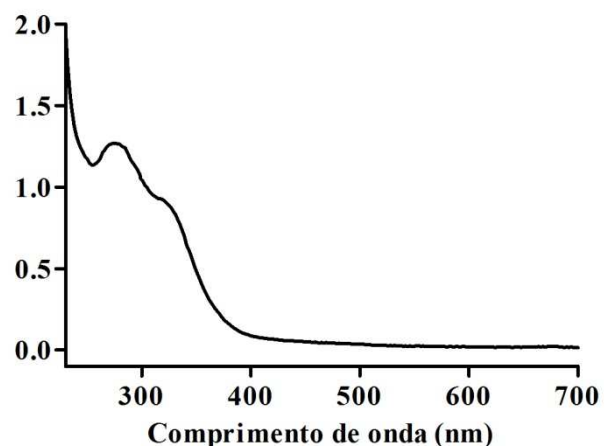


Figura 1. Perfil espectrofotométrico do extrato aquoso de *L. sibiricus* L. nos comprimentos de onda de 230 a 700 nm.

Ao longo da faixa espectral analisada se enquadram compostos fenólicos das classes isoflavonóides e biflavonóides aos quais são atribuídas atividades larvicidas e absorvem em 240-285 e 300-400, entre outros compostos

como taninos, antraquinonas conforme Simões *et al.* (2004).

O perfil espectral colabora para um posterior estudo como forma de comparação de dados, bem como otimização de extrações de acordo com a presença de grupos funcionais específicos.

Segundo Peres *et al.*, (2009), os aspectos como a polaridade, presença ou ausência de sistemas *p* (insaturações), de anéis aromáticos, ácidos ou bases de Lewis (espécies ricas ou carentes de pares de elétrons), podem ser identificadas de acordo com a faixa espectral na qual ocorre, ou não, uma transição eletrônica. Portanto, o comprimento de onda remete a dois aspectos básicos e complementares, a polaridade da espécie que está sendo extraída, bem como o comportamento espectral do grupamento frente a diferentes solventes.

Afim de avaliar a atividade citotóxica de *L. sibiricus* L. os extratos aquosos de suas folhas foram submetidos ao bioensaio frente a *A. salina* L.. Os resultados permitiram averiguar a mortalidade dos organismos e correlacionar com a concentração dos extratos (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso das folhas de *Leonurus sibiricus* L. frente a *A. salina* L.

Tubos	Larvas vivas						
	Controles		Extratos em mg.L ⁻¹				
	Positivo	Negativo	250	500	1000	1500	2500
1	0	10	10	9	6	6	0
2	0	10	9	8	5	4	0
3	0	10	9	9	8	4	0
Médias	0	10	9,3	8,6	6,3	4,6	0

A regressão linear entre esses dois parâmetros revelou uma DL₅₀ igual a 1318 mg.L⁻¹ para o extrato analisado. Este valor não indica toxicidade no extrato, pois, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma substância é considerada tóxica quando apresenta valores de DL₅₀ inferior a 10³ mg.L⁻¹ frente a *A. salina* L. (Meyer *et al.*, 1982; Carvalho *et al.*, 2009).

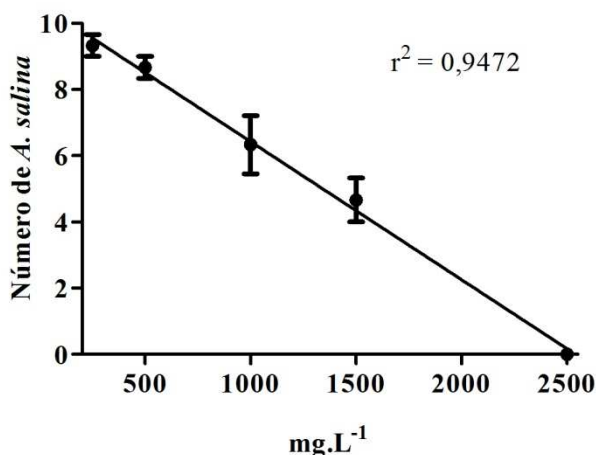


Figura 2. Curva de morte de *Artemia salina* L. em relação às concentrações dos extratos aquosos das folhas de *L. sibiricus* L.

A avaliação prévia da toxicidade com *A. salina* L. constitui uma metodologia econômica e prática devido a sua sensibilidade, o que permitiu observar uma mortalidade crescente de acordo com o aumento das concentrações dos extratos, e uma mortalidade quase imediata para o controle positivo; podendo concluir que nas proporções menores não se verificou morte dos microcrustáceos e que o uso de concentrações maiores que as testadas seriam letais para a estirpe de *A. salina*.

É relevante observar que mesmo os extratos testados indicando baixa toxicidade significativa frente a *A. salina* L., não se pode afirmar que há ausência de substâncias tóxicas. A utilização desta espécie poderá proporcionar futuramente uma alternativa de controle do nematóide, desde que sejam feitos outros estudos a fim de garantir ausência de toxicidade *in vivo*. O conhecimento e isolamento dos compostos de atividade helminticida deste vegetal são extrema importância para garantir um fitoterápico de eficácia e segurança adequado.

O extrato aquoso das folhas de *L. sibiricus* mostrou significativa atividade anti-helmíntica com 62,0% de eliminação de larvas de estrogilídeos.

As coproculturas apresentaram-se eficazes quanto à simulação de um ambiente adequado para eclosão dos ovos e desenvolvimento das larvas infectantes. Observou-se no grupo controle negativo um número elevado de larvas, onde a média do total de larvas foi 22.080.

Verificou-se efeito significativo do tratamento com extrato aquoso das folhas de *L. sibiricus* L. diferenciando-se do controle negativo (água mineral) com relação percentual de mortalidade larval pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O tratamento não se diferencia estatisticamente ($p > 0,05$) do controle positivo (dicromato de potássio) quanto à porcentagem de mortalidade larval (Tabela 3).

Tabela 3. Média das larvas e porcentual de mortalidade larval

Tratamento	Larvas totais	Larvas vivas	Mortalidade larval (%)
Controle negativo	22.080,00 A	2.1750,00 A	1,00 B
Extrato Vegetal	6.610,00 BC	2.820,00 B	62,00 A
Controle positivo	90,00 C	20,00 B	54,00 A
Coefficiente de variação	58,35	52,23	38,61

*Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Verificou-se o coeficiente de variação elevado, quando se comparou os efeitos dos tratamentos em relação às larvas mortas, demonstrando ocorrer uma diferença entre o grupo controle positivo e o grupo controle negativo. Por maior que seja o coeficiente de variação, o teste de Lilliefors indicou que há normalidade dos dados apresentados neste trabalho.

Mesmo em concentração considerada baixa (10% - m/v) o extrato aquoso de *L. sibiricus* L. obteve resultado de 62,0% de eficácia na mortalidade das larvas, podendo ser considerado como uma alternativa viável para o controle parasitológico de estrogilídeos em equídeos. Porém são

necessários mais estudos para a padronização da concentração ideal, bem como a realização de testes *in vivo* com o intuito de comprovar a eficácia do produto final em uma formulação farmacêutica.

Dessa forma, frente tais resultados, os extratos aquosos de *L. sibiricus* L. apresenta grande potencial anti-helmíntico por possuírem substâncias ativas que confirmam esta possível atividade terapêutica.

O surgimento de várias doenças, o alto custo dos medicamentos, a cultura dos povos sobre a medicina popular e a acessibilidade a diversas espécies são fatores que contribuem para o uso indiscriminado de certas plantas. Devido a este tipo de uso, as intoxicações por plantas são frequentes e causam um sério risco à população. Além disto, o uso de plantas sem o conhecimento do verdadeiro potencial tóxico e da ação farmacológica pode causar um efeito nocivo e não profilático desejado. Os produtos naturais precisam ser muito estudados para uma padronização de fitonematóides, visando ao controle populacional desses patógenos, o que poderá beneficiar, principalmente, o manejo de qualidade de equídeos.

CONCLUSÃO

O extrato aquoso das folhas de *L. sibiricus* L. demonstrou-se eficaz no controle de strongilídeos, apresentando redução da eclodibilidade dos ovos (62%), quando analisadas as contagens de larvas das coproculturas, além de baixa toxicidade *in vitro* frente à *Artemia salina* L.

O estudo revela uma promissora fonte de novos fármacos com atividade larvicida e aplicação veterinária. Entretanto novos testes de doses eficazes, toxicidade e isolamento do(s) metabólito(s) responsável(is) pela atividade deverão ser realizados. Além de estudos de formulações farmacêuticas visando um produto com qualidade e baixo custo.

REFERÊNCIAS

Araújo JV. Diagnóstico de helmintos. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p. 9-46 (Caderno Didático, 113).

Carvalho CA, Matta SLP, Melo FCSA, Andrade DCF, Carvalho LM, Nascimento PC, Silva MB, Rosa MB. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* MIERS – Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. *Rev. Eletrônica de Farmácia* 6(1):51-58, 2009.

Carvalho CA, Silva MB, Oliveira TG, Lima JM, Rosa MB. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea* var. *capitata*. *Rev. Bras. Farm.* 18:249-257, 2008.

Carvalho JE. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. *Revista Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais*, 7, 2006.

Carvalho CA, Molinari RF, Silva SRS, Pinto R, Fani MO. Medicinal plants used by the population of Viçosa, MG, Brasil - Preliminary study. *Rev. Eletrônica de Farmácia*, 8(4): 13-26, 2011.

Castellucci S, Lima IS, Nordi N, Marque JGW. Plantas medicinais relatadas pela comunidade residente na estação ecológica de Jataí, município de Luís Antônio/SP: uma abordagem etnobotânica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 3:51-60, 2000.

Costa RC & OLIVI P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*, 31(7):1820-1830, 2008.

Duarte ER, Oliveira NJF, Silveira JT, Ribeiro FLA, Souza RM. Controle de verminose em equinos no norte de Minas Gerais com associação de pamoato de pirantel e ivermectina. *Revista Caatinga*, 21(1):1-4, 2008.

Larcher W. *Ecofisiologia vegetal*. 2 ed. Stuttgart: Eugen Ulmer, 2000. 531p.

Lorenzi H & Matos FJA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam LB, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. *Brine shrimp*: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plants Research*, 45:31-34, 1982.

Nascimento EM, Furlong J, Pimenta DS, Prata MCA. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos. *Ciência Rural*, 39(3):817-824, 2009.

Proença MVB. Desenvolvimento de um método espectrofotométrico UV-Vis utilizando um dióxoleno para a determinação de Ni(II). 2007. Londrina. 75p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina.

Rocha FRP & Teixeira LSG. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Quím. Nova*, 27(5):807-812, 2004.

Ruiz ALTG, Magalhães EG, Magalhães AF, Faria AD, Amaral MCE, Serrano DR, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (*Cyperaceae*). *Rev. Bras. Farm.* 15(2):98-102, 2005.

SAEG, Sistema para Análise Estatística. Versão 9.1. Fundação Artur Bernardes, Universidade Federal de Viçosa, 2007.

Silva NLA, Miranda FAA, Conceição GM. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, 6(2), 2010.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA & Petrovick PR. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre: Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 1999.

Parreira DR. Coinfecção por *Trypanosoma evansi* (Steel 1885), *Balbani* 1888, e pelo vírus da anemia infecciosa equina em cavalos do pantanal sul-matogrossense. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz.

Toledo ACO, Hirata LL, Buffon MCM, Miguel MD, Miguel OG. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*. 21(½):7-13, 2003.

Torres EC, Ribeiro A, Soares MA. Abordagem Fitoquímica e prospecção do potencial antimicrobiano *in vitro* das partes aéreas de três espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae. Fundação Comunitária de Ensino Superior de Itabira, Itabira – MG, 2008. Disponível em: <http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/diaadia/diadia/arquivos/File/conteudo/artigos_teses/Biologia/Artigos/abordagem-fitoquimica.pdf> Acessado em: 06/06/2011.

Vasconcellos MLAA, Junior CGL, Silva FPL, Lopes HM, Lacerda KM, Silva TMS, Silva TG. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* Leach. de sete adutos aromáticos de Baylis-Hillman. Sociedade Brasileira de Química, maio 2006 [on line]. Disponível em <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/29ra/resumos/T0463-1.pdf>> Acesso em: 15 abr. 2010.

Vasconcelos J, Vieira JGP, Vieira EPP. Plantas Tóxicas: Conhecer para Prevenir. *Revista Científica da UFPA*, 7(01), 2009.