



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

ANA MICHELLE LOIOLA RAMOS

TRIAGEM FITOQUÍMICA E ESTUDOS BIOLÓGICOS DE *Apodanthera congestiflora* E DE *Tacinga palmadora*

**CAMPINA GRANDE
2018**

ANA MICHELLE LOIOLA RAMOS

TRIAGEM FITOQUÍMICA E ESTUDOS BIOLÓGICOS DE *Apodanthera congestiflora* E DE *Tacinga palmadora*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fitoquímica
Orientador: Prof. Dr. Harley da Silva Alves.

CAMPINA GRANDE-PB

2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

R175t Ramos, Ana Michelle Loiola.
Triagem fitoquímica e estudos biológicos de *Apodanthera congestiflora* e de *Tacinga palmadora* [manuscrito] / Ana Michelle Loiola Ramos. - 2018.
59 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.

"Orientação : Prof. Dr. Harley da Silva Alves ,
Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Fitoterápicos. 2. Screening químico. 3. Citotoxicidade. 4.
Atividade antimicrobiana. I. Título

21. ed. CDD 615.321

ANA MICHELLE LOIOLA RAMOS

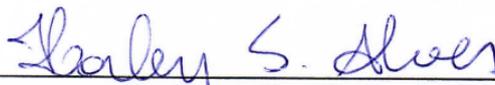
TRIAGEM FITOQUÍMICA E ESTUDOS BIOLÓGICOS DE APODANTHERA
CONGESTIFLORA E DE TACINGA PALMADORA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Farmacêuticas.

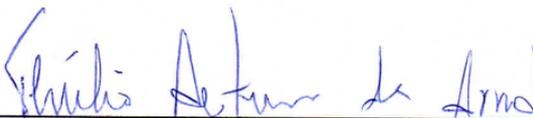
Área de Concentração: Fitoquímica

Aprovado em 28 / 08 / 2018

BANCA EXAMINADORA



Professor Dr. Harley da Silva Alves
Universidade Estadual da Paraíba
Orientador, UEPB



Professor Dr. Thulio Antunes de Arruda
Universidade Estadual da Paraíba
Avaliador (INTERNO)



Ma. Laísia Rangel Peixoto
Universidade Federal da Paraíba
Avaliador (EXTERNO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu Senhor e criador, que em todos os momentos me sustentou e fortaleceu. Sem a sua presença e misericórdia durante minha graduação e especialmente nesse final, eu não teria conseguido.

Agradeço a minha mãe do céu, Maria, pelo dom da perseverança, por ser colo para mim nas tantas vezes em que só fazia chorar. Obrigada por acalmar meu coração Mãe!

Agradeço a minha irmã, que com tão pouca idade é um dos meus maiores exemplos. É minha inspiração diária, e um dos grandes motivos que tenho para seguir sempre em frente buscando o melhor.

Agradeço a minha mãe, que é quem eu tanto amo. Pelo seu incentivo nos estudos, pela sua vida que é o que me move. A meu pai, por ser meu maior exemplo de honestidade, perseverança e insistência, enfrentando as dificuldades e anulando a possibilidade de desistência.

Agradeço ao meu companheiro, que faz todos os dias jus a palavra. Está sempre ao meu lado, me amando e cuidando cada vez mais. É sinônimo de ajuda e socorro. É quem arranca sorrisos meus em tempos de aflição.

Agradeço a todos os amigos que construí durante esses cinco anos de graduação, cada um de vocês teve grande importância nesse caminho. Em especial Beatriz, Thamires e Thayse. Que estão comigo desde do primeiro dia, até o último.

Agradeço aos mestres Helimarcos e Laisla, companheiros de laboratório, de ciência e de muito trabalho. Sempre juntos, por vários dias, fins de semana e feriados na realização de testes e pesquisas. Obrigada pelo apoio e presença!

Agradeço a Wilma, que em tanto me ajudou, disponibilizando o laboratório, tirando dúvidas, auxiliando e orientando na realização dos testes. Muito obrigada.

Agradeço a Prof. Dra. Ana Claudia e o Prof. Dr. Germano que me introduziram com maestria a esse mundo espetacular e árduo da pesquisa. Sou eternamente grata.

Agradeço a meu orientador Harley Alves, pela sua disponibilidade em meio a tantos compromissos, em me orientar. Agradeço pela sua preocupação constante com a realização correta e segura de todos os experimentos. Também pela sua compreensão quando precisei.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin.

RESUMO

Tendo em vista a escassez de estudos com plantas nativas da caatinga, o objetivo desse trabalho é realizar a triagem fitoquímica e estudos biológicos preliminares da *Apodanthera congestiflora* e da *Tacinga palmadora*. Para tanto, é necessário realizar uma pesquisa com as frações dos extratos obtidos realizando o screening fitoquímico qualitativo, seguido dos ensaios: toxicológico com *Artemia salina*, Citotoxicidade por hemólise e atividade antimicrobiana *in vitro*. Diante disso, verifica-se que O *screening* qualitativo confirmou na *A. congestiflora* a presença de alcaloides, flavonoides, polissacarídeos e saponinas, enquanto o de *T. palmadora* confirmou a presença de alcaloides e triterpenos. O ensaio de atividade antimicrobiana *A. congestiflora* demonstrou ausência de atividade contra cepas bacterianas e uma discreta atividade antifúngica frente *C. albicans*. A *T. palmadora* atestou uma boa atividade antifúngica. No teste toxicidade a *T. palmadora* apresentou toxicidade apenas na fase diclorometano, já a *A. congestiflora* apresentou toxicidade moderada. O que impõe a constatação de que *A. congestiflora* e *T. palmadora* demonstram ser espécies promissoras, por terem apresentado importantes atividades biológicas, concluindo que o trabalho realizado servirá não só como de modelo de estudo para outras espécies vegetais do mesmo gênero, assim como base de dados para estudos mais detalhados, a fim de no futuro ser utilizado para o desenvolvimento de um possível medicamento.

Palavras-chave: Plantas da caatinga. *Screening* químico. Citotoxicidade. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

In view of the scarcity of studies with plants native to the caatinga, the objective of this work is to carry out phytochemical screening and preliminary biological studies of *Apodanthera congestiflora* and *Tacinga palmadora*. Therefore, it is necessary to conduct a research with the fractions of the extracts obtained by performing qualitative phytochemical screening, followed by the tests: toxicological with *Artemia salina*, Cytotoxicity by hemolysis and *in vitro* antimicrobial activity. Therefore, it was found qualitative *screening* confirmed the presence of alkaloids, flavonoids, polysaccharides and saponins in *A. congestiflora*, while that of *T. palmadora* confirmed the presence of alkaloids and triterpenes. The *A. congestiflora* antimicrobial activity assay showed absence of activity against bacterial strains and a discrete antifungal activity against *C. albicans*. *T. palmadora* attested a good antifungal activity. In the toxicity test, *T. palmadora* showed toxicity only in the dichloromethane phase, whereas *A. congestiflora* showed moderate toxicity. What imposes the observation that *A. congestiflora* and *T. palmadora* show to be promising species, for having presented important biological activities, concluding that the work done will serve not only as a study model for other plant species of the same genus, as well as a basis data for more detailed studies, in order to be used in the future for the development of a possible drug.

Keywords: Caatinga plants. Chemical screening. Cytotoxicity. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie <i>Apothantera congestiflora</i>	23
Figura 2 - Detalhes <i>Apothantera congestiflora</i>	24
Figura 3 - <i>Tacinga palmadora</i> (Britton & Rose) N.P.Taylor & Stuppy	27
Figura 4 - <i>Artemia Salina</i> Leach.....	29
Figura 5 - Incubadora com cistos de <i>A. salina</i>	33
Figura 6 - Cistos de <i>A. salina</i> sob 24h de exposição a luz incandescente (40w).	33
Figura 7 - Diluição dos extratos	37
Figura 8 - Reação de oxirredução da resazurina.....	38
Figura 9 - Organização de extratos na microplaca.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plantas da família <i>Cactaceae</i> e suas principais características etnobotânicas e etnofarmacológicas.	26
Tabela 2 - Pesquisa por metabólitos secundários de <i>T. palmadora</i> e de <i>A. congestiflora</i>	39
Tabela 3 - Percentual hemolítico do extrato FAC-Ac.	46
Tabela 4 - Percentual hemolítico do extrato EAN-Ac.	46
Tabela 5 - Percentual hemolítico do extrato FAC-Tp.	46
Tabela 6 - Percentual hemolítico do extrato FET-Tp.	47
Tabela 7 - Percentual hemolítico do extrato FDM-Tp.	47
Tabela 8 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de <i>T. palmadora</i> em cepas bacterianas.	48
Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de <i>A. congestiflora</i> em cepas bacterianas.	49
Tabela 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de <i>T. palmadora</i> em cepas fúngicas.	48
Tabela 11 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de <i>A. congestiflora</i> em cepas fúngicas.	48
Tabela 12 - Resultados obtidos na pesquisa por metabólitos secundários de <i>T. palmadora</i> e <i>A. congestiflora</i>	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Concentração letal média (CL ₅₀) do extrato hexano da raiz de <i>T. palmadora</i>	42
Gráfico 2 - Concentração letal média (CL ₅₀) do extrato diclorometano da raiz de <i>T. palmadora</i>	43
Gráfico 3 - Concentração letal média (CL ₅₀) do extrato Acetato da raiz de <i>T. palmadora</i>	43
Gráfico 4 - Concentração letal média (CL ₅₀) do extrato Etanoico da raiz de <i>T. palmadora</i>	44
Gráfico 5 - Concentração letal média (CL ₅₀) do extrato Acetato de <i>A. Congestiflora</i>	44
Gráfico 6 - Concentração letal média (CL ₅₀) do extrato Nebulizado de <i>A. Congestiflora</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection*

CBA: Caldo BHI + bactéria + antibiótico

CBAF: Caldo BHI + bactéria + antifúngico

CC: Caldo BHI + Cremophor

CD: Caldo BHI

CL₅₀: Concentração que produz 50% de letalidade

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

EAc: Extrato *Apodanthera congestiflora*

EB: Extrato bruto

ETp: Extrato *Tacinga palmadora*

FAC – Ac: Fase Acetato *Apodanthera congestiflora*

FAC-Tp: Fase Acetato *Tacinga palmadora*

EAN – Ac: Extrato alcoólico nebulizado *Apodanthera congestiflora*

FDM – Tp: Fase Diclorometano *Tacinga palmadora*

FET – Ac: Fase Etanoica *Apodanthera congestiflora*

FET – Tp: Extrato Etanoico *Tacinga palmadora*

FH – Tp: Fase Hexânico *Tacinga palmadora*

FH – Ac: Fase Hexânica *Apodanthera congestiflora*

mL: Mililitros

mg: Miligramas

SS: Solução Salina

TAS: Toxicidade em *Artemias Salinas*

μL: Microlitros

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Uso Milenar das plantas.....	18
3.2	Atividade Biológica das Plantas	18
3.3	Econômica e Mercado de fitoterápicos	19
3.4	Bioma Caatinga.....	20
3.5	Família Cucurbitaceae	22
3.5.1	<i>Apodanthera congestiflora</i>	23
3.6	Família <i>Cactaceae</i>	24
3.6.1	<i>Tacinga palmadora</i>	26
3.7	Teste <i>in vitro</i>	28
3.7.1	<i>Citotoxicidade</i>	28
3.7.2	<i>Toxidade sobre Artemias Salina (TAS)</i>	28
3.7.3	<i>Atividade antimicrobiana</i>	30
4.	METODOLOGIA	32
4.1	Ensaio toxicológico com <i>Artemia salina</i> (TAS).....	32
4.2	Citotoxicidade por hemólise	34
4.3	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	35
4.3.1	<i>Cepas escolhidas</i>	35
4.3.2	<i>Reativação das cândidas</i>	35
4.3.3	Preparo do Inoculo	35
4.4	Execução do teste seguindo a metodologia do CLSI (2003)	35
4.5	Screening fitoquímico qualitativo.....	39
4.5.1	<i>Prospecção química do extrato bruto</i>	39
4.5.2	<i>O procedimento experimental</i>	39
4.5.2.1	<i>Testes que utilizam como solvente água destilada</i>	39
4.5.2.2	<i>Testes que utilizam como solvente metanol</i>	40

4.5.2.3 Testes que utilizam como solvente clorofórmio.....	41
4.5.2.4 Outros testes realizados.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	42
5.1 TAS	42
5.2 Citotoxicidade em eritrócitos (Hemólise)	46
5.3 Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	48
5.4 Screening Fitoquímico Qualitativo	51
6. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento e na cura de enfermidades é empregado desde a antiguidade e, durante os séculos, foi por muitas vezes o seu uso o único recurso terapêutico de muitas comunidades.

É sabido que, nos dias, atuais grande parte da população mundial tem confiança nos métodos tradicionais que dizem respeito aos cuidados diários com a saúde, e aproximadamente 80% dessa população – chamando atenção por ser a maioria de países desenvolvidos – confiam e preferem derivados de plantas medicinais para aplicação desses cuidados (FIRMO et al., 2011).

O investimento da indústria farmacêutica em pesquisas na área de plantas medicinais para o desenvolvimento de fármacos de grande importância é notável (ROMERO, 2007), tão quanto a importância do saber popular utilizado na pré-seleção dessas pesquisas acadêmicas. As propriedades medicinais de algumas plantas popularizaram-se de tal forma, que estas se consagraram no uso popular (MATHEUS, 2002), difundindo-se na sociedade. Um dos exemplos vistos em grandes impérios do passado é a morfina, um alcaloide com potente ação hipnoanalgésica, que é retirado do ópio (látex da papoula – *Papaver somniferum L.*).

O nosso país chama atenção no mundo por sua biodiversidade inestimável. A flora brasileira, sendo uma importante fonte para obtenção de novos recursos terapêuticos, tem um enorme potencial para o desenvolvimento de ciência e tecnologia, destacando-se nos últimos anos devido ao crescimento da quantidade de artigos publicados em revistas científicas na área de produtos naturais e inovações terapêuticas, usando como exemplo os pesquisadores do Instituto Nacional do Semiárido (Insa) – entidade vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) –, que criaram um catálogo com cerca de 100 plantas da Caatinga tradicionalmente usadas pelas comunidades do sertão de Pernambuco no combate à doenças. O poder medicinal das plantas foi comprovado cientificamente em laboratório, e em breve será feito o catálogo.

A vegetação da área da Caatinga – situada no Nordeste - sofre grande influência do clima, apresentando irregularidade na distribuição de chuvas, fenômeno que ocorre na maior parte do ano, influenciando diretamente na disponibilidade e qualidade dos recursos (MENEZES, 2000).

A descrição da vegetação da caatinga é de florestas secas, árvores de porte baixo a médio e arbustos baixos, com características xerofíticas. Uma região que sofreu e sofre com a

exploração humana, devido a intensa atividade agrícola, pecuária e extrativista (SILVA, TABARELLI E LEAL, 2003).

Apesar de todas as adversidades encontradas, a caatinga apresenta uma rica diversidade de espécies que vêm sendo utilizadas pelo homem na produção fármacos e cosméticos, destacando-se por exemplo o óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*). E na prática popular existe uma infinidade de plantas da caatinga usadas para fins terapêuticos: aroeira, juazeiro, catingueira, romã são alguns exemplos de plantas utilizadas nos processos inflamatórios e na cicatrização de ferimentos (SILVA, TABARELLI E LEAL, 2003).

Em contramão à toda riqueza que possuímos, existe a notável escassez de conhecimento científico sobre as propriedades farmacológicas e toxicológicas da maioria das plantas utilizadas na medicina popular. Diversas propriedades farmacológicas passadas de forma oral de geração em geração não possuem uma validação científica (NASCIMENTO, 2006).

Observando o fato de que cerca de 50% dos medicamentos utilizados no tratamento de neoplasias de diversos tipos, em todo o mundo, são oriundos de produtos naturais ou de seus derivados semissintéticos, é contraditório que apenas 15% das plantas da flora mundial – 250 a 350 mil espécies existentes no mundo – foram investigadas quimicamente, e 6% biologicamente. São pouco realizados experimentos para descoberta de seus constituintes, e também pouco é dada continuação a esse trabalho com a execução de testes in vitro e clínicos, sendo necessária a atual procura para desenvolvimento ou aprimoramento – utilizando a possibilidade de sinergismo – de novos fármacos, visando uma melhor atividade aliada a uma baixa toxicidade (COSTA-LOTUFO, 2010).

Com isso, os estudos nas áreas de fitoquímica ganham cada vez mais força e nome. Esse desequilíbrio entre a oferta de plantas e a demanda baixa de estudos com as mesmas tem preocupado órgãos de Saúde Pública, que estão buscando como alternativa criar meios que preservem a população do uso de plantas ineficazes ou tóxicas, bem como das falsificações e adulterações não menos perigosas, quais provavelmente surgirão no mercado com o aumento da procura (MATHEUS, 2002).

Mediante a necessidade da realização de ensaios com procedimentos rápidos e simples utilizando espécies vegetais, pode-se ressaltar a importância de se buscar e avaliar compostos, assim como sua toxicidade, nas diversas ações farmacológicas. Isso implica em um desenvolvimento propício no estudo de plantas medicinais em meio aos seus efeitos farmacológicos, bem como suas ações toxicológicas, consistindo em um fator relevante no

processo de desenvolvimento de novos fármacos de origem vegetal (HARVEY, 2007; PUPO, GALLO, 2007; SANTOS et al., 2013).

Todas essas considerações justificam o interesse em plantas medicinais da caatinga como recuso terapêutico, produzindo conhecimento na área com o propósito de criar uma base para o desenvolvimento de futuras investigações. Torna-se, então, o objetivo desse trabalho, o estudo de plantas nativas escolhidas através do conhecimento popular – utilizando-o como seleção prévia –, para validação científica das propriedades enunciadas, e também o estudo do perfil toxicológico, garantindo a sua eficácia e segurança para o possível desenvolvimento, no futuro, de um novo medicamento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico e biológico preliminar das espécies *Tacinga palmadora* e *Apodanthera congestiflora*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Realizar um *screening fitoquímico* qualitativo das espécies.
- ❖ Avaliar a toxicidade aguda dos extratos e/ou fases por meio do teste em *Artemia salina*.
- ❖ Avaliar a toxicidade por meio de ensaios de hemólise.
- ❖ Encontrar o valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as frações de cada extrato, através da técnica de microdiluição em microplaca.
- ❖ Encontrar o valor da Concentração Fungicida Mínima (CFM) para as frações de cada extrato através da técnica de microdiluição em microplaca.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Uso milenar das plantas

O conhecimento do homem acerca das virtudes das plantas coincide com sua própria história, tendo surgido à medida que as necessidades básicas precisavam ser supridas, através das casualidades, tentativas e observações. A natureza sempre foi um recurso fundamental para a sobrevivência do homem primitivo, que fazia uso das plantas medicinais para curar-se (ALMEIDA, 2011).

O uso terapêutico de algumas plantas já foi registrado por Hipócrates em sua obra “Corpos *Hippocraticum*”, na Grécia Antiga, que consta a organização dos seus conhecimentos médicos associando, para cada enfermidade do seu tempo, um remédio vegetal. Outro exemplo é a rica cultura chinesa, que utiliza o conhecimento passado de geração em geração há mais de cinco séculos, possuindo mais de 5 mil espécies medicinais utilizadas. Assim, como diversas outras civilizações, egípcios, africanos, indianos, romanos, entre outros, deixaram escritos que comprovam a antiguidade do uso e dos poderes medicinais terapêuticos das plantas (ALVES, 2013).

No Brasil, esse consumo já existia antes da chegada dos portugueses em 1500. Entre o século XVI e o XVIII, diversos produtos naturais derivados da biodiversidade vegetal pertencente ao Brasil foram vastamente empregados na Europa, alimentando o lucrativo comércio local através da contínua inclusão de recursos e conhecimentos da medicina indígena na farmacopeia do país dos colonizadores (FOGLIO et al. 2006).

Grandes descobertas históricas registradas nos afirmam que o conhecimento vegetal popular, aliado a ciência, pode gerar resultados fantásticos. Um grande exemplo desse emprego é o caso da *Papaver somniferum L. (Papaveraceae)*, vulgarmente conhecida por papoula, planta que teve seu componente majoritário isolado - a morfina - por Setürner em 1802, e é empregado para combater a dor desde então (FOGLIO et al. 2006).

3.2 Atividade biológica das plantas

Após a exposição breve da história humana e sua relação com as plantas medicinais, torna-se necessário definir quando e por qual razão algumas plantas recebem este título. Podem ser consideradas plantas medicinais aquelas que possuem substâncias bioativas que quando administradas – sob qualquer via ou forma – exercem propriedades terapêuticas, profiláticas ou

paliativas (MORAIS, 2011), ou ainda, que sejam precursoras de fármacos semissintéticos (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Essas propriedades terapêuticas são compostas por reações benéficas provocadas no organismo através dos ‘princípios ativos’ da planta, e nomeia-se de princípio ativo uma única substância ou um conjunto delas atuando de forma sinérgica (ANTUNES E BIANCHI, 1999).

Os princípios ativos constantemente encontrados nas plantas são substâncias químicas que em grande parte derivam do metabolismo secundário, portanto, estão diretamente ligados à relação da planta com o seu meio ambiente, sendo uma parte muito importante para a identidade da planta, por expressar sua individualidade química, podendo ser utilizado para diferenciar de forma qualitativa e quantitativa as espécies. Apesar de sua importância, não são essenciais à sua sobrevivência e na maioria dos casos são produzidos em pequenas quantidades (GOBBO-NETO e LOPES, 2007) (SILVA e CARVALHO, 2004).

Sua aplicação é extremamente vasta, e abrange desde o combate de microrganismos patogênicos até o câncer (SILVA; CARVALHO, 2004).

3.3 Econômica e mercado de fitoterápicos

O Brasil possui uma das maiores diversidades do mundo, estima-se que cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse patrimônio genético gigante – escasso na maioria dos países desenvolvidos – possui na atualidade um valor econômico inestimável para o uso em diversas atividades, mas é na área de desenvolvimento de novos medicamentos em que se encontra a sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

Esse valor é comprovado quando observamos que o número de medicamentos no mercado mundial obtidos diretamente de plantas, toxinas animais, ou microrganismo é aproximadamente 60% – onde as plantas representam quase 25% –, movimentando um capital de quase US\$ 60 bilhões (PORTAL BRASIL, 2017; CALIXTO, 2003).

Acrescentando ainda que um terço dos medicamentos mais utilizados e prescritos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, notável exemplo do ácido acetilsalicílico. Em drogas anticancerígenas e antibióticas essa porcentagem pode ficar em torno de 70%, claro exemplo desse impacto foi a conclusão do ‘Projeto Genoma Humano’, em 2003, que atçou o mercado farmacêutico através da mudança do número de possíveis alvos terapêuticos de 500, para 6 mil (CALIXTO, 2003; CORRÊA, 2002).

É motivador olhar para o passado e ver como o cenário na área de investimentos em pesquisas com plantas medicinais no Brasil mudou. Observando, por exemplo, as décadas de 1940 e 1950, em meio ao processo de industrialização, a maioria dos fitoterápicos consumidos nos países eram importados ou obtidos de matéria prima importada, devido à falta de investimento em pesquisa nessa área (BRUNING, MOSEGUI E VIANNA, 2012). Totalmente diferente do cenário atual, onde existe o crescimento da valorização da riqueza da flora do país, inclusive, valorização de um bioma antes esquecido, que é a caatinga.

O trabalho com plantas medicinais traz resultados excelentes na atualidade e promessas para o futuro. Atualmente, as maiores indústrias mundiais farmacêuticas possuem programas específicos na área de pesquisa em produtos naturais, com interesse na grande quantidade de estruturas químicas complexas, para formação de banco de moléculas que serão utilizadas em ensaios de alta velocidade, fornecendo assim economia de tempo e dinheiro nas pesquisas (FONTES, 2004).

3.4 Bioma Caatinga

O Semiárido Brasileiro se apresenta como uma das regiões de maior densidade populacional do mundo (SAMPAIO E ARAUJO, 2005). Possuindo uma área de aproximadamente 969.590 km^2 , ocupando 54% de toda região Nordeste e um total de 12% do território Brasileiro, com uma população maior que 23,5 milhões de habitantes (INSA, 2014).

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, vasto e extenso ocupa uma área de aproximadamente 734.478 km^2 . Segundo Marinho (2015), ao contrário do que se imagina e propaga, de nenhuma forma esse bioma é pobre, nem em espécies e ainda menos em endemismos. O que ocorre é o escasso conhecimento da Caatinga, mesmo sendo a mais diversa quando comparada a qualquer outro bioma que esteja equiparado às mesmas condições de clima e solo.

Essa ilusão de escassez da diversidade vegetal tem origem no fato da vegetação da Caatinga, durante quase o ano inteiro, não se apresentar verde. O seu aspecto seco, sem rica variedade de cores e formas, com fisionomia dominadas por cactos, arbusto e pouquíssimas árvores – e quando existentes, geralmente de pequeno porte – deixa sugestivo uma flora escassa, e por consequência uma fauna pobre (LOIOLA et al., 2012). Segundo muito botânicos, faz-se cada dia mais necessário uma apuração mais detalhada dessa biodiversidade e ainda mais da sua importância biológica, possibilitando enxergar tamanha riqueza (MARINHO, NASCIMENTO E SOARES 2015).

É considerada um ecossistema único por sua heterogeneidade, possuindo um número expressivo de táxons raros e/ou endêmicos. Em contraste a essa realidade, ela é a mais desvalorizada e menos estudada botanicamente, dentre todos os outros biomas brasileiros. E a prática comum da exploração acaba por ocultar as reais potencialidades da mesma (JUNIOR et al 2014), acelerando o processo de degradação do bioma. As diversas formas de exploração, tais como desmatamento indiscriminado, comércio excessivo de madeira, superpastoreio, descontrole de queimadas, e o uso inadequado do solo destroem o seu equilíbrio natural, favorecendo a desertificação e alteração de mais de 80% do seu ecossistema original (ALBUQUERQUE et al 2001). O investimento em recursos sustentáveis, empregados de forma correta, tornam-se subsídio direto para estudos etnofarmacológicos na busca por novos fitoterápicos.

A farmacopeia natural e comunitária tem sido construída desde antes da “descoberta” do Brasil, por nativos locais (GOMES, 2008). Logo após a colonização a flora foi e vem sendo bastante explorada, gerando novos dados terapêuticos que necessitam de confirmação científica. A caatinga por sua vez possui um vasto panorama de medicamentos naturais utilizados pela população, o que vem gerando uma ascensão na busca e investigações dos princípios ativos por parte das indústrias farmacêuticas (JUNIOR et al 2014).

Mesmo em meio a condições climáticas tão severas, a caatinga consegue gerar uma mosaico com os diferentes tipos de vegetações, misturando a mais comum que é a caducifólia, seguida da xerófila e espinhosa (MARINHO, NASCIMENTO E SOARES 2015).

A maioria das espécies é destacada por inúmeras utilizações na medicina caseira e outras. Como exemplo, a aroeira, baraúna, angico, pelo alto teor de tanino; pau-ferro, marmeleiro, quebra-faca e outras. [...] Vale destacar que toda a diversidade de espécies do bioma poderia ser mais bem aproveitada economicamente, diante de estudos pormenorizados, especialmente explorando os princípios ativos de cada uma dessas espécies para a indústria farmacológica. (Marcos Antônio Drumond, EMBRAPA - Em entrevista à revista IHU, p.13 – 2012)

Por ser uma vegetação que vive sob constante estresse ambiental, destacando a falta de água, excesso de temperatura e luminosidade, acaba por desenvolver inúmeras respostas aos fatores citados (PIMENTEL, 2012). Tais mecanismo de defesa estão diretamente ligados a produção dos seus “princípios ativos” – utilizados na produção de medicamentos – tornando-se endêmicas, ou seja, não são encontradas em nenhum outro lugar no planeta. Deixando claro o valor incalculável desse patrimônio biológico.

A forma mais adequada para sua utilização na indústria farmacêutica se dá como resposta a estudos desenvolvidos por pesquisadores de diferentes especialidades,

como botânicos, farmacêuticos, químicos, médicos, entre outros, os quais, em conjunto, informarão desde uma segura identificação da espécie botânica, tipo e doses de substâncias, até formas de uso e/ ou aplicação. (Rejane Pimentel, UFPE - Em entrevista à revista IHU, p.19 – 2012).

3.5 Família *Cucurbitaceae*

A família *Cucurbitaceae* abrange aproximadamente 112 gêneros que juntos contabilizam mais de 900 espécies de plantas. O gênero é nativo americano e chama atenção para sua diversidade em morfologia/arquitetura da planta e frutos, sendo um dos mais diversos de todo reino vegetal (AMARO et al, 2016).

Todas as cucurbitáceas são sensíveis ao frio, as que se estendem a algumas regiões temperadas conseguem resistir e sobreviver graças a seus tubérculos subterrâneos (LIMA, 2010) o que limita sua distribuição geográfica. Por isso em sua grande maioria são habitantes natas do clima tropical. Se apresentam como trepadeiras herbáceas ou lenhosas, perenes ou anuais, e de forma bem rara como arbustos ou arvores.

Só no Brasil encontram-se 30 gêneros e 147 espécies, sendo 57 endêmicas. É uma família de grande uso popular, principalmente no Nordeste Brasileiro. Variando seu uso entre comercial/alimentício, ornamental e medicinal. Dois grandes exemplos são as abóboras (*C. moschata*) e as morangas (*C. máxima*) tendo em sua composição carboidratos, fibras alimentares, vitaminas do complexo B, carotenoides antioxidantes om ação provitamina A (AMARO et al, 2016).

O alto consumo alimentício da classe facilitou e favoreceu sua aplicação na medicina popular. Existindo alguns estudos etnobotânicos que comprovam o uso popular de diversas plantas da família *Cucurbitaceae* para tratar certas enfermidades, a exemplo, diarreia, inflamações, produção excessiva de muco, etc. *Cucurbita pepovar*, na medicina popular conhecida como abobrinha apresenta uma boa atividade antiparasitária. Na literatura aparecem ainda Silva et al, 2015 que relata o uso comum da *L. cylindrica* pela comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres-CE como potente antitérmico e analgésico. Já OYEMYEMI e BAKARE, 2013 estudaram a *L. cylindrica* e seu efeito anti-citogenetotóxico e tóxicos, na Nigéria onde é utilizada em tratamentos contra o câncer. No mesmo ano GUERRERO, OMAÑA E ACOSTA-RODRIGUES em 2013 avaliaram seus efeitos tóxicos, e concluíram que ela pode levar a um envenenamento severo, por vezes chegando ao óbito.

Um dos gêneros pertencentes a essa família é o *Apodanthera*, é encontrada em clima tropical e subtropical. No Brasil encontra-se 11 espécies desses gêneros – sendo 10 endêmicas

– e são divididas em duas seções *Apodanthera* e *Pseudoapodanthera*. Sendo o último endêmico da caatinga.

3.5.1 *Apodanthera congestiflora*

Apodanthera congestiflora é popularmente conhecida como cabeça de negro é endêmica do semiárido brasileiro, nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e também é encontrada no Sudeste em Minas Gerais (SILVA, 2015).

Ela aparece em diversos estudos etnobotânicos como SILVA, 2005; SILVA, 2012; COSTA, 2013; SILVA 2014; ROQUE, ROCHA E LOIOLA, 2010; COSTA E MARINHO, 2016; entre tantos outros. Demonstrando impacto na medicina popular e gerando curiosidade sobre seu perfil quimiotaxonômico – ainda com uma literatura escassa, quase nula –, por sugerir um bom potencial farmacológico e como completo a isso se faz necessário também um estudo toxicológico da planta (MEIADO, 2012).

Figura 1 - Espécie *Apodanthera congestiflora*



Fonte: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB17043>>.

Figura 2 - Detalhes *Apothantera congestiflora*



Fonte: <<http://www.bihrmann.com/caudiciforms/SUBS/apo-con-sub.asp>>.

3.6 Família Cactaceae

É uma família que possui ampla ocorrência, estando presente em uma variedade de habitats, desde de região úmidas até as áridas, devendo isso ao seu poder de adaptação (ALMEIDA,2016).

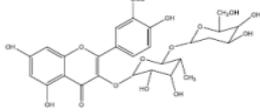
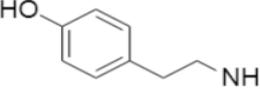
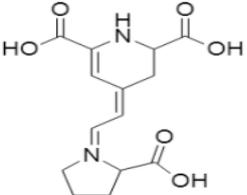
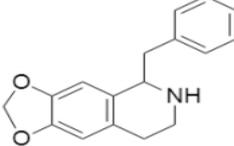
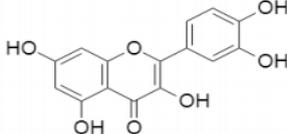
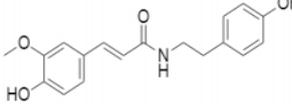
É composta por mais de 100 gêneros e quase 2000 espécies. No Brasil, ocorrem mais de 300 espécies, sendo destas 182 endêmicas (GONZAGA, 2014). E aproximadamente 58 estão na caatinga – sendo dessas 42 endêmicas – (SILVA, 2014). Entre os gêneros que mais se destacam pelo uso estão a *Melocactus sp* (Coroa de frade), *Tacinga sp* (palma) e *Cereus jamacaru* (mandacaru) (FERREIRA, 2014).

Elas possuem várias particularidades – geradas a partir um conjunto imenso de estratégias adaptativas e evolutivas –, como ampla variação anatômica e grande capacidade fisiológica de conservar/poupar água lhe conferindo um ótimo poder de adaptação (SILVA, 2014).

Tem grande destaque pelo seu uso na pecuária, e ornamentação. Mas de alguns anos para esse cenário vem mudando. Foram observadas outras formas de uso, como o medicinal por exemplo. Em algumas comunidades do sertão baiano e cariri paraibano é utilizada na medicina popular para tratar infecção e problemas na uretra (SILVA, 2014). E cada dia mais cresce no mundo dos cosméticos, nessas mesmas comunidades é rotineiro o uso de shampoo e sabão feitos a partir do *O. ficus* (forrageira) por exemplo (LUCENA, 2011).

Nesse rico e ainda pouco explorado mundo das cactáceas, existe muito a ser estudado. Acreditam ARRUDA, MELO-DE-PINNA, ALVES, 2005 e LUCENA, 2011 que existem potencialidades terapêuticas aguardando estudos etnobotânicos, quimiotaxonomicos, entre outros.

Tabela 1 - Plantas da família *Cactaceae* e suas principais características etnobotânicas e etnofarmacológicas.

Espécie	Parte	Uso popular	Atividade farmacológica	Constituintes químicos isolados	Estrutura química isolada
<i>Cereus fernambucensis</i> Lem	Raiz, cladódio	Vitiligo	Antioxidante, anti-inflamatório	Isoramnetina-3-O- rubinosídeo, isoramnetina-3-O-raminosídeo (SOUZA, 2013)	 Isoramnetina-3-O-rubinosídeo (flavonoide).
<i>Cereus jamacaru</i> DC	Raiz, cladódio	Anti-inflamatório e problemas renais, tosse, bronquites, úlceras, Antioxidante, antitumoral.	Antibacteriano	Tiramina e <i>N</i> -metiltiramina, β -sitosterol, hordenina, camferol (BURRET et. al., 1982; DAVET, 2005)	 Tiramina (alcaloide)
<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	Cladódio, flor	Alimentícia, analgésica, anti-inflamatória, afecções respiratórias, hipoglicemiante	Antioxidante, Antiulcerogênica, analgésica, hepatoprotetora e anti-inflamatórias	Indicaxantina, isoramnetina Camferol, Quercetina, Isorhamnetina 3-O-rubinosídeo, Isorhamnetina 3-O-galactosídeo, 3-Oramnósido, miricetina e vitexina. (MARTINS, 2011)	 Indicaxantina (alcaloide)
<i>Opuntia monacantha</i> Haw	Cladódio	Decorativa	Antitumoral, antioxidante	Camferol, isoramnetina, Benzilisoquinolina (VALENTE et al. 2010, NASEER, et al. 2015)	 Benzilisoquinolona (alcaloide)
<i>Pilocereus arrabidae</i> B.	Frutos	Alimentícia	Tripanomicida	Alcaloides feniletilamínicos quercetina, rutina, catequina, dihidrocamferol, isorhamnetina (DAVET, 2005; VALENTE et al. 1998; GONÇALVES, 2015)	 Quercetina (flavonoide)
<i>Tacinga inamoena</i>	Raiz	Inflamação na Uretra	-	β -Sitosterol-3-O-glicosídeo, <i>N-trans</i> -feruloyl 4-O-metildopamina, <i>N-cis</i> -feruloyl 4-O-metildopamina, <i>N-trans</i> -feruloyl tiramina e <i>N-cis</i> -feruloyl tiramina. (E SILVA, 2016)	 <i>N-trans</i> -feruloyl tiramina

Fonte: Dissertação de mestrado. PEIXOTO, 2018, p. 36 e 37.

3.6.1 *Tacinga palmadora*

Tacinga palmadora é um cacto endêmico da Caatinga, sendo conhecido popularmente como palmatória ou quipá-de-espinho. Aparece com frequência em áreas próximas ao Rio São Francisco, sendo até 2012 registradas 250 populações distribuídas em áreas da Caatinga do nordeste Brasileiro (estando presente em 8 estados, com exceção apenas do Maranhão) (MEIADO, 2012).

É um cacto da subfamília Opuntioidea com hábito arbustivo que pode chegar a atingir 2m de altura e ocorrer com frequência em substratos arenosos profundos (MEIADO, 2012). Curiosamente contraria a maioria dos cactos e floresce na estação da seca, beija-flores polinizam suas flores diurnas. Frutifica em várias épocas do ano, principalmente de fevereiro a maio.

Tem uma média de produção de 25 sementes por fruto e essas sementes são chamadas de afotoblásticas, pois conseguem germinar sem a necessidade de luz. Esses frutos também possuem a capacidade de se diferenciar e produzir novos ramos de pequeno tamanho a partir da reprodução assexuada.

Segundo Meiado, 2012 a *T. palmadora* encontra-se na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de Extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza na categoria pouco preocupante (LC), e está configurado na lista da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e da Flora Silvestres (CITES).

Figura 3 - Tacinga palmadora (Britton & Rose) N.P.Taylor & Stuppy



Fonte: Maia-Silva, C. et. al. Guia de Plantas Visitadas por Abelhas na Caatinga. Fundação Brasil Cidadão, 2012.

3.7 Teste *in vitro*

3.7.1 Citotoxicidade

O uso de plantas medicinais e seus produtos podem manifestar um efeito indesejado/tóxico levando a um quadro clínico severo e podem inclusive levar a óbito, tornando-se um grande problema (FREITAS et al, 2014).

Segundo NARDONE (1997) quando existe um conjunto de alterações da homeostase celular que interfere na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência e reprodução, causando assim uma série de modificações, podemos nomeá-lo de citotoxicidade.

Diante do que foi dito torna-se não só importante como exigido, que os programas que envolvem desenvolvimento de fármacos desenvolvam além das pesquisas das atividades biológicas, os estudos de citotoxicidade dos mesmos. Aliando sempre seu potencial terapêutico a sua segurança (FRÖHNER, 2003).

Estudos toxicológicos *in vitro* são uma potente ferramenta na busca de plantas que podem possuir efeitos tóxicos, seguindo o princípio dos 3 “erres” (*reduction, refinement e replacement*) - redução, refinamento e substituição (RANGEL, 2018).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são primordiais para verificar a toxicidade de novos compostos em seu estágio basal/inicial, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto em causar alterações e morte celular, como consequência de dano das funções celulares (FRÖHNER, 2003), encontrando também o intervalo de concentração no qual o agente tóxico atua. Observando que os testes *in vitro* apresentam grande vantagem em relação aos teste *in vivo* como, custo reduzido, maior controle de variáveis do experimento e maior rapidez na obtenção de resultados (FERREIRA, 2014), estes passam a direcionar os testes *in vivo*, direcionando quase que precisamente a CL50 por exemplo, demonstrando sua grande reprodutibilidade (FRÖHNER, 2003).

3.7.2 Toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS)

Como já foi dito, tornou-se rotina de grandes e pequenos laboratórios de produtos naturais inserirem práticas de isolamento, purificação e elucidação estrutural aliadas a diversos ensaios biológicos simples, no intuito de monitorar os estudos fitoquímicos na procura por substâncias bioativas, para uma posterior seleção. Entre esses bioensaios encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS), destaca-se por ter baixo custo, rápida e fácil execução (SIQUEIRA et al, 1998).

Figura 4 - *Artemia Salina Leach*



Fonte: PEIXOTO, 2018, p 37.

Artemia salina, *Cristacea* ou *anostraca* (Figura 4) é um microcústáceo de água salgada. De tamanho e colorações variadas, partindo do rosa-pálido até o avermelhado, branco ou esverdeado, a depender da sua alimentação (NASCIMENTO et al., 2008).

Seu ciclo de vida tem início a partir da eclosão dos cistos dormentes, os quais são embriões encapsulado com metabolismo inativo. Esses cistos resistem nesse estado de dormência por anos, contanto que em lugar seco, já que se entrarem em contato com a água salgada retomam seu desenvolvimento (BORTOLOTTI, 2007). Essa sua capacidade de formar cistos dormentes, resulta em um material biológico que pode ser armazenado durante longo período de tempo sem perdas de viabilidade e sem necessidade de se manterem culturas contínuas, tornando-se de custo econômico nas pesquisas (SILVA et al, 2015) (RUIZ et al., 2005). Ela apresenta dimorfismo sexual e atinge a sua vida adulta com 20 dias em média (NASCIMENTO et al., 2008). É utilizada como alimento vivo para peixes e tem seus ovos facilmente encontrados em lojas aquaristas.

Os ensaios de letalidade em organismo simples são citados com frequência na literatura (SILVA et al, 2015). A simplicidade do bioensaio com TAS favorece sua utilização rotineira, podendo inclusive ser desenvolvido no próprio laboratório de fotoquímica (SIQUEIRA et al, 1998).

Um dos principais motivos pelo TAS ser considerado até os dias atuais um bom indicador de toxicidade – além de vantagens já citadas como custo reduzido, não necessita de equipamentos robustos, e fácil manipulação – é seu específico grau de tolerância a um determinado fator ambiental, apresentando respostas nítidas a pequenas variações no ambiente (RUIZ et al., 2005). Apresentando assim diversos fatores para serem utilizados em análises

preliminares de toxicidade, definindo o limite de concentração para testes *in vitro* posteriores e mais aprofundados, e também para fornecendo informações significativas sobre outros parâmetros a serem pesquisados (EISENBRAND et al., 2002).

3.7.3 Atividade antimicrobiana

As doenças infecciosas são provocadas pela invasão de microrganismos patógenos que contornam as defesas do organismo hospedeiro e provocam danos aos tecidos (GUIDO, 2010). Como forma de combate a essas doenças foram desenvolvidos os antimicrobianos, que são drogas que possuem a capacidade de interferir de diferentes maneiras nas atividades das células bacterianas, podendo por exemplo inibir seu crescimento, causar lise, entre outros (UGRINOVICH, 2017).

As doenças infecciosas ocupam o terceiro lugar nas causas de mortalidade mundial (OMS, 2017). E em virtude dos impactos e malefícios que geram a sociedade são consideradas um grave problema de saúde coletiva. Esses dados quando atrelado às altas taxas de resistência de microrganismos – especialmente a hospitalar – justifica a urgência no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (UGRINOVICH, 2017).

A frequência com que as infecções ocorrem na população faz com que o uso de antibióticos se torne corriqueiro, o que tem provocado problemas como desequilíbrio da microbiota humana e – o seu uso indiscriminado – a resistência microbiana (CATÃO et al. 2006), que ocorre através da transferência de genes resistentes à outras que nunca foram expostas a tal antibiótico (ANDRADE et al. 2012).

O desenvolvimento de qualquer novo antibiótico vem acompanhado dessa possibilidade de resistência de microrganismos, criando assim uma corrida científica, cada dia maior, na busca por novas substâncias com ação antimicrobiana ou que apresente algum sinergismo quando aliadas a outras substâncias já conhecidas. A evolução dessas pesquisas é uma urgência, já que desde o início dos anos 80 o número de antimicrobianos em fase de desenvolvimento diminuiu consideravelmente, enquanto em contrapartida, a resistência microbiana cresce exponencialmente (CATÃO et al. 2006).

O avanço de terapias adjuvantes que atenuem a ação microbiana torna-se de extrema importância, pois contribui no controle das doenças que afetam a consideravelmente a população mundial (SOUZA, 2015). Um dos interesses como terapia complementar são as plantas medicinais, que vem aumentando o seu uso em terapias modernas consideravelmente,

((UGRINOVICH, 2017)) demonstrando sua relevância nos estudos de novos extratos com atividade antimicrobiana, com finalidade de se obter-se novos compostos com maior espectro de ação, um menor custo, menor toxicidade e primordialmente um baixo índice de resistência (MEDONÇA; CARNEIRO; OLIVEIRA, 2018).

O padrão de avaliação da atividade antimicrobiana em extratos vegetais é determinado através da menor quantidade da substância em estudo necessária para inibir o crescimento do microrganismo de escolha utilizado no teste. Os métodos atualmente mais utilizados são: o método de macrodiluição, de microdiluição e de difusão em ágar (MEDONÇA; CANEIRO; OLIVEIRA, 2018) (OSTROSKY et al., 2008).

O método de microdiluição é aplicado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Ele consiste na distribuição uniforme de pequeno volume de caldo em uma microplaca (estéril), a qual contém poços de fundos redondos ou cônicos. Segundo ALVES (2008) a CIM é obtida através da menor concentração do agente microbiano escolhido, visto a olho nu ou com auxílio de aparelhos como o leitor de elisa, capaz de inibir o crescimento microbiano. Esse crescimento ou a ausência dele deve ser sempre comparada com a dos poços do controle (são os poços isentos da adição de microrganismo).

4. METODOLOGIA

4.1 Ensaio toxicológico com *Artemia Salina* (TAS)

O ensaio toxicológico sobre *A. Salina* (TAS) foi baseado na técnica descrita por Meyer e colaboradores (1982).

Já obtido os extratos de ambas as plantas e suas frações procedeu-se com a implantação e padronização da metodologia adotada. Com a *Tacinga palmadora* foram utilizadas quatro frações dos extratos, sendo elas hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), diclorometano (CH_2Cl_2), Acetato de etila ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), e etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). Já com a *Apodanthera congestiflora* foram utilizadas duas frações do extrato, respectivamente Acetato de etila ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) e Fase Aquosa Nebulizada.

Para início do experimento preparou-se a solução salina, solubilizando 19,5g de sal marinho e 0,5 litros de água destilada. Em sequência mediu-se o pH da solução utilizando um pHmetro digital, obtendo uma solução com pH dentro da faixa limite ideal para eclosão dos cistos, compreendido entre 8,0 a 8,5. Essa solução foi transferida para um recipiente de vidro (Figura 5) — que exerceu a função de incubadora — dimensões de 15cmx12,5x9cm e posteriormente foi colocado em apenas um dos lados, os cistos de *A. salina*. A parte do sistema contendo os cistos ficou 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 à divisória (também feita de acetato, contendo pequeno furos que permitem a passagem das larvas e impedem a passagem dos cistos).

Após 24 horas, em temperaturas compreendidas entre 22° C – 29° C e sob iluminação de uma lâmpada incandescente (40 W), os cistos eclodiram (Figura 6).

Figura 5 - Incubadora com cistos de *A. salina*



Fonte: Arquivo do autor, 2017.

Figura 6 - Cistos de *A. salina* sob 24h de exposição a luz incandescente (40w).



Fonte: Arquivo do autor, 2017.

Em um béquer pesou-se 0,02g do do extrato FH-Tp que necessitou de 40 μL de Tween® para ter sua solubilização completa, em 5ml de solução salina, obtendo-se assim a solução mãe. A solução mãe teve então sua concentração calculada através da formula $C = m/v$, resultando em $0,0039\text{g/ml}^{-1}$.

Em cada tubo de ensaio de ensaio foram adicionados 5ml de SS e 640, 1280, 2560, 5120 e 10240 μ L da solução mãe. Feita a solubilização das concentrações, foram introduzidas 10 artemias que foram coletadas com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*. Cada concentração foi feita em triplicata e repetida em três experimentos.

As soluções permaneceram em incubação bob luz artificial por 24h, decorrido o tempo, foram feitas as contagens do número de larvas vivas e mortas em cada tubo para determinação da CL 50% (concentração que produz 50 % de letalidade).

O mesmo procedimento e volume de solvente foram utilizados para todas as outras três frações restantes (FAC-Tp, FDM-Tp, FET-Tp) dos extratos de *Tacinga palmadora*.

O mesmo procedimento foi realizado para os extratos da *Apodanthera congestiflora*, (FAC-Ac, EAN-Ac) tendo como diferença apenas o uso do solvente. O solvente utilizado para os EAc foi o Chemophor, utilizando o volume de 40 μ L, obedecendo assim os mesmos valores para o cálculo de concentração.

Os valores de CL50 foram calculados a partir do número de larvas viva e mortas transformado em percentagem e em seguida determinada graficamente a partir das curvas de concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95% com o uso do programa “*Graph Pad Prism*”.

4.2 Citotoxicidade por Hemólise

Esse procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UEPB (Certificado/CEP/UEPB N°. 42778115.7.000.5187) (Título – “Atividade citotóxica dos extratos vegetais e metabólitos secundários isolados de espécies da caatinga”).

Os ensaios foram realizados conforme a metodologia descrita por SILVA, ALVES E MAIA (2012) contendo algumas adaptações.

Sangue do tipo A +, B+ e O + foram colocados em tubos com EDTA. Em seguida foram para centrifuga a 2500 rpm por 5 minutos para o plasma poder ser retirado. Formada a suspensão de hemácias, essa foi lavada com SS a 1% três vezes, a 2500 rpm por 5 minutos.

As hemácias foram ressuspensas com a mesma solução e teve seu volume ajustado para 5%. Dando continuidade ao experimento foi adicionado em um tubo 1 ml da suspensão de hemácias a 5% e 1 ml das soluções testes. Para os extratos de *A. congestiflora* (FAC-Ac e EAN

– Ac) e *T. palmorada* (FAC-Tp;FDM-Tp;FET-Tp) foram usadas as concentrações de 1, 2,5 e 5mg/ml⁻¹. Realizada a combinação, aguardou-se 1 hora para que ocorra o processo de hemólise.

Decorrido o tempo necessário, cada tubo foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, retirando-se o sobrenadante para leitura em espectrofotômetro *Biosystems* BTS-310 no comprimento de onda de 540 nm.

Como controle negativo foi utilizada SS a 1% e para o controle positivo Triton-X.

A análise foi realizada em triplicata e o cálculo utilizado na determinação do potencial hemolisante foi realizado por meio da equação abaixo:

$$PH = \frac{Ae - Ab}{Acp} * 100$$

Onde,

PH = Potencial hemolisante;

Ar = Absorbância do extrato;

Ab = Absorbância do branco;

Acp = Absorbância do controle positivo (Triton-X)

4.3 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Foram escolhidas três cepas de bactérias e três cepas de fungos para realização dos testes com os extratos: FAC-Tp, FH-Tp, FDM-Tp, FET-Tp, FET-Ac, FH-Ac, FAC-Ac.

4.3.1 Cepas escolhidas

As linhagens bacterianas e fúngicas foram provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 76645, *Candida krusei* ATCC 14243 e *Candida tropicalis* ATCC 13803.

4.3.2.1 Reativação das bactérias

As bactérias foram reativadas através da imersão em caldo BHI, em temperatura ambiente. Após 24hrs confirmado o seu crescimento, será feita a semeadura em placas com Ágar Mueller-Hinton (AMH), foram incubadas a 36°C, aguardando aproximadamente 24hrs para seu crescimento.

4.3.2 Reativação das Cândidas

As Cândidas foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e encubadas por aproximadamente 48hrs entre 26 e 28°C.

4.3.3 Preparo do inóculo

Depois de semeada, a placa apresentou crescimento de colônias isoladas e sem visível contaminação.

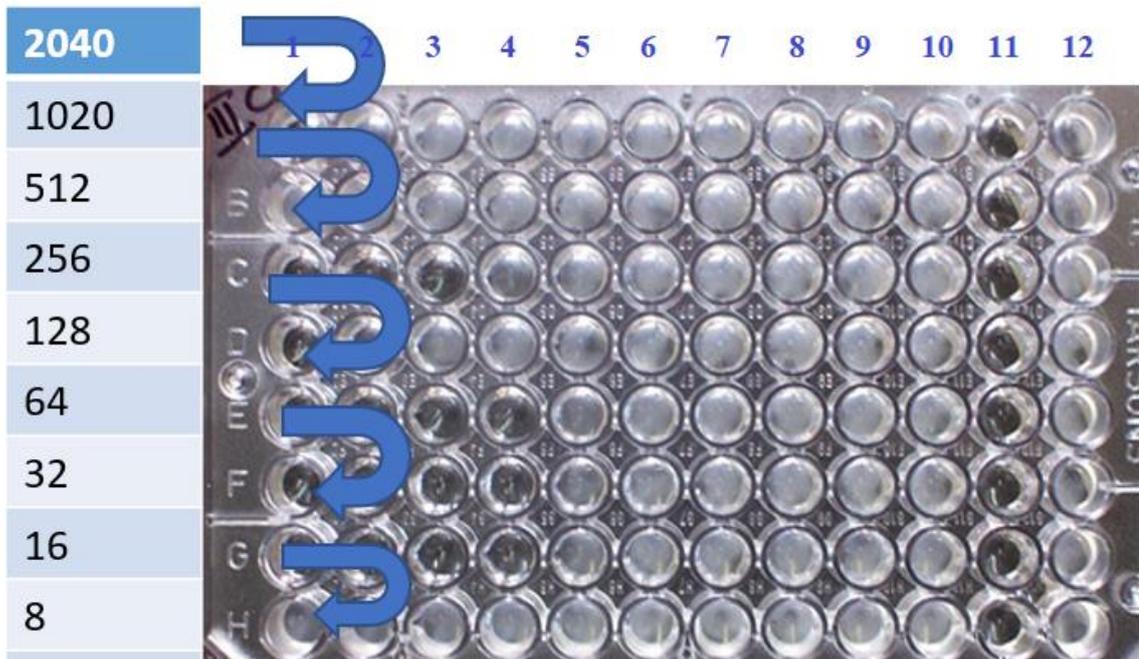
Então foi retida uma alíquota para preparação do inóculo, que se deu através da suspensão dessa alíquota em solução salina a 0,9% (p:v). Atingindo a turvação adequada a olho nu (escala de *McFarlan*), foi lida no espectrofotômetro (a 625nm para bactérias e 530nm para fungos) para confirmação da concentração de micro-organismos.

4.4 Execução do teste seguindo a metodologia do CLSI (2003)

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos citados anteriormente foi empregado o método da microdiluição em placa.

Utilizou-se o caldo BHI (*brain heart infusion*), para as cepas bacterianas e caldo Sabouraud para as Cândidas. Em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em forma de “U”, providas de tampa e estéreis, distribuiu-se asépticamente, 100 µL do caldo correspondente em cada poço.

O volume dos extratos utilizados foi de 100 µl, com uma concentração inicial de 1020 µg/mL que foi padronizada para todos os extratos e seguindo a metodologia do CLSI (2003, Vol. 23) foi diluída sucessivamente da **linha A** a **linha H** (Figura 8), da coluna de 1 a 12.

Figura 7 - Diluição sucessiva dos extratos

Fonte: Própria, (2017).

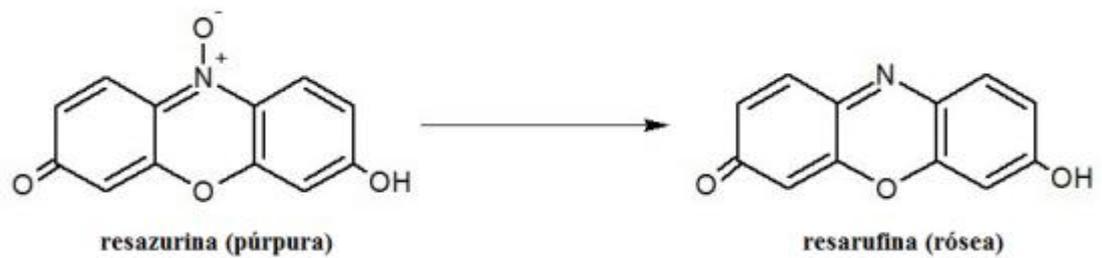
Após as diluições sucessivas foi posto 10 µl do inóculo em todos os poços contidos entre as colunas de 1 a 11. Na coluna 10 foi feito o controle com o tensoativo Cremophor + caldo BHI. Na coluna 11 foi feito o controle positivo com caldo BHI + bactéria + antibiótico na coluna 12 foi feito o controle de esterilidade do meio, contendo apenas o caldo BHI (Figura 9).

A organização dos extratos dispostos na microplaca mostrado na figura 10, foi aplicada em todos os outros extratos.

Preparadas todas microplacas em triplicata, essas seguiram para incubação a 37°C por 24h. Decorrido o tempo, foram aplicados 20 µl do corante resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01 %, com nova incubação a 37 °C durante 2 h. Cessado o tempo de repouso foi efetuada a leitura observada através da mudança de coloração dos poços de azul (sem crescimento bacteriano) para rosa (indica crescimento bacteriano).

O mecanismo de mudança de cor desse corante se baseia na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea) como mostrado na Figura 9.

Figura 8 - Reação de oxirredução da resazurina

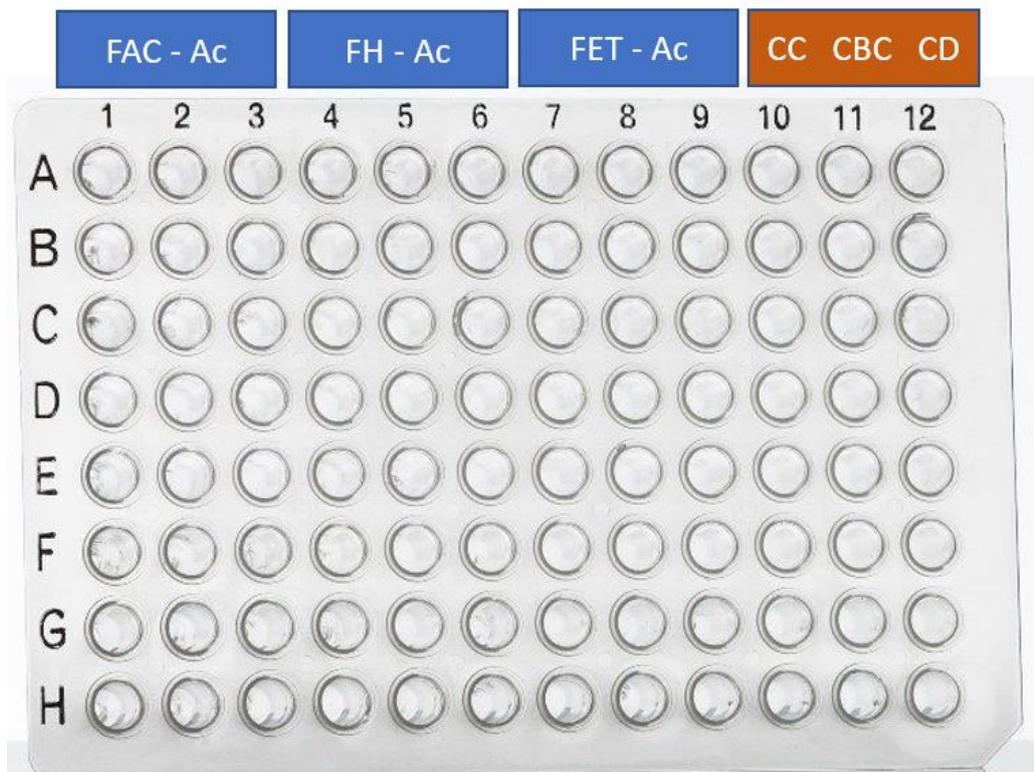


Fonte: ROZATTO, 2012. p41.

Todo procedimento listado e detalhado acima foi efetuado para as cepas fúngicas, aplicando algumas modificações como: tempo de incubação que foi de 48h, temperatura de incubação que ficou entre 26°C e 28°C e o Caldo utilizado que foi o Sabouraud.

A CIM foi calculada pela moda dos resultados. O antibiótico utilizado no controle positivo para teste com cepas bacterianas foi a gentamicina, a uma concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para cepas fúngica, a nistatina, a uma concentração inicial de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 9 - Organização de extratos na microplaca.



Fonte: Própria, (2017)

4.5 Screening fitoquímico qualitativo

4.5.1 Prospecção química do Extrato bruto

Todos os testes foram realizados em triplicata e seguiram as condições estabelecidas no Manual para Análise Fitoquímica e Cromatografia de Extratos Vegetais (BARBOSA et al, 2001) e (COSTA, 2010) como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Pesquisa por metabólitos secundários da *T. palmadora* e *A. congestiflora*.

GRUPO QUÍMICO	TESTE APLICADO
Alcaloides	Dragendorff; Mayer; Bouchardat; ácido sílico-tungstico.
Flavonoides	Shinoda; oxalo-bórico
Esteroides	Liebermann-Buchard
Taninos	FeCl ₃ a 2%.
Saponinas	Teste de espuma
Polissacarídeo	Solução de Lugol

Fonte: Própria, (2017)

A prospecção química do extrato bruto foi realizada com a finalidade de identificar a presença de classes de metabólitos secundários na espécie em estudo. Dessa forma, serão realizados testes para: saponinas, ácidos orgânicos, polissacarídeos, fenóis e taninos, flavonóides gerais, alcalóides, esteróides, triterpenóides.

4.5.2 O procedimento experimental

4.5.2.1 Testes que utilizam como solvente água destilada

Foram preparadas soluções-mãe com extrato bruto de *A. congestiflora* e *T. palmadora*, para realizar os testes que utilizam água destilada como solvente. Para isso, foi pesados 140 mg

de cada EB e dissolvidos em 28 mL de água destilada. Em seguida estas soluções foram levadas ao banho de ultrassom a fim de dissolver todo soluto. Posteriormente, a solução foi filtrada, reservando o filtrado e obtendo-se a solução-mãe.

- Saponinas espumílicas

Transferidos 5 mL da solução-mãe para os tubos de ensaio (triplicata), sendo diluídos em 15 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi agitada vigorosamente por 2 minutos em tubo fechado. Se a camada de espuma permanece estável por mais de meia hora, o resultado é considerado positivo.

- Polissacarídeos

Foram transferidos 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio, adicionado de 2 gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul indica resultado positivo, presença de polissacarídeos.

- Fenóis e taninos

Foram transferidos 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio, adicionado de 2 gotas de solução alcoólica de FeCl₃ a 1%. Onde qualquer mudança na coloração, ou possível formação de um precipitado, indica uma reação positiva, devendo ser comparado com o branco (solvente+reativo).

Uma coloração inicial entre o azul e o vermelho é indicativa da presença de fenóis. Precipitado tonalidade azul marinho/escuro indica presença de taninos pirogálicos, e verde, presença de taninos catéquicos.

4.5.2.2 Testes que utilizam como solvente metanol

Foram preparadas soluções-mãe com extrato bruto de *A. congestiflora* e *T. palmadora*, para realização dos testes que utilizam metanol como solvente. Iniciando o procedimento, pesou-se 120 mg de EB e dissolvidos em 24 ml de metanol. Em seguida esta solução foi levada ao banho de ultrassom a fim de que todo soluto se dissolva. Posteriormente, a solução foi filtrada reservando o filtrado.

- Flavonóides

Transferidos 10 mL da solução-mãe para os tubos de ensaios (triplicata), em que se adicionou 5 gotas de HCl concentrado. O surgimento de uma coloração rósea indica, presença de flavonoides.

4.5.2.3 Testes que utilizam como solvente clorofórmio

Foram preparadas soluções-mãe com extrato bruto de *A. congestiflora* e *T. palmadora*, para realizar os testes que utilizam clorofórmio como solvente. Sendo necessária a pesagem de 75 mg dos EB para ser dissolvidos em 15 mL de clorofórmio. Em seguida esta solução foi levada ao banho de ultrassom a fim de dissolver todo soluto. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro.

- Esteróides e triterpenóides

10 ml da solução-mãe foram filtrados sobre carvão ativado (triplicata). O filtrado foi transferido para um tubo de ensaio completamente seco, adicionado 1 mL de anidrido acético e agitado, com cuidado. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de H₂SO₄ concentrado e novamente agitado. O rápido desenvolvimento de cores que vão do azul ao verde indicam resultado positivo.

4.5.2.4 Outros testes realizados

- Alcalóides

25 mg do extrato bruto de *A. congestiflora* e *T. palmadora* foram dissolvidos em 5 mL de solução de HCl 5% e em seguida filtrados. Separadas quatro porções de 1 mL em cada tubo e adicionado em cada um gotas dos reativos de Bouchard, Dragendorff, Mayer e Bertrand. Precipitação ou turvação em pelo menos um é indicativa de resultado positivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TAS

Esta é a primeira vez em que os extratos obtidos de *A. congestiflora* e *T. Palmadora* são submetidos a ensaios toxicológicos *in vitro*, mesmo que a primeira seja conhecida popularmente como potencialmente tóxica.

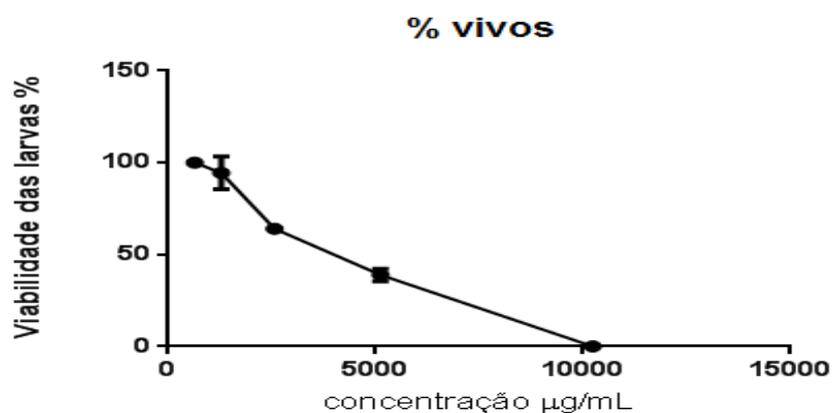
O TAS foi utilizado para prever (e selecionar exclusivamente no caso da *T. palmadora*) a atividade citotóxica dos extratos FAC-Ac, EAN-Ac, FAC-Tp, FH-Tp, FDM-Tp, FET-Tp.

Os valores de CL_{50} foram calculados e determinados graficamente através da curva de concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

Os controles tanto com SS como os solventes apresentaram uma taxa de sobrevivência entre 90 a 94% demonstrando que os solventes ou as condições ambientais não tiveram relação com a causa morte dos organismos.

O Gráfico 1 demonstra o valor da CL_{50} para o extrato FH-Tp, de 7141 (1394 – 36579) $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

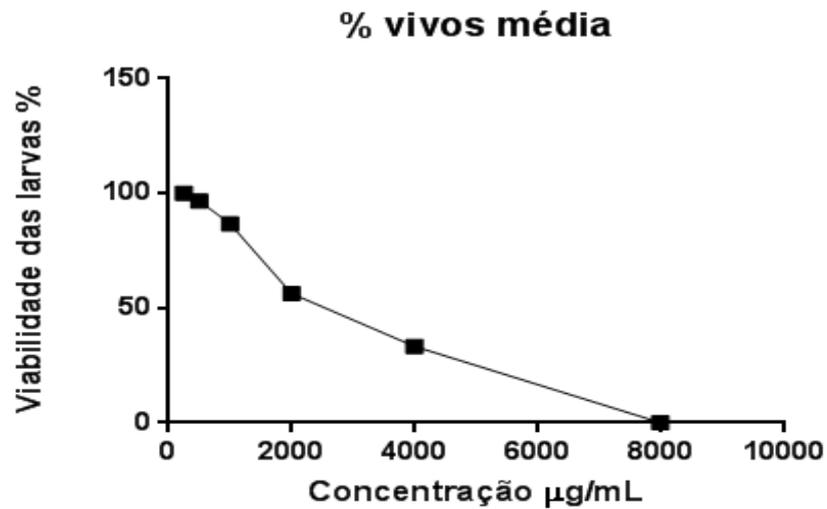
Gráfico 1 - Concentração letal média (CL_{50}) do extrato hexano da raiz de *T. palmadora*.



Fonte: Própria, 2017. (*Graph Pad Prism*).

O extrato FDM-Tp, apresenta uma CL_{50} de 3719 (2400 – 5763) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ como apresentado o Gráfico 2.

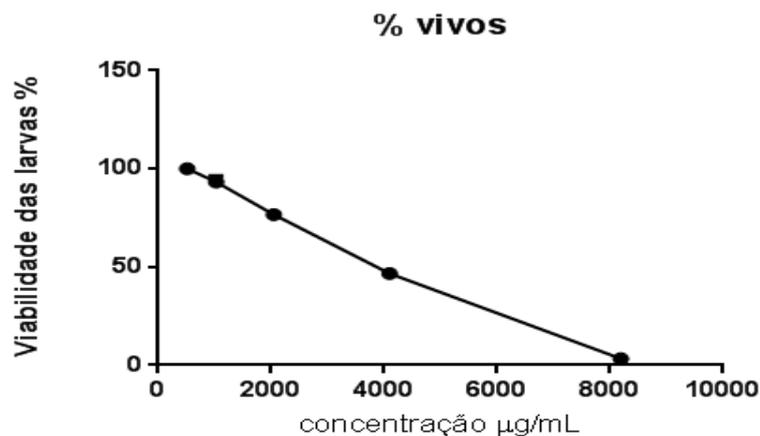
Gráfico 2 - Concentração letal média (CL_{50}) do extrato diclorometano da raiz de *T. palmadora*.



Fonte: Própria, 2017. (Graph Pad Prism).

O extrato FAC-Tp, apresenta uma CL_{50} de 7730 (3376 – 17698) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, como apresentado no Gráfico 3.

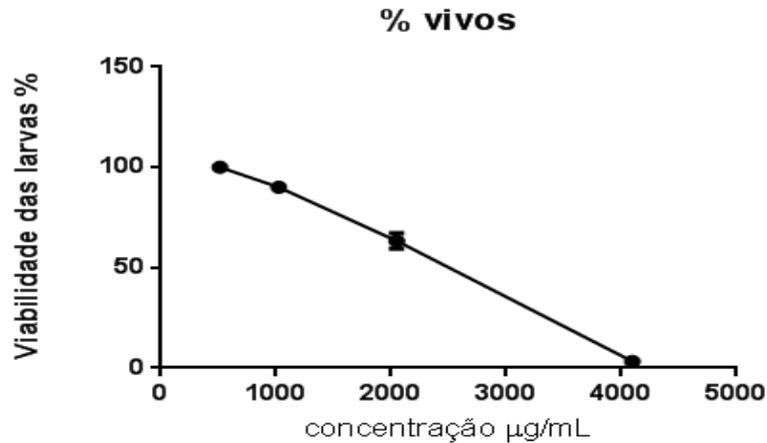
Gráfico 3 - Concentração letal média (CL_{50}) do extrato Acetato da raiz de *T. palmadora*.



Fonte: Própria, 2017. (Graph Pad Prism).

O extrato FET-Tp, apresenta uma CL_{50} de 7726 (Não mensurado) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, como demonstra o Gráfico 4.

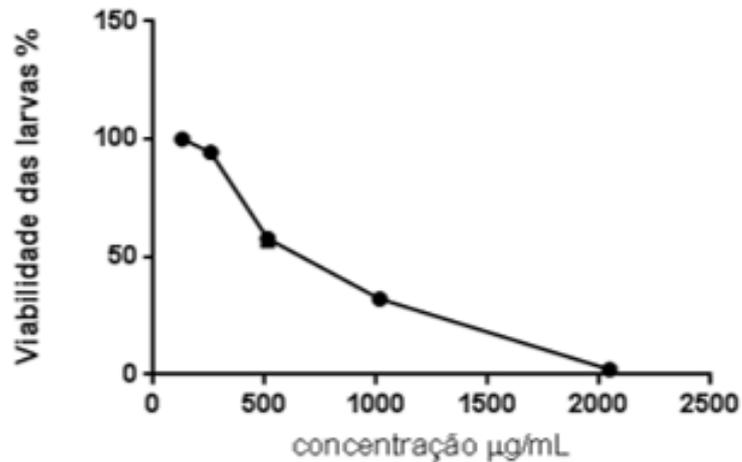
Gráfico 4 - Concentração letal média (CL_{50}) do extrato Etanoico da raiz de *T. palmadora*.



Fonte: Própria, 2017. (Graph Pad Prism).

O extrato FAC-Ac, apresenta uma CL_{50} de 705,6 (529,1 – 941,0) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, como demonstra o Gráfico 4.

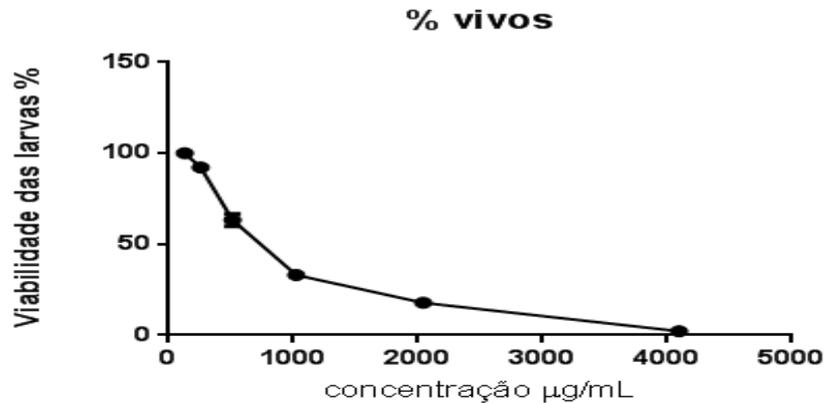
Gráfico 5 - Concentração letal média (CL_{50}) do extrato Acetato de *A. Congestiflora*.



Fonte: Própria, 2017. (Graph Pad Prism).

O extrato ENA-Ac, apresenta uma CL_{50} de 651,4 (555,2 – 764,2) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, como demonstra o Gráfico 5.

Gráfico 6 - Concentração letal média (CL_{50}) do extrato Nebulizado de *A. congestiflora*.



Fonte: Própria, 2017. (Graph Pad Prism).

A CL_{50} é determinada através da relação entre náuplios vivos e mortos em cada concentração, fornecendo assim o índice de toxicidade da substância em estudo. Segundo Souza et al. (2015) resultados que se encontram menores de que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados substâncias altamente tóxicas, entre 100 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ possuem toxicidade moderada e quando acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ representam baixíssimo índice tóxico ou são atóxicas.

Os dois extratos alcançados a partir da *A. congestiflora* exibiram uma toxicidade moderada, apresentando $500 < CL_{50} < 1000$, confirmando em parte o que é manifestado popularmente. O extrato EAN-Ac teve uma toxicidade mais baixa quando comparado ao FAC-Ac.

Já todos extratos obtidos da *T. palmadora* tiveram seu índice de toxicidade pouco relevante, apresentando uma $CL_{50} > 1000$ a partir desse método.

Mas o TAS não nos confere plena certeza sobre a segurança da substância. A toxicidade pode estar relacionada com outros fatores não detectados por esse método, tais como, compostos termo ou fotossensíveis (SOUZA et.al., 2015).

Em conclusão, os métodos in vitro são válidos pois implantam um meio alternativo ao uso de animais, sendo empregados na pré-seleção de substâncias com intenção de reduzir a população necessária para o teste, confirmando-os ou por vezes até substituindo-os.

5.2 Citotoxicidade em Hritrócitos (HEMÓLISE)

As tabelas abaixo exibem os resultados obtidos através do percentual médio de hemólise, para cada extrato testado.

Tabela 3 - Percentual hemolítico do extrato FAC-Ac.

Perct. Médio de Hemólise ABO [] (%)	Concentrações		
	1 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml
A +	6,42	9,87	9,76
B +	8,83	11,62	15,62
O +	6,60	8,49	13,47

Fonte: Própria, 2017.

Tabela 4 - Percentual hemolítico do extrato EAN-Ac.

Perct. Médio de Hemólise ABO [] (%)	Concentrações		
	1 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml
A +	1,49	7,24	3,03
B +	4,21	7,49	7,52
O +	1,85	7,03	4,33

Fonte: Própria, 2017.

Tabela 5 - Percentual hemolítico do extrato FAC-Tp.

Perct. Médio de Hemólise ABO [] (%)	Concentrações		
	1 mg ml ⁻¹	2,5 mg ml ⁻¹	5 mg ml ⁻¹
A +	10,13	16,83	26,26
B +	10,34	17,96	19,57
O +	11,89	22,56	31,90

Fonte: Própria, 2017.

Tabela 6 - Percentual hemolítico do extrato FET-Tp.

Perct. Médio de Hemólise ABO [] (%)	Concentrações		
	1 mg ml ⁻¹	2,5 mg ml ⁻¹	5 mg ml ⁻¹
A +	1,11	1,67	3,48
B +	0,31	1,19	2,82
O +	1,84	2,99	7,63

Fonte: Própria, 2017.

Tabela 7 - Percentual hemolítico do extrato FDM-Tp.

Perct. Médio de Hemólise ABO [] (%)	Concentrações		
	1 mg ml ⁻¹	2,5 mg ml ⁻¹	5 mg ml ⁻¹
A +	30,99	71,26	113,82
B +	35,65	90,35	123,51
O +	27,85	68,72	109,70

Fonte: Própria, 2017.

A hemólise é definida pela destruição dos glóbulos vermelhos por rompimento da membrana e conseqüentemente liberação da hemoglobina. Essa quando livre causa danos graves e por vezes irreversíveis a órgãos vitais (PEREIRA, 2017).

As glicosiltransferases são enzimas que catalisam as reações de entre o açúcar (receptor) e o substrato (aceptor). O tipo A possui a transferase A, o tipo B a transferase B, e o tipo AB possui as transferases A e B, já o grupo O não possui as transferases A e B, mas apresenta o antígeno H em grande quantidade na superfície das hemácias (BATISSOCO E NOVARETTI, 2003) fazendo assim necessário o teste de hemólise englobando todo sistema ABO.

A técnica que permite a medição da hemólise é realizada através da quantificação da absorbância, em ultravioleta, do lavado de hemácias em contato com a substância em estudo. Essa metodologia é recomendada pela ANVISA.

Segundo ESPITIA-BAENA (2014) porcentagens de hemólise abaixo de 10% não possuem efeito hemolítico notável. Diante dessa afirmação nota-se que os valores encontrados para ambos extratos de *A. congestiflora* estão inseridos abaixo do limite citado, não possuindo assim atividade hemolítica considerável.

Apesar da *A. congestiflora* ter apresentado resultado positivo quando feita a pesquisa por saponinas, é provável que os seus bons resultados estejam relacionados com a baixa concentração desse metabolito, não apresentando assim uma atividade hemolítica significativa.

O mesmo não acontece para os extratos obtidos a partir da *T. palmadora*. Demonstrando uma atividade hemolítica importante na fração diclorometano-FDM-Tp (CH_2Cl_2), resultando em extremo dano e risco ao organismo em fosse administrado. O extrato FET-Tp apresentou um bom quadro geral, mantendo-se abaixo do limite de 10% não possuindo assim atividade hemolítica considerável. E o FAC-Tp teve sua atividade hemolítica variando entre discreta (abaixo 20%) e moderada.

5.3 Atividade Antimicrobiana *in vitro*

Os valores para CIM obtidos nos ensaios microbiológicos com cepas bacterianas para *T. palmadora* estão expostos na Tabela 8 e para *A. cogestiflora* na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *T. palmadora* em cepas bacterianas.

Amostras testadas (Frações)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	Micro-organismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
FAC-Tp	-	-	-
FDM-Tp	-	-	-
FET-Tp	-	-	-
FH-Tp	-	-	-

*(-) CIM > 1000 $\mu\text{g/MI}$

Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *A. congestiflora* em cepas bacterianas.

Amostras testadas (Extratos)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	Micro-organismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
FAC - Ac	-	-	-
FET- Ac	-	-	-
FH - Ac	-	-	-

* (-) CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$

É definido com CIM a concentração mínima da substância sendo capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

São considerados inibidores muito fortes com CIM até $\leq 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inibidores forte de $101 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inibidores leves à moderados entre $501 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e fracos (ou inviáveis) inibidores apresentando uma CIM acima entre $1001 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (FREIRE, 2015) (ROZATTO, 2012).

Observando os valores encontrados conclui-se, infelizmente, que nenhum dos extratos de ambas as plantas apresentaram atividade sobre as cepas bacterianas selecionadas.

Os valores para CIM obtidos nos ensaios microbiológicos com cepas fúngicas para *T. palmadora* estão expostos na Tabela 11 e para *A. cogestiflora* na Tabela 12.

Tabela 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *T. palmadora* em cepas fúngicas.

Amostras testadas (Frações)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	Micro-organismos		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>

Acetato	510	127,5	63,75
Dicloro	-	-	127,5
Etanol	15,93	31,87	15,93
Hexano	255	127,5	63,75

* (-) CIM > 1000 µg/mL

Tabela 11 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *A. congestiflora* em cepas fúngicas.

Amostras testadas (Extratos)	CIM (µg.mL⁻¹)		
	Micro-organismos		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
FAC - Ac	255	-	-
FET- Ac	-	-	-
FH - Ac	-	-	-

* (-) CIM > 1000 µg/mL

O teste com as cepas fúngicas, dos extratos provenientes da *T. palmadora* demonstraram uma ótima atividade. Os mais ativos foram o FAC-Tp, FH-Tp e FET-Tp esse último em especial limitando todos seus valores de CIM abaixo de 100 µg.mL⁻¹.

No *screening* fitoquímico qualitativo da droga foram identificados alcaloides, esteroides e triterpenos sendo eles os possíveis responsáveis pela atividade antifúngica.

Quando também correlacionado a seu uso popular a *T. palmadora* faz jus aos resultados, sendo muito utilizada popularmente para infecções na uretra.

Já dos três extratos da *A. congestiflora*, apenas um demonstrou atividade e contra uma única cepa, a *C. albicans*, que ocorreu na concentração de 250 µg.mL⁻¹ podendo ser classificado como um forte inibidor.

Quando relacionado com o *screening* qualitativo, que demonstrou-se positivo para presença de taninos e flavonoides, é conferido a esses metabolitos o resultado da inibição fúngica.

Estudos como o DAFERERA (2003) que afirma o uso de extratos vegetais gera dificuldades para adaptabilidade microbiana, gerando assim uma menor probabilidade de linhagens resistentes. Isso ocorre devido a riqueza em quantidade de compostos presentes em um extrato vegetal, sendo um empecilho frente aos mecanismos de resistência.

5.4 Screening fotoquímico qualitativo

Os princípios ativos que são constantemente encontrados nas plantas são substâncias em são oriundas do metabolismo secundário, sendo diretamente ligados a relação da planta com o ambiente em que vive e seu processo de adaptação. Funcionando assim como uma das formas de identidade da mesma, expressando sua individualidade química. (SILVA; CARVALHO, 2004) Ocupando posições importantes no que diz respeito as atividades biológicas da planta, como por exemplo ser responsável pela atividade antigerminativa ou tóxicas para plantas circunvizinhas, ou a protegendo de patógenos.

A **Tabela 12** exibe o resultado da pesquisa por metabolitos em ambos extratos.

Tabela 12 - Resultados obtidos na pesquisa por metabólitos secundários de *T. palmadora* e *A. congestiflora*.

GRUPO QUÍMICO	REAÇÃO	
	<i>T. palmadora</i>	<i>A. congestiflora</i>
Alcaloides	POSITIVO	POSITIVO
Flavonoides	NEGATIVO	NEGATIVO

Esteroides/Triterpenos	<i>POSITIVO</i>	<i>NEGATIVO</i>
Taninos	<i>NEGATIVO</i>	<i>NEGATIVO</i>
Saponinas	<i>NEGATIVO</i>	<i>POSITIVO</i>
Polissacarídeo	<i>NEGATIVO</i>	<i>POSITIVO</i>

O *screening* fitoquímico qualitativo, quando atrelado aos resultados de ensaios biológicos, os ratifica.

6. CONCLUSÃO

Os estudos realizados com plantas nativas da caatinga possuem grande relevância tanto no que se diz respeito à complexa e vasta variedades das espécies a ainda serem exploradas, quanto no aspecto econômico que resultará do desenvolvimento local atrelado a essas pesquisas, acrescentando ainda o estímulo para preservação desse bioma.

O *screening* qualitativo confirmou na *A. confestiflora* a presença de alcaloides, flavonoides, polissacarídeos e saponinas, enquanto o de *T. palmadora* confirmou a presença de alcaloides e triterpenos, sendo assim, ambas, fontes promissoras estudo.

A *congestiflora* demonstrou ausência de atividade antimicrobiana e uma discreta atividade antifúngica frente a *C. albicans*. Apresentou também uma toxicidade importante, revelando a importância do estudo toxicológico quando observado uso seu popular comum e sem controle de dose, em contrapartida, a sua atividade hemolítica não foi expressiva, embora apontasse a presença de saponinas no seu *screening* fitoquímico qualitativo, podendo-se concluir que a presença desse metabolito secundário não se encontra em quantidade suficiente para exercer o efeito hemolisante.

A *T. palmadora* atestou uma boa atividade antifúngica, uma toxicidade preocupante apenas na fase diclorometano, e toxicidade insignificante para todas as fases testadas.

Dessa forma, o trabalho realizado servirá não só como de modelo de estudo para outras espécies vegetais do mesmo gênero, ou pertencentes ao bioma caatinga, assim como base de dados para estudos mais detalhados, a fim de no futuro ser utilizado para o desenvolvimento de um medicamento.

REFERÊNCIAS

- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Fiocruz, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIO (ANVISA). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília. 2003. LUCENA, C. M. **Uso e diversidade de cactáceas em uma comunidade rural no Cariri Oriental da Paraíba (nordeste do Brasil)**. 2011. 53 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Paraíba, Areia. 2011.
- ALBUQUERQUE, R. et al. **Diterpenos tipo abietano isolados de *Plectranthus barbatus* Andrews**. Revista Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 8, p.1882-1886, 2007.
- ALMEIDA, M. Z. de. **Plantas Medicinais: abordagem histórico contemporânea**. In: ALMEIDA, M. Z. de. Plantas Medicinais. 3. ed, Salvador, BA: Edufba, 2011., p. 34-67.
- ALVES, E.G.A.; VINHOLIS, A.H.A.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. **Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras**. Química Nova. v.31, n.5, 1224-1229, 2008.
- ALVES, J. J. A. **Caatinga do cariri paraibano**. Revista Geonomos, v. 17, n. 1, p. 19-25, 2009.
- ALVES, L. F. **Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas**. Revista Virtual de Química. Rio de Janeiro. Volume 5. n.3. 2013.
- ANDRADE, C. T. S. MARQUES, J. G. W. ZAPPI, D. C. **Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 36-42, 2006.
- ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W.; ZAPPI, D.C.. **Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v.8, n.3, p.36-42, 2006.
- ANTUNES, L. M. G; BIANCHI, M. L. P; **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. Revista de Nutrição. Campinas, SP. v 12, n.2, 1999.
- ARRUDA, E. MELO-DE-PINNA, G. F. ALVES, M. **Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana**. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 38, n. 3, 2005.
- BADKE, M. R. et al. **Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular**. Escola Anna Nery, Santa Maria, v. 15, n. 1, p.132-139, 2011. Acesso em: 21 de fevereiro de 2017
- BARBOSA, W. L. R. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, 2001.

- BEDNARCZUK, V. O. et al. **Tests in vitro and in vivo used in the toxicological screening of natural products.** Visão Acadêmica, v. 11, p. 43-50, 2010.
- BFG. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.** Rodriguésia, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)
- BORTOLOTTI, T. **Avaliação da atividade tóxica e genotóxica de percolados do aterro sanitário de Sombrio-SC, utilizando Artemia sp. e Allium cepa L.** 2007. 79p. Trabalho de conclusão de curso em Ciências Biológicas - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Brasília: Ideal Gráfica e Editora Ltda, 2006.
- BRUXEL, J. JASPER, A. **A família Cactaceae na Bacia Hidrográfica do Rio Taquari, RS, Brasil.** Revista Acta Botanica Brasilia, Lajeado, v. 19, n. 1, p. 71-79, 2005.
- CAMPOS, M.B.; DA COSTA, A.L.P.; BARBOSA, L.P.J.L.; BARBOSA, F.H.F. **Análise qualitativa fitoquímica e atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico da casca de Bertholletia excelsa Humb. & Bomple (Lecytidaceae) frente a microrganismos gram-negativo.** Ciência Equatorial. v.1, p.1-14, 2011.
- COSTA, J. C. MARINHO, M. G. V. **Etnobotânica de plantas medicinais em duas comunidades no município de Picuí, Paraíba, Brasil.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas, v. 18, n. 1, p. 125-134, 2016.
- COSTA, Russany Silva Da. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de Heliotropium indicum (L.) DC (Boraginaceae).** DISSERTAÇÃO Belém – PA, 2010. Disponível em: <<http://ufpa.br/ppgcf/arquivos/dissertacoes/dissertacaoAno2010-RussanySilvaCosta.pdf>> Acessada em: 17 de fevereiro de 2017.
- COSTA-LOTUFO L. V. et al. **A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.** Revista Virtual de Química, Fortaleza, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- DA COSTA, J. C. **Estudo etnobotânico de plantas medicinais em comunidades rurais e urbanas do Seridó paraibano, Nordeste do Brasil.** Dissertação, 2013.
- DA SILVA, C. G. **Estudo etnobotânico da atividade in vitro de plantas medicinais na comunidade Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará.** Dissertação, 2012.
- DA SILVA, G. T. **Contribuição para o conhecimento de espécies da família Cactaceae: uso pela medicina popular e potencial terapêutico.** Monografia, 2014.
- DA SILVA, N. L. A Et al. **Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal de Inhamum, Caxias, Maranhão.** Revista Scientia Plena, vol 6, n 2, 2010. Disponível em: <<https://scientiaplena.org.br/sp/article/viewFile/22/14>> Acessado em: 11 jan 2017

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. **The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.** Crop Protection, v. 22, p.39-44, 2003.

DE ASSIS, C. S. **Avaliação dos efeitos tóxicos in vitro e in vivo do extrato hidroetanólico dos frutos de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em camundongos Swiss.** Dissertação, 2015.

DE MENEZES, M. O. T. TAYLOR, N. P. LOIOLA, M. I. B. **Flora do Ceará, Brasil: Cactaceae.** Revista Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 64, n. 4, 2013.

DEGANI, Ana Luiza G, Et Al. **Cromatografia um breve ensaio.** Revista Química nova na escola, São Paulo, n° 7. p. 22 a 25, Maio-1998. Disponível em:<http://www.neplame.univasf.edu.br/uploads/7/8/9/0/7890742/cromatografia_um_breve_ensaio.pdf> acessado em: 01 de mar de 2017

DETTKE, G. A. MILANEZE-GUTIERRE, M. A. **Anatomia caulinar de espécies epífitas de Cactaceae, subfamília de Cactoideae.** Revista Hoehnea, v. 35, n. 4, p. 583-595, 2008.

DUARTE, M.C.T. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil.** Revista MultiCiência, n. 7, 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf> Acessado em: 25 de fev de 2017.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. **Methods of in vitro toxicology.** Food Chemiscal Toxicology, v.40, n. 2-3, p.193-236, 2002.

ESPITIA-BAENA, J.E.; ROBLEDO-RESTREPO, S.M.; CUADRADO-CANO, B.S.; ROSARIO, H.D.; GÓMEZ-ESTRADAI, H.A. **Perfil fitoquímico, actividad antiLeishmania, hemolítica y toxicológica de *Cordia dentata* Poir. Y *Heliotropium indicum* L.** Revista Cubana de Plantas Medicinai. v.19, n.3, p.208-224, 2014.

FERREIRA, C. **Dinâmica do microbioma da rizosfera de mandacaru na Caatinga.** 2014. 89p. Tese Mestrado em Ciências. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FIRMO, Wellyson C. A. Et al. **Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais.** Cad. Pesq., São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011. Disponível em: [http://www.pppg.ufma.br/cadernosdepesquisa/uploads/files/Artigo%2010\(9\).pdf](http://www.pppg.ufma.br/cadernosdepesquisa/uploads/files/Artigo%2010(9).pdf) Acesso em: 25 de fev 2017.

FOGLIO, M.A. QUEIROGA, C. L. SOUZA, I. M.O. Rodrigues, R. A. F. **Plantas Medicinai como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar.** Construindo a História dos Produtos Naturais - Rev. Interdisciplinar dos centros e núcleos da unicamp, São Paulo, v.7, 2006.

FONTES, N. N. **A complexidade das plantas medicinais: algumas questões de sua produção e comercialização.** Tese. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

FRANÇA, Mesaque Carvalho Et al., **Perfil fitoquímicos com extrato vegetal da espécie *Napalea cochenillifera*.** IFMA, Maranhão, 2010. Disponível em: <<http://congressos.ifal.edu.br/index.php/connepi/CONNepi2010/paper/viewFile/1576/535>> Acessado em: 25 de fev de 2017

FREIRES, I. A.; Denny, C.; Benso, B.; de Alencar, S.M.; Rosalen, P.L. **Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review.** *Molecules*, v. 20, p.7329-7358, 2015.

FRÖHNER, C. R. A. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial da atividade antiviral violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum*.** Dissertação, 2003.

GOBBO-NETO, L. LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** *Revista Química Nova*, v.30, n.2. São Paulo, 2007.

Gomes-Klein, V.L.,Lima, L.F.P.,Gomes-Costa, G. A.,Medeiros, E.S. 2015. **Cucurbitaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17043>>. Acessado em: 19 de abril de 2017.

GONZAGA, D. R. et al. **Cactaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil.** *Revista Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 65, n. 2, 2014.

GUIDO, R. C., ANDRICOPULO, A. D. & OLIVA, G. 2010. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas.** *Estudos Avançados*, 24 (7): 82-97.

JUNIOR, Valdir F. de Veiga. **Estudo do consumo de plantas medicinais na região Centro-Norte do estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população.** *Rev. bras. farmacogn.* vol.18, n.2, João Pessoa, Apr./June 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000200027> Acessado em 12 de fev de 2017.

LEAL, I. R; TABARELLI M; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga.** CEPAN - CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL. Recife, 2003.

M. C. Silva, J. C. T. Carvalho, **Plantas Medicinais: In: J. C. T. Carvalho, Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 2004, 480 p.

MACIEL, M. A. M. et al. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422002000300016&script=sci_abstract&tlng=pt> Acessado em: 21 de fev de 2017.

Maia-Silva, C. et. al. **Guia de Plantas Visitadas por Abelhas na Caatinga**. Fundação Brasil Cidadão, 2012 disponível em :

<<https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/15788128646/in/photostream/>>. Acessado em: 22 de maio de 2017.

MATA, Dayse Santos. **Participação da Mulher Waiãpi, no uso tradicional de plantas medicinais**. UFAM, Amapá, 2011. Disponível em: <

<http://www2.unifap.br/ppgmdr/files/2011/07/Nely-Dayse-Santos-da-Mata-Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>> Acessado em 12 de fev 2017.

MATHEUS, L. **Avaliação da segurança e eficácia de fitoterápicos**. Dissertação, 2002.

NARDONE, R.M. Toxicity testing in vitro. In: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J. (Ed.). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. p. 471-495ar. Revista Caatinga, v. 26, n. 4, p. 88-98, 2013.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M., ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. **Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larva de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae)**. Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada, v. 29, n.2, p. 145-150, 2008.

OSTROSKY, E.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OYEYEMI, T. I. BAKARE, A. A. **Genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrica* L. on *Allium cepa* root tip cells**. International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, v. 66, 2013.

PINTO, Delia Manuela Luna. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq) Epling**. USP, São Paulo, 2010. Disponível em: <<file:///C:/Users/aaanam/Downloads/MestradoDelia.pdf>> Acessado em 21 de fev de 2017

RODRIGUES, I. M. C Et al. **Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias**. Revista Planta daninha, vol.27, n. 3, Viçosa, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582009000300011> Acessado em: 22 fev 2017.

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

ROQUE, A. A.; LOIOLA, M. I. B. **Potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural no semiárido potiguar**. 2012.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. **Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio**

Grande do Norte (Nordeste do Brasil). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

ROZATTO, Mariana Rodrigues. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidae brachypoda**. UNESP, São Paulo, 2012. Disponível em <<http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/CienciasFarmaceuticas/MARIANA%20RODRIGUES%20ROZATTO.pdf>> Acessado em: 25 fev de 2017

RUIZ, A.L.T.G. et al. **Avaliação da atividade tóxica em Artemia salina e Biomphalaria glabrata de extratos de quatro espécies do gênero Eleocharis (Cyperaceae)**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.15, n.2 , p.98-102, 2005.

SANTOS, S.L.D.X. et al. **Plantas utilizadas como medicinais em uma comunidade rural do semi-árido da Paraíba, Nordeste do Brasil**. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.93, n.1, p.68-79, 2012. Disponível em: < <http://www.rbfarma.org.br/volume-93---n1.html>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

SILVA, C. G.; MARINHO, M. G. V; LUCENA, M. F. A.; COSTA, J. G M. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil**. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 17, n. 1, p. 133-142, 2015.

SILVA, E. G. M. et al. **Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Maceió, v. 36, n. 2, p. 277-283, 2015.

SILVA, M. C; ALVES, D. O; MAIA, V. H; **Estudo da atividade citotóxica de Myracrodruon Urundeuva Fr. Allemão**. *Biofarm – REB – Revista eletrônica de Biologia*. Vol 5, p. 1 a 7. 2012

SILVA, M.B et al. **Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero Colletotrichum**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 10, n. 3, p.57-60, 2008.

TAVARES-DIAS, Marcos; MARIANO, Wagner dos Santos. **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Vol. 2 ,São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. Disponível em: < file:///C:/Users/aanam/Downloads/LIVRO%20PRONTO_VOLUME%20II%20-%20aquicultura%20no%20Brasil.pdf> Acessado em 12 de fev de 2017.

TUROLLA, M.S.; NASCIMENTO, E.S. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 289-306, 2006.

VERÍSSIMO, R.S. et al. **Antimicrobial activity of Plectranthus barbatus (Lamiaceae)**. *Bmc Proceedings* , [s.l.], v. 8, n. 4, p.264-270, 2014. Disponível em: . Acesso em: 22 fev 2017

VINATEA, Juan Enrique. **Artêmia um ser vivo excepcional**. *Revista Panorama da aquicultura*, n 25, 2009. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/25/artemia.asp>> Acessado em 11 de fev de 2017.