

Estudo fitoquímico, toxicológico e microbiológico das folhas de *Costus spicatus* Jacq.

Antônio Paulo Ribeiro Bitencourt¹ e Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida²

1. Acadêmico do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá – Laboratório de Farmacognosia da UNIFAP. Rodovia Juscelino Kubistchek, KM-02. Jardim Marco Zero – 68.906-970 Macapá-AP, Brasil. E-mail: tonibitencourt@hotmail.com

2. Doutora em Química de Produtos Naturais pela UFSCar. Professora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá – Laboratório de Farmacognosia da UNIFAP. Rodovia Juscelino Kubistchek, KM-02. Jardim Marco Zero – 68.906-970 Macapá-AP, Brasil. E-mail: sheyllasusan@yahoo.com.br

RESUMO: A espécie vegetal *Costus spicatus* Jacq. (cana-do-brejo), espécie pertencente à família Zingiberaceae, é utilizada na medicina popular, principalmente na região amazônica como depurativa e diurética, aliviando infecções urinárias e auxiliando na eliminação de pedras renais. O objetivo desta pesquisa foi realizar o estudo fitoquímico em busca das principais classes de metabólitos secundários, atividade microbiológica e citotóxica frente a *Artemia salina* do extrato bruto etanólico das folhas de *Costus spicatus*. O teste fitoquímico foi realizado por métodos químicos, visando determinar os seguintes metabólitos: alcalóides, fenóis e taninos, flavonóides, antraquinonas, saponinas, triterpenos, açúcares redutores, polissacarídeos, ácidos orgânicos e esteróides. Quanto ao bioensaio de citotoxicidade foi realizado o teste com *Artemia salina*, onde se considerou a morte ou vida dos metanúplios. O teste microbiológico foi utilizado a prática de difusão em disco com linhagens bacterianas padronizadas em concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL do extrato bruto etanólico. Nessa perspectiva, foi possível observar a presença de alcalóides, e também, fenóis e taninos. O extrato bruto apresentou alto grau de toxicidade nas concentrações testadas frente a *A. salina*. Para avaliar a presença da atividade antimicrobiana foram medidos os halos de inibição do extrato, verificando que após 24h de incubação não houve formação significativa dos halos, onde foi possível determinar que não há efeito inibidor do extrato frente às linhagens bacterianas e nas concentrações utilizadas.

Palavras-chave: *Costus spicatus*, screening fitoquímico, bioensaio de toxicidade, *Artemia salina*, ensaio microbiológico.

Study phytochemical, toxicological and microbiological of the leaves of *Costus spicatus* Jacq.

ABSTRACT: The vegetal species *Costus spicatus* Jacq., called “cana-do-brejo” in Brazil, belong to Zingiberaceae family, and it's used in the popular medicine, especially in the Amazon region as a depurative and diuretic, relieving urinary tract infections and aiding in the removal of kidney stones. The objective of this study was perform the phytochemical study in search of main classes of secondary metabolites, microbial activity and cytotoxicity with the Brine Shrimp Test of ethanolic crude extract of dried leaves of vegetal specie *C. spicatus*. The phytochemical Trial was realized was achieved by chemical methods to determine the following metabolites: alkaloids, phenols and tannins, flavonoids, anthraquinones, saponins, triterpenes, reducing sugars, polysaccharides, organic acids and steroids. The toxicity bioassay with Brine Shrimp Test (BST) was performed the test with *Artemia salina*, which was considered the death or life of nauplius. In microbiological test was used the diffusion with standard bacterial strains with concentrations of 25 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL of EBE of *C. spicatus*. In this perspective, in this study we observed in EBE the presence of alkaloids, and too, phenols and tannins. The extract of *C. spicatus* showed a high degree of toxicity in concentrations analyzed with BST. To estimate the presence of antimicrobial activity was measured the size of the circles of inhibition of the extract ant antibiotics, verifying that after 24 hours of incubation there was no significant growth of inhibitory circles, where it was determined that there is no inhibitory effect in *C. spicatus* front of the bacterial stains used and concentrations used.

Keywords: *Costus spicatus*, phytochemical screening, toxicity bioassay, *Artemia salina*, microbiological test.

1. Introdução

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade do mundo, além de um considerável conhecimento tradicional, o qual é passado de geração a geração, incluindo um vasto acervo de informações sobre manejo e uso de plantas medicinais (ELISABETSKY, 1985). As plantas são uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem modelos para síntese de um grande número de fármacos (NODARI; GUERRA, 2003). Apesar do aumento do estudo nessa área os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto o seu potencial medicinal (PINTO et al., 2002).

A família Zingiberaceae é a maior da ordem Zingiberales, É constituída de 53 gêneros e mais de

1.200 espécies nativas de regiões tropicais, especialmente do sul e sudeste da Ásia, expandindo-se através da África tropical até a América do Sul e Central, dispersa em trópicos e subtropicais. Algumas das espécies desta família são famosas por possuírem poderosos princípios farmacológicos comprovados cientificamente (ALBUQUERQUE, 2004; AGAREZ, 1994).

A *Costus spicatus* Jacq. conhecida popularmente como cana-do-brejo, é uma espécie pertencente à família Zingiberaceae (MENEZES, 2007), também denominada cana do macaco ou cana-do-mato, é uma planta fitoterápica, nativa em quase todo o Brasil, principalmente na mata atlântica e região amazônica (SILVA JUNIOR, 1999).

Caracteriza-se por uma planta perene, rizomatosa

não ramificada, ereta, que pode atingir 2 metros de altura (AZEVEDO, 2009). Sua ação é depurativa e diurética, aliviando infecções urinárias e auxiliando na eliminação de pedras renais (MENEZES, 2007).

A utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporada à pesquisa fitoquímica. Dentre estes ensaios biológicos, encontra-se o ensaio de toxicidade com *Artemia salina* (BST-BrineShrimp Test). Este tipo de teste tem como objetivo avaliar ou prever os efeitos tóxicos que uma substância pode produzir e estabelecer as de uso seguro para não causar dano ao meio ambiente e à saúde dos animais e de outros seres vivos (LORENZI et al., 2011).

Os testes de toxicidade animal, como o bioensaio com *Artemia salina*, são considerados seguros, pois preveem os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos ou averiguam a toxicidade relativa das substâncias. Com base na dose por unidade de superfície corporal, os efeitos tóxicos no homem estão consideravelmente nos mesmos limites que os observados nos animais de laboratório, sendo possível descobrir possíveis riscos nos humanos (AMARAL; SILVA, 2008).

Os testes agudo-letais são usados para avaliar efeitos em organismos aquáticos selecionados numa exposição curta, de 24 a 96 horas, a várias concentrações do composto a se testar. Os resultados de toxicidade aguda letal são normalmente representados pela CL_{50} , ou seja, a concentração necessária de uma droga capaz de matar 50% da população testada. A resposta mais simples para monitorar a letalidade é apenas um critério, vida ou morte de metanúplios (AMARAL; SILVA, 2008).

No Brasil, os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária com autorização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (NCCLS) (BRASIL, 2003); são desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais, como os antibióticos (HENTZ; SANTIN, 2008).

Substâncias antimicrobianas de plantas são detectadas, principalmente, por meio da observação de sua capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos expostos a estes compostos; os resultados sofrem influências dos métodos e micro-organismos utilizados (SOUZA; AVANCINI; WIEST, 2000; HENTZ; SANTIN, 2008).

Mesmo não havendo dados sobre atividade antimicrobiana de *C. spicatus* em trabalhos já publicados, para determinar e comprovar a presença ou ausência de ação antibacteriana da cana-do-brejo foi realizado o ensaio antimicrobiano com bactérias padronizadas. Assim, este estudo avaliou a atividade antimicrobiana das folhas de *C. spicatus* sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (HENTZ; SANTIN, 2008).

Justifica-se o estudo da espécie *C. spicatus*, visto que esta espécie é amplamente utilizada pela população e

contém pouca informação acerca de seus constituintes químicos ajudando na quimiosistemática da espécie e proporcionando informações acerca da sua toxicidade e atividade antimicrobiana, para que os resultados possam ser usados pela população de forma adequada, visto que a exploração comercial de produtos naturais apresenta perspectivas cada vez mais promissoras de se tornar uma atividade econômica rentável.

O objetivo desta pesquisa foi realizar o estudo fitoquímico em busca das principais classes de metabólitos secundários, atividade microbiológica e citotóxica frente a *A. salina* do extrato bruto etanólico das folhas de *Costus spicatus*.

2. Material e Métodos

Material vegetal

As folhas da cana-do-brejo foram adquiridas em áreas da cidade de Macapá-AP no dia 10 de janeiro de 2011.

Obtenção do extrato bruto etanólico (EBE)

O material vegetal (1,5 Kg) foi seco em estufa a temperatura de, aproximadamente, 45° C por 72 h e em seguida moído em moinho elétrico. Obteve-se então, após secagem e moagem, o pó das folhas de *C. spicatus*. Pesou-se 230 g do material vegetal seco e moído e foi submetido a extração por maceração em etanol (750mL) por um período de três dias, sendo este processo repetido mais de três vezes com o mesmo material vegetal, fazendo assim uma extração por exaustão e então obtido 38g de Extrato Bruto Etanólico (EBE).

Análise fitoquímica preliminar

As análises fitoquímicas tiveram como objetivo identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato bruto etanólico de *C. spicatus*. Por meio de métodos químicos segundo Matos (1999, 2000) *apud* Costa (2009), visou-se determinar os seguintes metabólitos: alcaloides, fenóis e taninos, flavonoides, antraquinonas, saponinas, triterpenos, açúcares redutores, polissacarídeos, ácidos orgânicos e esteroides (MATTOS, 2000).

Teste antimicrobiano utilizando linhagens bacterianas padronizadas

No teste microbiológico, foi utilizada a difusão em disco com as linhagens bacterianas padronizadas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC13883), *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) segundo o método de Kirby-Bauer modificado, *apud* Charles (2009). Foram utilizadas as concentrações de 25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL do EBE de *C. spicatus* para todas as bactérias.

Segundo o método de Kirby-Bauer modificado, *apud* Charles (2009), cultura caldo BHI (Brain Heart

Infusion), foi o meio de cultura do crescimento submetido às linhagens bacterianas. Ajustou-se a turbidez para 108 UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônias por mililitros, ou seja, para 0,5 da escala de McFarland. Contagem em Petrifilm® foi utilizada para comprovar a quantidade de colônias existentes.

Após comprovação da quantidade de colônias, deixou-se um swab bacteriológico introduzido na suspensão bacteriana por, aproximadamente, três minutos. A suspensão, em seguida, foi pressionada contra a parede do tubo, havendo esgotamento. Em seguida, foi semeado o inóculo sobre a superfície de placas, com meio de cultura ágar Müller-Hinton (MH) em triplicata. Após secagem, os discos impregnados com extrato bruto etanólico de *C. spicatus* com três concentrações diferentes (25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL) para todas as três bactérias utilizadas, foram aderidos ao ágar, juntos com cinco antibióticos em cada uma das placas nas diferentes concentrações, para que fosse possível a comparação dos halos de inibição.

O disco impregnado com as diferentes concentrações designadas de extrato foi aplicado sobre as placas utilizando pinça flambada e fria. Para melhor adesão do disco e dos antibióticos, pressionou-os nas placas. Colocou-se o disco e os antibióticos afastados um dos outros para se evitar a sobreposição dos halos de inibição.

Toxicidade em *Artemia salina*

Quanto ao bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* (BST-Brine Shrimp Test), utilizou-se a metodologia de acordo com Amaral e colaboradores (2008) descreveu, na qual existe apenas um parâmetro envolvido: vida e morte de metanúplios.

Inicialmente preparou-se a solução artificial marinha, sendo esta preparada com 34,2 g de Cloreto de Sódio; 1,425 g de Sulfato de Magnésio; 4,75 g de Bicarbonato de Sódio e 951 mL de água destilada. Depois de homogeneizada, utilizando-se solução de 2 mol/L de hidróxido de sódio e acertou-se o pH para 9,0.

Os cistos de *A. salina* foram incubados em um pequeno recipiente contendo a solução salina com pH 9,0, sendo feita a relação: para cada 100 mL de solução marinha colocou-se 10 mg de cistos de *A. salina*. Manteve-se uma iluminação de uma lâmpada de 40 e temperatura de 28°C. Filtraram-se, após 24 horas, as larvas (náuplios), sendo estas recolocadas em um novo recipiente com solução marinha, mantendo-as em incubação por mais 24 horas, nas mesmas condições de luz e de calor mencionados. Após essas incubações, as larvas atingiram o estágio de metanúplio do microcrustáceo (cultura pura), que é mais sensível ao tratamento (MCLAUGHLIN et al., 1982; VINATEA, 1994).

Foram distribuídas dez metanúplios em cada tubo de ensaio contendo concentrações graduais (1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL) do EBE de *C. spicatus* em triplicata. O efeito tóxico da planta foi testado pelo

Método de Meyer (1982) *apud* Nascimento (2008), consistindo em dissolver as amostras do extrato em água, sendo colocadas dez larvas de *A. salina* por tubo de ensaio.

Após 24 horas de contato dos metanúplios com o EBE, foi feita a contagem do número de larvas sobreviventes e mortas, sendo assim calculado o percentual de mortalidade para cada uma das concentrações testadas e controle. Foram consideradas larvas mortas todas que não apresentavam qualquer movimento ativo em cerca de vinte segundos de observação. Observou-se morte superior a 50% para todas as concentrações.

3. Resultados e Discussões

O EBE foi submetido à análise fitoquímica (screening fitoquímico) preliminar para identificação da presença das classes de compostos alcalóides, fenóis e taninos, flavonóides, saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, polissacarídeos, esteróides e triterpenóides e antraquinonas (Quadro 1).

Quadro 1. Presença e ausência de metabólitos secundários no EBE de *C. spicatus*. Parâmetros: Presente (+); Ausente (-).

Classes de metabólitos secundários	EBE
Alcalóides	+
Flavonóides	-
Fenóis e Taninos	+
Saponinas	-
Ácidos Orgânicos	-
Açúcares Redutores	-
Polissacarídeos	-
Esteróides e Triterpenóides	-
Depsídeos e Depsidonas	-
Antraquinonas	-

Estas classes de compostos apresentam uma variedade de atividades biológicas. Nessa perspectiva, no estudo fitoquímico foi possível observar a presença de alcalóides, que atualmente são utilizados em terapêutica, puros ou em associação, e também na forma de derivados. Estes metabólitos podem ser utilizados no tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias e problemas renais, assim como repelentes de herbívoros, amebicida, emético, antimalárico, antitumoral, antitussígenos, hipoanalgésico, miorelaxante, e muitas outras atividades biológicas (HENRIQUES et al., 2010).

Um dos mecanismos de ação dos alcalóides, mais especificamente os tropânicos, é a inibição da acetilcolina em efetores autônomos inervados pós-ganglionares colinérgicos, assim como na musculatura lisa, sendo esta desprovida de inervação colinérgica. Plantas que contém alcalóides tropânicos são utilizadas para diminuição de cólicas nos ureteres e aquelas provocadas por cálculos renais (BACCHI, 2010). Independentemente da utilização da “Cana-do-brejo” na medicina popular, nenhum estudo das propriedades farmacológicas e dos constituintes químicos do extrato dessa planta tem sido relatado (SOUZA et al., 2004).

Foram detectados fenóis e taninos cujas atividades são amebicida, anti-eméticas, hipoanalgésica e diurética, tendo sido relatada atividade antioxidante de compostos fenólicos, e utilização de taninos no tratamento de reumatismo, hemorragias, queimaduras, problemas estomacais e processos inflamatórios em geral. Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe, como por exemplo: ação bactericida e fungicida (SCALBERT, 1991; CHUNGETAL, 1998), antiviral (OKUDA et al., 1993; De BRUYNE et al., 1999b), ação antitumoral (WANG., 1999; DUFRESNE; FARNWORTH, 2001) (CARVALHO et al, 2010).

A presença específica dos metabólitos encontrados, alcalóides e fenóis e taninos, corrobora com as atividades da cana-do-brejo alegada pela população, uma vez que ambos os metabólitos confirmam a atividade diurética, já que esta é a principal finalidade da planta em algumas comunidades.

Os resultados de toxicidade são representados pela Concentração Média Letal, ou seja, CL_{50} . De acordo com os dados contidos na Tabela 1, o extrato etanólico de *C. spicatus* apresentou alto grau de toxicidade nas concentrações testadas no período de exposição de 48 h, sendo a mortalidade de metanúplios acima de 70%, valores estes muito superiores ao controle negativo.

Tabela 1. Mortalidade média de *Artemia salina* de acordo com as concentrações do extrato de *C. spicatus* com o controle negativo (CN).

Concentração do extrato em $\mu\text{g/mL}$	Número de organismos expostos (n)	Média (%) de organismos mortos	Desvio padrão
50	10	70,0	$\pm 1,732$
100	10	83,0	$\pm 0,5774$
250	10	83,0	$\pm 1,155$
500	10	96,0	$\pm 0,5774$
750	10	100,0	$\pm 0,0$
1000	10	100,0	$\pm 0,0$
CN (Solução salina)	10	56,0	$\pm 0,5774$

A presença de citotoxicidade do extrato é um indicador de que a planta pode não ser bem tolerada pelo sistema biológico com as concentrações testadas, porém, estudos mais detalhados, com concentrações abaixo de 50 $\mu\text{g/mL}$, se fazem necessários para a avaliação da toxicidade do extrato de *C. spicatus*, e para identificar o valor real de CL_{50} da planta.

A toxicidade da planta pode estar relacionada com a presença de alcalóides, que são compostos nitrogenados estruturalmente diversificados, sendo alguns destes princípios tóxicos de plantas (LORENZI et al, 2011).

Mesmo com os dados obtidos acerca da toxicidade de *C. spicatus*, segundo Lorenzi et al. (2011), para que uma planta possa ser apontada como tóxica, tem de ser

empregada como método principal a experimentação com animais, que, inicialmente deve ser feita na espécie animal afetada, no caso humanos, sob condições naturais e com a planta fresca recém colhida, administrada por via oral, considerando que esta é a via natural de intoxicação por plantas.

Para avaliar a presença da atividade antimicrobiana mediu-se o tamanho dos halos de inibição do extrato, verificando que após 24 h de incubação não houve formação significativa dos halos em comparação aos antibióticos testados, onde foi possível determinar que não haja efeito inibidor de do EBE de *C. spicatus* frente às linhagens bacterianas utilizadas e nas concentrações testadas por este método.

Segundo Ribeiro (2008), não existe um consenso sobre o nível aceitável para extratos/óleos essenciais de plantas quando comparados com antibióticos padrões, por isso, acredita-se que novos testes, outros diluentes e até mesmo o uso de outros micro-organismos possam apresentar resultados mais eficientes (HENTZ; SANTIN, 2007).

4. Considerações Finais

Mesmo que em alguns casos seja comprovada a eficiência terapêutica de muitas plantas, como a cana-do-brejo, prováveis efeitos tóxicos decorrentes dos metabólitos que as mesmas podem apresentar muitas vezes são ignorados. Visto que além de buscar meios de comprovar as atividades terapêuticas já descritas pela população, o presente trabalho serviu para analisar a existência possíveis atividades antimicrobianas.

Sendo assim, a investigação fitoquímica, antimicrobiana e tóxica de *C. spicatus* elucida importantes aspectos farmacológicos de seus princípios naturais, permitindo conhecimento concreto acerca desta planta, respeitando seus possíveis efeitos toxicológicos. Assim, o uso dessa planta para fins medicinais requer cuidados mais criteriosos, necessitando ainda de maiores estudos sobre seu potencial de intoxicação, a fim de assegurar a saúde de seus usuários.

O estudo promissor é de grande importância, pois demonstra que a utilização de produtos oriundos da nossa flora é necessária para comprovação científica das atividades alegadas pela população, agregando valores aos conhecimentos das comunidades que as utilizam.

5. Agradecimentos

À Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) e ao Programa de Educação Tutorial (Ministério da Educação).

6. Referências Bibliográficas

- AGAREZ, F. V.; PEREIRA, C.; RIZZINI, C. M. Taxionomia, morfologia e reprodução das angiospermas, chaves para determinação das famílias. **Botânica - Angiospermae**, p. 233. 1994.
- ALBUQUERQUE, E. S. B.; NEVES, L. J. 2004. Anatomia foliar de *Alpiniaze rumbet* (Pers.) Burtt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, p. 109-121, 2004.

- AMARAL, E. A.; SILVA, R. M. G. Avaliação da toxicidade aguda de angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruonum rundeuva*) e cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do ensaio com *Artemia salina*. **Perquirêre - Revista Eletrônica da Pesquisa**. 2008.
- AZEVEDO, C. P. M. F. et al. Enraizamento de estacas da cana-do-brejo. **Bragantia**, v. 68, p. 909-912, 2009.
- BACCHI, E. M. Alcaloides tropicânicos. In: SIMÕES, O. M. C. et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. p. 793-818. 2010.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFRGS, p. 519-533. 2010.
- CHARLES, S.E.; et al. 2009. Perfil Fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entracasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 299-303, 2009.
- COSTA, E. S. S., DOLABELA, M. F., PÓVOA, M. M., OLIVEIRA, D. J., MULLER, A. H.. Pharmacognostics studies, phytochemicals, antiplasmodic activity and toxicity in *Artemiasalina* of ethanolic extract from *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 834-838, 2009.
- ELISABETSKY, E.; SETZER, R.. **The amazon caboclo: historical and contemporary perspectives**. Caboclo concepts of disease, diagnosis and therapy: implications for Ethnopharmacology and health systems in Amazonia. Williamsburgh: Studies On Third World Societies Publication Series. 32: 243. 1985.
- HENRIQUES, A. T.; et al. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 765-787. 2010.
- HENTZ, S. M.; SANTIN, N. C.. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. **Evidência**, v. 7, p. 93-100, 2007.
- LÔBO, K. M. S. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Salanum paniculatum* Lam, e *Operculina hamiltanii* (G. don). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 12, p. 227-233, 2010.
- LORENZI, H. et al. **Plantas tóxicas: Estudo de fitotoxicologia química de plantas Brasileiras**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 12-14. 2011.
- MCLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato discs and Brine shrimp lethaly. Two simple bioassay for higher plants screeing and fraction. **Methods in Plants. Biochemistry**, v. 6, p. 2-27, 1982.
- MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects and acute toxicity of the aqueous extract of *Costusspicatus* leaves (Zingiberaceae). **Biologia geral e experimental**, v. 7, n. 1, p. 9-13, 2007.
- NASCIMENTO, J. E.; et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 143-148, 2010.
- NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, p. 13-28, 2010.
- PINTO, A. C.; et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
- SILVA, A. A. J. 1998. **Plantas medicinais**. Florianópolis: EPAGRI: (CD-ROM).
- SOUZA, A. M.; et al. Modulation of Sodium Pumps by Steroidal Saponins. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**. v. 59, p. 432-436, 2004.
- STEFANELO, M. E.; et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, 2006.