

Toxicidade preliminar dos extratos e frações obtidas das folhas e das cascas do caule da *Dalbergia brasiliensis*

Preliminary toxicity of extracts and fractions obtained from leaves and stem bark of *Dalbergia brasiliensis*

 DOI: 10.55892/jrg.v7i14.896

 ARK: 57118/JRG.v7i14.896

Recebido: 20/11/2023 | Aceito: 06/01/2024 | Publicado on-line: 08/01/2024

Luciane Dalarmi¹

 <https://orcid.org/0000-0001-8217-2487>

 <http://lattes.cnpq.br/2213505426771481>

Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil

E-mail: luciane.dalarmi@ufpr.br

Idonilton da Conceição Fernandes⁵

 <https://orcid.org/0000-0003-4728-4488>

 <http://lattes.cnpq.br/0703312419600628>

Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil

E-mail: tonhfernandes@gmail.com

Elisiane Bona Sartor²

 <https://orcid.org/0000-0003-4303-916X>

 <http://lattes.cnpq.br/5482375295945080>

Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil

E-mail: elisartor@gmail.com

Deise Prehs Montrucchio⁶

 <https://orcid.org/0000-0003-1440-7007>

 <http://lattes.cnpq.br/7759064920324989>

Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil

E-mail: deisepm@yahoo.com.br

Cíntia Aparecida dos Anjos³

 <https://orcid.org/0000-0001-5716-8646>

 <http://lattes.cnpq.br/1475811202631506>

Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil

E-mail: cintia08anjos@gmail.com

Josiane de Fátima Gaspari Dias⁷

 <https://orcid.org/0000-0002-8548-8505>

 <http://lattes.cnpq.br/5611247352060367>

Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil

E-mail: jodias@ufpr.br

Karine Amorim Fladzinski⁴

 <https://orcid.org/0000-0003-4346-8079>

 <http://lattes.cnpq.br/2795765422456075>

Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil

E-mail: karinefladzinski@gmail.com

Marilis Dallarmi Miguel⁸

 <https://orcid.org/0000-0002-1126-9211>

 <http://lattes.cnpq.br/4747666293431338>

Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil

E-mail: marilismiguel@gmail.com

Resumo

O gênero *Dalbergia* Linn. f. (Fabaceae) contém cerca de 250 espécies e encontra-se ameaçado em extinção devido ao alto valor econômico da sua madeira. Muitas espécies do gênero são utilizadas na medicina tradicional chinesa. A espécie *Dalbergia brasiliensis* ocorre de forma natural no Brasil (Cerrado e Floresta Atlântica) e possui poucos estudos na literatura. O objetivo do estudo foi avaliar a toxicidade preliminar por meio do ensaio frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. e pela avaliação da atividade hemolítica dos extratos e frações das cascas do caule e das folhas da espécie *Dalbergia brasiliensis*. No ensaio sistemático de prospecção fitoquímica, nos extratos aquoso e hidroalcolico das folhas, mostraram a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides, iridóides, taninos condensados e aminogrupos; nos extratos das cascas mostraram os mesmos compostos e ainda, heterosídes

¹ Doutora em Ciências Farmacêutica pela Universidade Federal do Paraná.

² Graduada Farmácia. Mestra em Ciências Farmacêuticas.

³ Graduada Farmácia. Mestra em Ciências Farmacêuticas.

⁴ Graduada Farmácia. Mestranda em Ciências Farmacêuticas.

⁵ Graduado em Farmácia. Mestre em Ciências Farmacêuticas.

⁶ Graduada em Farmácia. Doutora em Farmacologia.

⁷ Graduada em Farmácia. Doutora em Ciências Farmacêuticas.

⁸ Graduada em Química Doutora em Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal).

antocianicos e saponínicos. O material vegetal seco e triturado foi utilizado para a obtenção dos extratos brutos etanólicos em aparelho Soxhlet. A partir do extrato bruto das cascas do caule e das folhas, foram obtidas as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. Em relação a toxicidade preliminar frente a *A. salina*, todas as amostras apresentaram um valor de CL50 superior a 1000µg/mL, evidenciando a baixa toxicidade. Na avaliação da atividade hemolítica, o mesmo resultado negativo foi evidenciado nas placas de Agar sangue. Na avaliação em tubos, a fração hexânica da casca apresentou resultado positivo necessitando de mais estudos para compreender sua atividade tóxica. A baixa toxicidade dos extratos e frações de *D. brasiliensis* nos testes realizados demonstra o potencial desta planta para futuros estudos de purificação de compostos e de determinação de outras atividades biológicas.

Palavras-chave: *Dalbergia brasiliensis*. toxicidade preliminar. *Artemia salina*. atividade hemolítica.

Abstract

The genus Dalbergia Linn. f. (Fabaceae) contains around 250 species and is threatened with extinction due to the high economic value of its wood. Many species of the genus are used in traditional Chinese medicine. The species Dalbergia brasiliensis occurs naturally in Brazil (Cerrado and Atlantic Forest) and has few studies in the literature. The objective of the study was to evaluate preliminary toxicity through the assay against the microcrustacean Artemia salina Leach. and by evaluating the hemolytic activity of extracts and fractions of the bark of the stem and leaves of the species Dalbergia brasiliensis. In the systematic phytochemical prospecting test, the aqueous and hydroalcoholic extracts of the leaves showed the presence of alkaloids, flavonoids, steroids, iridoids, condensed tannins and amino groups; in the bark extracts they showed the same compounds and also anthocyanin and saponin heterosides. The dried and crushed plant material was used to obtain crude ethanolic extracts in a Soxhlet apparatus. From the crude extract of the bark of the stem and leaves, the hexane, chloroform and ethyl acetate fractions were obtained. Regarding preliminary toxicity against A. salina, all samples presented an LC50 value greater than 1000µg/mL, demonstrating low toxicity. In the evaluation of hemolytic activity, the same negative result was evident on blood Agar plates. In the evaluation in tubes, the hexanic fraction of the peel showed a positive result, requiring further studies to understand its toxic activity. The low toxicity of D. brasiliensis extracts and fractions in the tests carried out demonstrates the potential of this plant for future studies to purify compounds and determine other biological activities.

Keywords: *Dalbergia brasiliensis*. preliminary toxicity. *Artemia salina*. hemolytic activity.

1. Introdução

O gênero *Dalbergia* Linn. f. (Fabaceae: Faboideae) contém cerca de 250 espécies, muitas das quais são mundialmente reconhecidas pelo seu valor econômico (HUNG et al, 2020). As espécies deste gênero caracterizam-se como árvores, arbustos e trepadeiras lenhosas amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (CARVALHO, 1997; VASUDEVA et al., 2009).

O gênero *Dalbergia* produz madeira valiosa de cerne conhecida como jacarandá e são incorporadas em uma ampla gama de usos, incluindo móveis, barcos e instrumentos musicais. Devido à exploração da sua madeira, o tamanho da população e as áreas dentro da sua distribuição nativa diminuíram significativamente. O gênero *Dalbergia* é declarado ameaçado em todo o mundo, com várias espécies classificadas como ameaçadas ou vulneráveis na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (WINFIELD et al, 2017; HUNG et al, 2020). Muitas espécies do gênero são utilizadas na medicina tradicional chinesa (CARVALHO, 2004) e possuem reconhecidas propriedades biológicas como analgésicas, anti-inflamatória, anti-helmíntica, antioxidante, antimicrobiana, antiulcerogênica, antitumoral, larvicida, entre outras (Saha et al., 2013; Dalarmi et al., 2015).

A espécie *D. brasiliensis* é uma árvore caducifólia, com 4 a 20 m de altura (CARVALHO, 2004) o qual ocorre de forma natural no Brasil (Cerrado e Floresta Atlântica), com poucos estudos na literatura. A atividade antioxidante desta espécie foi relatada por Dalarmi et al. (2017), o qual constataram que todos os extratos provenientes das cascas e das folhas, apresentaram atividade, principalmente as frações clorofórmio e acetado de etila da casca e as frações hexano e clorofórmio da folha.

Ensaio de atividade biológica são muito importantes na triagem de estudo de um vegetal. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes constituintes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico e, além disso, estes devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis (MACIEL et al., 2002).

Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e investigar a toxicidade relativa das substâncias que são preponderantes na avaliação do ambiente (BAROSA et al, 2003). O ensaio da letalidade de organismos simples, como o microcrustáceo marinho *Artemia salina* Leach, permite a avaliação da toxicidade geral e é considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos e metabólitos especiais com potencial atividade biológica (MACIEL et al., 2002).

Neste contexto o presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade preliminar por meio do ensaio frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. e pela avaliação da atividade hemolítica dos extratos e frações das cascas do caule e das folhas da espécie *Dalbergia brasiliensis*.

2. Metodologia

2.1 Ensaio sistemático de prospecção fitoquímica

Foram utilizados os extratos aquosos 20% (m/v) e hidroalcolico 20% (m/v), ambos obtidos por maceração, para pesquisa da presença dos grupos químicos.

Extrato Aquoso: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, aminogrupos e flavonóides.

Extrato hidroalcolico: glicosídeos flavônicos, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos (MOREIRA, 1979; MIGUEL, 2003).

2.2 Material Vegetal e Obtenção do extrato bruto e frações

O material coletado foi seco em temperatura ambiente e triturado em moinho de facas e martelo. A partir de 4070g das folhas e 2800g das cascas do caule seco e estabilizado, os extratos brutos etanólicos (406,62g e 338,55g respectivamente) foram obtidos por meio de extração etanólica exaustiva em aparelho de Soxhlet e posteriormente concentrado em evaporador rotatório, com pressão reduzida, a temperatura de 65 °C e 150 rpm. A partir do extrato bruto foram obtidas as frações das folhas: n-hexano (82,02 g), clorofórmio (25,94 g), acetato de etila (38,88 g) e foram obtidas as frações das cascas: n-hexano (11,21 g), clorofórmio (25,28 g), acetato de etila (10,68 g), por partição líquido/líquido com solventes de polaridade crescente.

2.3 Toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Os ovos de *Artemia salina* foram estimulados a eclodir para a obtenção dos náuplios. Para isso, os ovos (200 mg/400 mL) foram colocados em solução salina (23 g NaCl; 11 g MgCl · 6H O; 4 g Na SO ; 1,3 g CaCl · 2H O ou CaCl · 6H O; 0,7 g KCl, 1000mL de água destilada, pH 9), sob aeração contínua, exposição à iluminação (20W) e temperatura ambiente durante 48 horas. O ensaio foi realizado para os extratos brutos e suas respectivas frações, das folhas e caules, nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL. As amostras foram diluídas em etanol e colocadas em frascos adequados para a realização do teste. O solvente foi evaporado em estufa a 50°C, 24 horas antes do teste. Como controle positivo, foi utilizado sulfato de quinidina, nas mesmas concentrações das amostras. Também foi realizado o controle com etanol. Todos os testes foram realizados em triplicata. Foram transferidos 30 náuplios de *Artemia salina* para cada frasco contendo as amostras ou controles e o volume foi ajustado para 2,5 mL. Após 24 horas de contato com as amostras, foi realizada a contagem dos indivíduos mortos. Os dados foram submetidos à análise pelo método estatístico Probitos para a determinação dos valores de CL50 com intervalo de confiança de 95%. As amostras foram consideradas tóxicas quando os valores de CL50 se apresentaram menores que 1000µg/mL (MEYER et al., 1982).

2.4 Análise da atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica das amostras, extratos brutos e frações, foi realizada conforme preconizado no manual de Métodos de Controle de Qualidade para Materiais de Plantas Medicinas divulgado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998). A suspensão de hemácias de sangue de carneiro a 2% (v/v), previamente lavadas, foi preparada em tampão fosfato pH 7,4, e então colocada em contato com as amostras nas concentrações de 50, 100, 250 e 500 µg/mL. Após homogeneização, os tubos foram incubados em repouso, a temperatura ambiente durante 180 minutos. Após o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados por

5 minutos, a 2500 r.p.m., e foi verificada a formação de hemólise total (solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos). Para quantificação da menor concentração com atividade hemolítica, as amostras que causaram hemólise no primeiro ensaio foram testadas em concentrações que variaram de 50 até 500 µg/mL, durante 24 horas em temperatura ambiente.

2.5 Avaliação Hemolítica em Placas de Ágar Sangue

Esta análise avalia a capacidade da substância estudada em realizar o rompimento das hemácias liberando hemoglobina no plasma. O ensaio de atividade hemolítica foi realizado segundo a metodologia difusão em Ágar sangue na concentração de 1000 µg/mL, em duplicata. Como controle positivo foi utilizado padrão de saponina na mesma concentração e para controle negativo foi utilizado uma solução salina de 0,9%. Para o ensaio de difusão em ágar utilizou-se a técnica de antibiograma em discos, papéis Whatmann n°1 (7mm de diâmetro, esterilizado) foram distribuídos sobre as placas de ágar sangue e em seguida impregnados com alíquotas de 20 µL das frações anteriormente preparadas. Como controle foi utilizado 20 µL dos respectivos solventes puros, aplicados aos discos. Após a aplicação, os meios foram incubados a 35 °C durante 24 horas. Decorrido este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise (medidos em mm). A presença de saponinas pode gerar ação hemolítica (EFING, 2008).

3. Resultados e Discussão

3.1 Ensaio sistemático de prospecção fitoquímica

O ensaio sistemático tem como objetivo a identificação dos principais grupos do metabolismo secundário das espécies vegetais, através da identificação por reações de precipitação ou coloração. Os resultados obtidos dos grupos de metabólitos secundários para as folhas e cascas do caule da espécie *Dalbergia brasiliensis* podem ser observados no quadro 1.

QUADRO 1. Classe de metabólitos identificados pela análise sistemática fitoquímica em *Dalbergia brasiliensis*

EXTRATO <i>D. BRASILIENSIS</i>	AQUOSO DAS FOLHAS	HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS	AQUOSO DAS CASCAS	HIDROALCÓOLICO DAS CASCAS
Grupo fitoquímico	Taninos condesados	Alcaloides	Taninos condesados	Alcaloides
	Aminogrupos	Flavonoides	Aminogrupos	Flavonoides
		Esteroides / triterpenos	Heterosídeos antocianicos	Esteroides / triterpenos
		Iridoides	Heterosídeos saponínicos	Iridoides

Em estudo de revisão sobre as espécies do gênero *Dalbergia*, Dalarmi et al. (2015) verificam a concentração de compostos químicos de grande interesse farmacológico como isoflavonas, flavonas, neoflavonas, glicosídeos, quinonas, terpenoides, esteroides, cinamil fenóis, quinonas e principalmente, isoflavonoides. Neste ensaio, as reações indicativas de compostos pertencentes a classe dos flavonoides apresentou os resultados mais expressivos. Estes dados contribuem para

o direcionamento das pesquisas na identificação destas substâncias, e desta maneira, auxiliam no processo de escolha do possível marcador fitoquímico como parâmetro de qualidade, tanto para a matéria-prima vegetal, assim como de produtos obtidos desse vegetal.

3.2 Toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

De acordo com Araújo et al. (2010) o bioensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* possui o intuito de monitorar extratos vegetais em diversos laboratórios de produtos naturais. Porém diversos ensaios biológicos simples têm sido desenvolvidos para a mesma função, mas a *A. salina* tem sido incluída na rotina laboratorial para monitorar o estudo de extratos e frações de plantas, além disso para auxiliar no isolamento, purificação e elucidação estrutural de componentes isolados dessas amostras. O ensaio permite a avaliação da toxicidade geral e é considerado essencial como preliminar no estudo de amostras com potencial atividade biológica.

Dessa forma para o extrato bruto etanólico e frações das cascas do caule e das folhas da *D. brasiliensis* no ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo, obteve-se uma CL50 superior a 1000 µg/mL para todas as amostras analisadas. De acordo com Nguta et al. (2011) amostras com valores de CL50 inferiores 100 µg/mL são considerados altamente tóxicas, valores entre 100 e 500 µg/mL são moderadamente tóxicas, entre 500 e 1000 µg/mL são suavemente tóxicas e acima de 1000 µg/mL são atóxicas.

Este ensaio permite ainda o direcionamento de estudos com extratos vegetais, de maneira que substâncias tóxicas para o microcrustáceo podem ser testadas para outros fins, como por exemplo, herbicidas e inseticidas. Por outro lado, compostos que demonstram ausência de toxicidade devem prosseguir para estudos farmacológicos e toxicológicos in vivo para comprovação da sua eficácia e segurança (MEYER et al., 1982).

3.3 Análise da atividade hemolítica em tubos e em placas

Na triagem de atividades biológicas e toxicológicas de extratos vegetais, existe a necessidade da verificação da atividade hemolítica das espécies estudadas, uma vez que o ferro liberado do grupo heme, proveniente da hemoglobina livre no plasma, a partir da ruptura de hemácias, é prejudicial devido aos danos que podem ser causados em órgãos vitais, como fígado e rins (BEDNARCZUK et al., 2010).

Para o teste de atividade hemolítica, as amostras nas concentrações de 50, 100, 250 e 500 µg/mL foram colocadas em contato com sangue de carneiro em suspensão a 2% em tubos de ensaio e apenas a fração hexano do caule apresentou atividade hemolítica. Após este processo a fração hexano foi submetida a outra série de diluições, sendo 350 µg/mL a menor concentração com capacidade hemolítica. Como o extrato bruto do caule não apresentou atividade hemolítica em nenhuma concentração testada pode-se supor que as substâncias hemolíticas presentes neste extrato apenas exercem este efeito em concentrações elevadas, uma vez que o processo de fracionamento promove a concentração de substâncias na amostra. Ou ainda, pode haver a presença de outros compostos no extrato bruto que são capazes de inibir ou neutralizar a ação hemolítica dos compostos da fração hexano, e assim, a atividade hemolítica não é observada para o extrato bruto do caule.

Os resultados da avaliação da atividade hemolítica do extrato bruto e frações das folhas e cascas da *D. brasiliensis*, aplicada com o objetivo de verificar hemólise produzida pelas amostras, em meio de ágar sangue, confirmaram o resultado negativo, ou seja, indicam a não toxicidade nesse modelo de ensaio. Observou-se

que para o teste de difusão em discos não se formaram halos de hemólise nas amostras testadas e nos padrões dos solventes utilizados. O resultado negativo é interessante pois justifica mais pesquisas para o uso dos extratos e frações desta espécie como medicamentos ou outros produtos para uso humano e animal.

4. Conclusão

A espécie *Dalbergia brasiliensis* ocorre de forma natural no cerrado e mata atlântica do Brasil. Muitas espécies do gênero encontram-se ameaçados de extinção. Vários compostos já foram identificados no gênero *Dalbergia*, entre eles destacam-se os isoflavonóides e neoflavonóides. Corroborando com a literatura, no ensaio sistemático de prospecção fitoquímica, apresentado neste estudo, as reações indicativas de compostos pertencentes a classe dos flavonoides apresentou os resultados mais expressivos. Estes dados contribuem para o direcionamento das pesquisas na identificação destas substâncias.

O teste de toxicidade não revelou atividade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, pois todas as amostras apresentaram um valor de CL50 superior a 1000µg/mL, o que evidencia a baixa toxicidade. Na avaliação da atividade hemolítica, o mesmo resultado negativo para toxicidade foi evidenciado nas placas de Agar sangue. Na avaliação em tubos, apenas a fração hexânica das cascas do caule apresentou resultado positivo necessitando de mais estudos para compreender sua atividade tóxica.

A baixa toxicidade dos extratos e frações de *D. brasiliensis* nos testes realizados demonstra o potencial desta planta para futuros estudos de identificação de compostos e de determinação de outras atividades biológicas.

Referências

ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, RCS. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, p.205-209, 2010.

BAROSA, J.; FERREIRA, A.; FONSECA, B.; SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina*. **Poluição e ecotoxicologia marinha**, Nov. 2003.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica. **Visão Acadêmica**, v.11 (2), p.43-50, 2010.

CARVALHO, P.E.R.; VIANA NETO, J.A.A; DALMAS, I. **Comparação entre essências florestais nativas e exóticas em Quedas do Iguaçu, PR: Resultados Preliminares**. Curitiba: EMPRAPA-CNPQ, 1987. (EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica,15).

CARVALHO, P.E.R. **Jacarandá - *Dalbergia brasiliensis***. Curitiba: EMPRAPA-CNPQ, 2004. (EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica,98).

DALARMÍ, L.; SILVA, C.B.; OCAMPOS, F.M.M.; OLIVEIRA, D.S.; BURCI, L.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Evolução na Pesquisa Fitoquímica aplicada às Atividades Biológicas do Gênero ameaçado de extinção *Dalbergia*. **Visão Acadêmica**, v.16, 2015.

DALARMI, L.; SILVA, C.B.; Szabo, E.M.; Oliveira, D.M.S.; Oliveira, M.; OLIVEIRA, V.B.; ZANIN, S.M.W.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G., MIGUEL, M.D. *Dalbergia brasiliensis* Vogel Extracts in vitro Antioxidant Activity and Phytotoxic Effect in *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. **International Journal of Sciences**, v.6, p.80-87, 2017.

EFING, L. M. A. C. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. –Hil.)**. 2008. 108f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná.

FINNEY, D.J. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

HUNG, TH; SO, T.; SRENG, S.; THAMMAVONG, B. BOOUNITHIPHONH C.; BOSHIER, D.H.; MACKAY J.J. Reference transcriptomes and comparative analyses of six species in the threatened rosewood genus *Dalbergia*. **Scientific Reports**, v.10, n.1, p.17749, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-74814-2.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, Â. C.; VEIGA J.R, VALDIR V; GRYNBERG, N.F; ECHVARRIA, Á. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MEYER, B. N. *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta médica**, v.45, n. 5, p.31, 1982.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de Fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**. V. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

NGUTA, J.M. *et al.* Biological screening of kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v.2, p.458-78, 2011.

OMS, Quality Control Methods For Medicinal Plant Material. p. 41, 1998
Saha, S., Anisuzzaman, M., Islam, M.K., Mondal, H., Talukder, C. (2013) Antibacterial and cytotoxic potential of *Dalbergia spinosa* Roxb. leaves. **Int J Pharm Sci Res**, v. 4, p. 512-515, 2013.

VASUDEVA, N.; VATS, M.; SHARMA,SK ; SARDANA, S. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacognosy Review**, v.3, n.6, p.307-319, 2009.

WINFIELD, K., SCOTT, M. & GRAYSON, C. Status global das espécies produtoras de pau-rosa *Dalbergia* e *Pterocarpus* no comércio. na Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas, 17^a Conferência das Partes - Joanesburgo (2016).