

Estudo do efeito radioprotetor do extrato metanólico de *Caesalpinia pyramidalis* sobre células embrionárias de *Biomphalaria glabatra*

M. L. O. Santos¹, W. N Siqueira^{1,2}, L. J. F. Sá¹, L.R.S.Silva^{1,2}, D. L.V Cabral³, F. F. Amâncio¹, A. M. M. A. Melo¹

¹Departamento de Biofísica e Radiobiologia/Laboratório de Biofísica e Radiobiologia/Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Energia Nuclear/ Laboratório de Biofísica e Radiobiologia/Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

³Departamento de Farmácia/ Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT)/Etnobotânica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

Marianasantos UFPE@hotmail.com

(Recebido em 30 de março de 2013; aceite em 03 de setembro de 2013)

A radiação ionizante interage com o meio biológico podendo causar efeitos, como danos no DNA, mutação em cromossomos e morte celular. Por este motivo, atualmente tem-se pesquisado o efeito radioprotetor de diversas substâncias, naturais ou sintéticas, com o intuito de que o benefício trazido pelo uso terapêutico das radiações ionizantes não seja suplantado por seus efeitos nocivos. Portanto, este trabalho visa investigar a possível ação radioprotetora do extrato metanólico da casca e folha da *Caesalpinia pyramidalis*. Os testes foram realizados frente a embriões de *Biomphalaria glabrata*, modelo experimental conhecido como bom indicador da ação de agentes físicos e químicos. O estudo foi realizado com o extrato metanólico da folha e casca de *Caesalpinia Pyramidalis*, formando cinco grupos com 100 embriões cada, sendo os grupos experimentais constituídos por embriões submetidos à presença dos extratos durante 24 horas, incluindo o período da irradiação. As amostras foram irradiadas com as doses de 2,5, 4, 5, 10, 20, 40, 50 e 100 Gy em irradiador gammacell de ⁶⁰Co do Departamento de Energia Nuclear da UFPE. Em seguida, os embriões foram analisados em placas de Petri durante oito dias consecutivos. Os resultados obtidos nos experimentos sugerem que o extrato da casca de *Caesalpinia pyramidalis*, na concentração de 250 ppm, protegeu os embriões irradiados com as doses de 2,5 e 4,0 Gy.

Palavras-chave: irradiação; radioproteção; toxicidade

Study of the radioprotective effect of the methanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on embryonic cells of *Biomphalaria glabatra*

Ionizing radiation interacts with the environment and can cause biological effects such as DNA damage, mutations in chromosomes and cell death. For this reason, it has currently researching the radioprotective effect of various substances, natural or synthetic, with the intention that the benefit brought by the therapeutic use of ionizing radiation is not outweighed by its harmful effects. Therefore, this study aims to investigate the possible radioprotective effect of the methanol extract of the bark and leaves of *Caesalpinia pyramidalis*. The tests were conducted face to embryos of *Biomphalaria glabrata*, an experimental model known as a good indicator of the action of physical and chemical agents. The study was performed with the methanolic extract of the leaf and bark *Caesalpinia pyramidalis*, five groups of 100 embryo each were formed, and the experimental groups consisting embryos subjected to the presence of extracts for 24 hours, including the period of irradiation. The samples were irradiated with doses of 2.5, 4, 5, 10, 20, 40, 50 e 100 Gy in a ⁶⁰Co irradiator Gammacell Department Nuclear Energy UFPE. Then, the embryos were analyzed in a Petri dish for eight consecutive days. The obtained results suggest that the extract of the bark of *Caesalpinia pyramidalis*, the concentration of 250 ppm, protected embryos irradiated with doses of 2.5 and 4.0 Gy.

Keywords: radiation, radiation safety, toxicity

1. INTRODUÇÃO

Radiação é a emissão de energia eletromagnética ou corpuscular, capaz de se propagar em um meio material ou no vácuo. Sob o ponto de vista físico, a radiação, ao interagir com um material, pode provocar excitação ou ionização atômica ou molecular. As interações mais frequentes das

partículas carregadas são com a nuvem eletrônica, mas elas podem também acontecer com o átomo como um todo e com o núcleo [1, 2].

A radiação ionizante interage com o meio biológico podendo causar diversos efeitos, tais como a morte ou a mutação em células, cromossomos e até mesmo o DNA. Essa interação pode ser direta e indireta. Direta quando a radiação age provocando danos nas moléculas de DNA, podendo ocorrer o reparo ou não. Sem o reparo poderá existir mutação que ocasionará efeitos biológicos somáticos, genéticos, morte ou má-formação. Um exemplo de interação direta seria a radiólise da água, efeito da radiação na molécula de água. Por ser a mais abundante em um organismo biológico e por participar praticamente de todas as reações metabólicas de um organismo, é afirmado que em caso de exposição à radiação, suas moléculas são atingidas em maior número. A interação indireta ocorre quando a radiação age sobre íons produzindo radicais livres, entidades químicas altamente reativas, em decorrência da presença de átomos cuja última camada não apresenta o número de elétrons que conferiria estabilidade à estrutura.

A proteção radiológica tem como objetivo evitar ou reduzir os efeitos maléficos das radiações ionizantes sobre o ser humano, sejam elas de origem natural ou de fontes produzidas artificialmente. Sendo assim, para diminuir ou evitar os efeitos biológicos é necessário seguir as normas de radioproteção, as quais dizem respeito às diretrizes básicas de proteção radiológica, níveis de doses para indivíduos ocupacionalmente expostos e níveis de doses para exposição do público. Essas normas direcionam como proteger-se da radiação, instruindo sobre uso dos equipamentos de proteção individual para indivíduos que trabalham diretamente expostos à radiação, como blindagens, dosímetros etc [3].

Apesar do uso de equipamento e normas de radioproteção, surge o interesse em desenvolver substâncias químicas com a função de proteger as células dos efeitos da exposição acidental à radiação ionizante. Essas substâncias são denominadas de radioprotetores, que reduzem os efeitos danosos ao sistema biológico provocado pela radiação ionizante [4]. Estudos realizados por Mutlu-Turkoglu *et al.* [5] referentes à utilização do selênio, vitamina E e a relação de ambos, antes da irradiação abdominal de ratos, mostraram que a administração de antioxidantes anteriormente à irradiação, principalmente o selênio e a vitamina E, demonstraram efeitos protetores sobre os danos intestinais causados pelas radiações ionizantes.

Os radioprotetores podem ser sintéticos, os quais são produzidos artificialmente, ou naturais, como os encontrados em carnes, frutas e vegetais. Dentre os radioprotetores sintéticos, o WR-1065 é conhecido como um notável citoprotetor. Derivado da conversão da amifostina pela fosfatase alcalina, o WR-1065 interage com radicais livres doando íons de hidrogênio que se ligam às moléculas de oxigênio e aos metabólitos ativos dos agentes anti-neoplásicos [6, 7] formando um segundo metabólito, designado WR-33278, cuja formação libera íons de hidrogênio para auxiliar no mecanismo de reparação do DNA celular [8]. No entanto, os produzidos artificialmente geram efeitos colaterais como náuseas, vômito e hipotensão [9]. Por esta razão surgiu o interesse em estudar radioprotetores de origem natural, por serem menos tóxicos ao ser vivo.

Como animais experimentais, foram escolhidos os embriões dos moluscos *B. glabrata* para avaliação dos efeitos biológicos das radiações ionizantes, por possuírem características como: curto ciclo de vida, fácil manutenção em laboratório, baixo custo de manutenção, boa reprodutibilidade e resposta rápida e precisa [10, 11, 12, 13, 14, 15].

A *Caesalpinia pyramidalis* (catingueira) é uma planta da caatinga, locada na região nordeste em grande quantidade e foi selecionada para o bioensaio, por apresentar atividade antiproliferativa e capacidade antioxidante, podendo se tornar um radioprotetor natural, o qual poderá evitar os efeitos colaterais nocivos ao homem, ocasionados pelos radioprotetores artificiais, entre eles, o WR2721. A *Caesalpinia pyramidalis* apresenta um elevado teor proteico e lipídico. Os extratos metanólicos da *Caesalpinia pyramidalis* se destacam por maior atividade antioxidante e correlação com os teores de fenóis totais, apresentando, assim, uma fonte potencial de compostos fenólicos para a aplicação nas indústrias relacionadas à energia nuclear, alimentos e farmacêutica [16].

O presente trabalho teve como objetivo investigar a possível ação radioprotetora do extrato metanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (catingueira) frente a embriões de *Biomphalaria glabrata*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

Amostras de *Caesalpinia pyramidalis* (cascas e folhas) foram coletadas em um fragmento de caatinga arbórea, dentro da Estação Experimental do Estado de Pernambuco "Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária" (IPA), Brasil (localização: 08°14'18.2"S e 35°54'57.1"W). Foram escolhidos vegetais do interior do fragmento, em locais úmidos e com bom estado de conservação, preferenciais para o crescimento da espécie [17]. Os critérios utilizados para a coleta das amostras foram: folhas e cascas íntegras localizadas a partir de 1 metro do solo. Posteriormente, o material foi adequadamente acondicionado e transportado para o laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT) da Universidade Federal de Pernambuco.

2.2. Preparação dos extratos brutos

Os extratos brutos foram obtidos da seguinte forma: as amostras foram submetidas à secagem em ambiente ventilado e na sombra. Em seguida as folhas e caules foram triturados separadamente em moinho de faca. Após este procedimento o material foi peneirado em peneira de malha de 2,0 x 2,0 mm e, posteriormente, colocado em balões de vidro contendo metanol a 80%. Após 72 horas o material foi macerado, filtrado e evaporado no escuro em rotaevaporador (Fisaton modelo 803) no Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT) do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco. Posteriormente as amostras foram pesadas e alicotadas para serem realizados os bioensaios no Laboratório de Radiobiologia no Departamento de Biofísica e Radiobiologia na UFPE.

2.3. Testes com embriões de *Biomphalaria glabrata*

Foram utilizados cerca de 500 embriões de moluscos da espécie *B. glabrata* pigmentados no estágio de blástula, mantidos no moluscário do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Para facilitar a coleta das desovas dos moluscos, foram colocadas tiras de plástico incolor sobre a superfície da água dos aquários. Após 24 horas, as tiras foram retiradas do aquário para que fosse realizada a separação das desovas. Em seguida, os embriões foram separados em grupos, com aproximadamente 100 espécimes, para os ensaios de embriotoxicidade e análise do efeito radioprotetor do extrato.

2.4. Análises do efeito radioprotetor dos extratos da folha e casca da *C. pyramidalis* Tul

Para a realização da irradiação, cinco grupos com 100 embriões cada foram formados, sendo os grupos experimentais constituídos por embriões submetidos a presença dos extratos metanólicos da folha e casca *Caesalpinia pyramidalis* (na concentração de 250 ppm), durante 24 horas, incluindo o período da irradiação. Para a irradiação das amostras com doses de 2,5, 4, 5, 10, 20, 40, 50 e 100 Gy, foi utilizado o irradiador gammacell de ⁶⁰Co (modelo 220-Excel MDS Nordion, taxa de dose de 3,241Gy/h) do Departamento de Energia Nuclear (DEN-CTG) da Universidade Federal de Pernambuco. Em seguida, os embriões foram analisados em placas de Petri durante oito dias consecutivos. A avaliação dos efeitos foi realizada por meio da metodologia padronizada por Okazaki *et al.* [13].

2.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M (Erro padrão da média). A análise estatística foi realizada por meio do teste Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significantes quando p (nível de significância) < 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Embriotoxicidade da *C.pyramidalis*

A figura 1 mostra o gráfico referente à exposição dos embriões ao extrato metanólico da casca da *Caesalpinia pyramidalis* nas concentrações de 0 (controle), 250, 500 e 1000 ppm durante 24 horas.

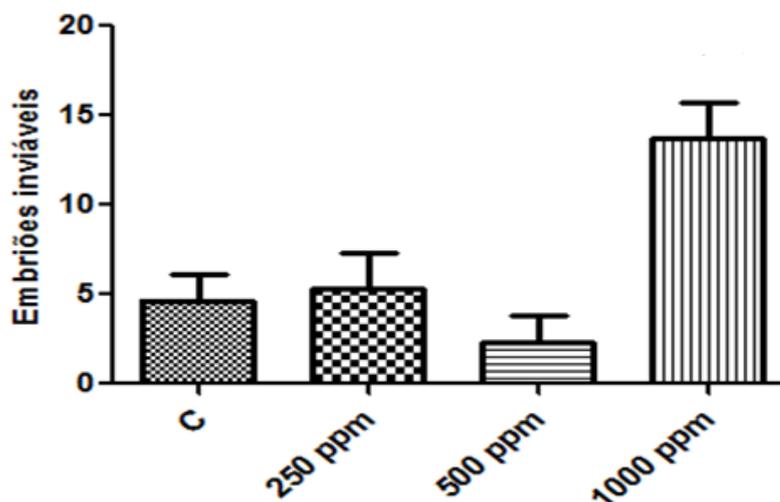


Figura 1: Ensaio realizado com embriões de *Biomphalaria glabrata* em presença do extrato metanólico da casca de *Caesalpinia pyramidalis* para avaliação da toxicidade nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm. O maior número de animais inviáveis em relação ao controle (C) foi obtido com embriões expostos ao extrato na concentração de 1000 ppm.

Podemos observar que os resultados obtidos durante o teste de toxicidade da casca da catingueira mostram que o extrato utilizado nas concentrações 250 e 500 ppm não apresentou embriotoxicidade. Sabe-se que a composição química das espécies da família Fabaceae, a qual pertence à *Caesalpinia pyramidalis*, é representada pela presença em grande quantidade de alcaloides e, algumas vezes, cianoglicosídeos e taninos [18], além de saponinas e antocianinas⁹, estas substâncias estão relacionadas com propriedades moluscicidas. Apesar destas características, não foi observado alta toxicidade, podendo estar correlacionada com uma possível baixa concentração dos níveis de saponinas na casca da *Caesalpinia pyramidalis*. No entanto, na exposição à concentração de 1000 ppm observa-se uma quantidade significativa de embriões inviáveis (mortos e/ou malformados), em relação ao grupo controle e os demais grupos experimentais. Uma possível explicação sugerida para este efeito tóxico está relacionada à presença de um ou mais metabólitos, que após o aumento da concentração, passou a causar danos nos embriões de *B. glabrata*.

Estes resultados contradizem os achados de Albuquerque *et al.* [19], os quais afirmam que estudos farmacológicos de *Caesalpinia pyramidalis* têm demonstrado eficácia na toxicidade em moluscos. Com o intuito de se averiguar novas possibilidades de utilização das plantas do Cerrado, Bezerra *et al* [20] verificaram a ação moluscicida dos extratos da folha e casca do caule de pequi, tendo encontrado como resultado a mortalidade de 90% do molusco *Biomphalaria glabrata*, a partir de 12 horas de exposição aos extratos da folha e casca do caule de pequi a uma concentração de 100 ppm.

Farnworth *et al.* [21] preconizaram que são considerados positivos testes em que extratos de plantas são moluscicida em qualquer concentração até 100 ppm, entretanto quando a concentração utilizada para matar é maior que 100 ppm a substância é considerada um fraco biocida.

3.2. Ensaio para avaliação do efeito radioprotetor do extrato da casca e folha da *C. pyramidalis*

O teste realizado para verificar o efeito do extrato metanólico da casca da *Caesalpinia pyramidalis* frente aos danos causado pela irradiação (figura 2) mostrou que grupos irradiados com doses de 2,5 e 4,0 Gy, na presença do extrato na concentração de 250 ppm, não apresentaram diferenças significativas no número de embriões inviáveis quando comparados a seu respectivo controle não irradiado. Portanto, grupos que receberam doses de radiação de 2,5 e 4,0 Gy não apresentaram elevação do número de embriões inviáveis, em relação aos grupos controles e aos embriões submetidos apenas ao extrato metanólico.

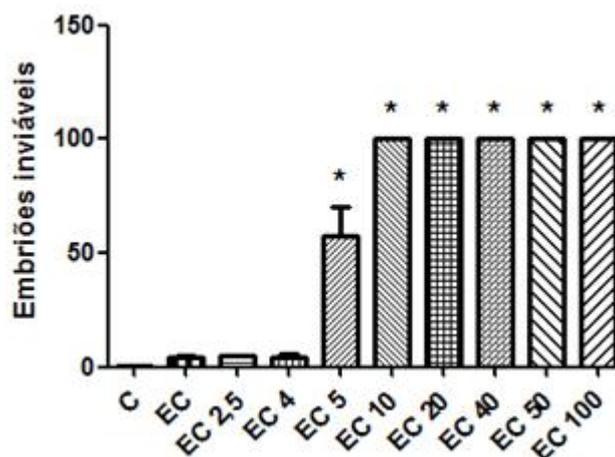


Figura 2: Ensaio realizado com embriões de *Biomphalaria glabrata* em presença do extrato metanólico da casca de *Caesalpinia pyramidalis*, na concentração de 250 ppm, submetidos às radiações de 2,5, 4, 5, 10, 20, 40, 50 e 100 Gy. As letras presentes no eixo x representam os grupos: controle (C), extrato da casca sem ser submetido à radiação (EC), extrato da casca irradiado a 2,5 Gy (EC 2,5), extrato da casca irradiado a 4,0 Gy (EC 4), extrato da casca irradiado a 5,0 Gy (EC 5), extrato da casca irradiado a 10 Gy (EC 10), extrato da casca irradiado a 20 Gy (EC 20), extrato da casca irradiado a 40 Gy (EC 40), extrato irradiado a 50 Gy (EC 50), extrato irradiado a 100 Gy (EC 100). Os dados foram expressos \pm E.P.M. (Erro padrão da média), p (Nível de significância) $< 0,05$, nos quais os embriões submetidos ao extrato da casca da catíngueira mostraram * (Diferença significativa) em relação ao controle.

A exposição às doses de 5, 10 e 20 Gy apresentaram uma elevada quantidade de embriões inviáveis, demonstrando, assim, que nessas doses o extrato da casca não apresentou eficácia radioprotetora.

Análises fitoquímicas realizadas nas folhas de *Caesalpinia pyramidalis* revelaram constituintes como o 4-O- β -glucopiranosiloxi-(Z)-7-ácido-hidroxicinâmico e o ácido-4-O- β -glucopiranosiloxi-(Z)-8-hidrocinâmico, os quais foram detectados como bons antioxidantes [19], podendo justificar a ação radioprotetora nas doses de 2,5 e 4 Gy.

O teste realizado para verificar o efeito do extrato metanólico da folha de *Caesalpinia pyramidalis* frente aos danos causados pela irradiação (figura 3) mostrou que grupos irradiados com doses de 2,5; 4; 5; 10 e 20; 40; 50 e 100 Gy, na presença do extrato na concentração de 250 ppm, apresentaram diferenças significativas no número de embriões inviáveis, quando comparados a seu respectivo controle. Ou seja, grupos que foram expostos à radiação apresentaram um elevado número de embriões inviáveis, em relação aos grupos controles e aos embriões submetidos apenas ao extrato metanólico.

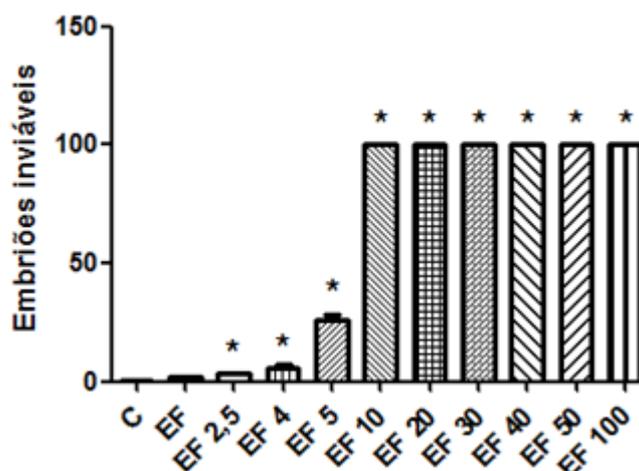


Figura 3: Ensaio realizado com embriões de *Biomphalaria glabrata* em presença do extrato metanólico da folha de *Caesalpinia pyramidalis*, na concentração de 250 ppm, submetido às radiações de 2,5, 4, 5, 10, 20, 30, 40 50 e 100 Gy. As letras presentes no eixo x representam os grupos: controle (C), extrato da folha sem ser submetido à radiação (EF), extrato da folha irradiado a 2,5 Gy (EF 2,5), extrato da folha irradiado a 4,0 Gy (EF 4), extrato da folha irradiado a 5,0 Gy (EF 5), extrato da folha irradiado a 10 Gy (EF 10), extrato da folha irradiado a 20 Gy (EF 20), extrato da folha irradiado a 30 Gy (EF 30), extrato da folha irradiado a 40 Gy (EF 40), extrato da folha irradiado a 50 Gy (EF 50), extrato irradiado a 100 Gy (EF 100). Os dados foram expressos \pm E.P.M. (Erro padrão da média), p (Nível de significância) $< 0,05$. Onde os embriões submetidos ao extrato da folha da catingueira, mostraram * (Diferença significativa) em relação ao controle, quanto ao número de embriões inviáveis.

Segundo Bitelli [2], o efeito das radiações ionizantes em um indivíduo depende basicamente da dose absorvida, da taxa de exposição (crônico-aguda) e da forma de exposição (corpo inteiro/localizada).

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos, foi detectada a ação radioprotetora do extrato da casca da catingueira nas doses de 2,5 e 4 Gy de fontes de ^{60}Co , logo pode ser um futuro radioprotetor de origem natural.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o extrato da casca de *Caesalpinia pyramidalis* apresenta efeito radioprotetor para exposição à radiação para as doses de 2,5 e 4,0 Gy. No entanto se faz necessária à utilização de uma metodologia mais sofisticada para elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade radioprotetora das substâncias presentes no extrato.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, pela irradiação das amostras e ao Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT) do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco pela preparação dos extratos.

1. OKUNO, E. Radiações: efeitos, riscos e benefícios. São Paulo: HARBRA, 2010. 8
2. BITELLI, T. Física e dosimetria das radiações. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 442 p.
3. Comissão Nacional de Energia Nuclear CNEN. Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica. Norma CNEN-NE-3.01, disponível em <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas/normas.asp?grupo=3>, acessado em 15.09.2012.

4. ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, n. 5, p. 675-705, 1996.
5. MUTLU-TURKOGLU, U.; ERBIL, Y.; OZTEZCAN, S.; OLGAC, V.; TOKER, G.; UYSAL, M. The effect of selenium and/ or vitamin e treatments on radiation-induced intestinal injury in rats. *Life Sciences*, v. 66, p. 1905-1913, 2000.
6. CALABRO-JONES, P. M.; FAHEY, R. C.; SMOLUK, G. D., WARD. J. F. Alkaline phos-phatase promotes radioprotection and accumulation of WR-1065 in V79-171 cells incubated in medium containing WR-2721. *International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics, Chemistry & Medicine*, v. 47, p. 23-27, 1985.
7. CAPIZZI, R. L. Amifostine: The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapy. *Seminars in Oncology*, v. 23, p. 2-17, 1996.
8. VAN DER VIJGH, W. J. F.; PETERS, G. J. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (Ethiol): preclinical aspects. *Seminars in Oncology*, v. 21, p. 2-7, 1994.
9. LIST, A. F.; HESTON, R.; GLINSMANN-GIBSON, B.; CAPIZZI, R. L. Amifostine protects primitive hematopoietic progenitors cytotoxicity. *Seminars in Oncology*, v. 23, n. 4, p. 58-63, 1996.
10. LIARD, F.; CHIRRIBOGA, J.; PELLEGRINO, J. Effect of radiation on the reproductive potential of *Biomphalaria glabrata*. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*, v. 1, p. 157-162, 1968.
11. MUZINGER, A. *Biomphalaria glabrata*, a suitable organism for a biotest. *Environmental Technology Letters*, v. 8, p. 141-148, 1987.
12. OKAZAKI, K.; KAWANO, T. Morphogenetic and cytogenetic effects of Co60 Gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* embryos (SAY, 1818). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 251, 1989.
13. OKAZAKI, K.; ANDRADE, H. F.; KAWANO, T. Effect of 60Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 29, p. 1057-1067, 1996.
14. MELO, A. M. M. A.; OKAZAKI, K.; KAWANO, T. Study of 60Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) embryos. *Journal of Medical and Applied Malacology*, v. 8, p. 140-141, 1996.
15. CANTINHA, R. S.; NAKANO, E.; BORRELY, S. ; AMARAL, A. J.; SILVA, L. R. S.; MELO, A. M. M. A. Effects of High dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. *International Journal of Low Radiation*, v. 4, p. 245-251, 2010.
16. MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vannilin-HCL method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 19, n. 4, p. 613-621, (1993).
17. ARAÚJO, E. L. Aspectos da dinâmica populacional de duas espécies em floresta tropical seca (caatinga), Nordeste do Brasil. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
18. JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. 3rd ed. Sunderland: Sinauer, 2008.
19. ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 114, p. 325-354, 2007.
20. BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Rev. Fitoterapia*, Dublin, 2002.
21. FARNSWORTH, N. R.; HENDERSON, T. O.; SOEJARTO, D. D. Plants with Potential Molluscicides. In: K.E. Mott, *Plant Molluscicides*. Chichester and Elsewhere, John Wiley & Sons Ltd/UNDP/ WORLD BANK/WHO, p. 131-204, 1987.