

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS ETANÓLICO E HEXÂNICO DE FOLHAS DE *Rosmarinus officinalis* L. EM MODELO DE *Artemia salina*

Maria Fernanda Soares Reis¹, Rubens Barbosa Rezende¹, Leonan Iago de Castro Rezende e Santos^{1,2} Lorena Cristina Lana Pinto¹

¹Centro Universitário Santa Rita, Conselheiro Lafaiete, Brasil
(mariareis362@gmail.com)

²Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil

Resumo: O uso de plantas medicinais é amplamente difundido, destacando-se *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) por suas propriedades biológicas. Este estudo avaliou a toxicidade dos extratos etanólico e hexânico por bioensaio com *Artemia salina* e análise fitoquímica. Observou-se toxicidade moderada no extrato etanólico ($CL_{50}=102 \mu\text{g/mL}$) e alta no hexânico ($CL_{50}=12,98 \mu\text{g/mL}$), associada a compostos lipofílicos.

Palavras-chave: Alecrim; *Artemia salina*; Extrato; *Rosmarinus officinalis*; Toxicidade.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para promover, manter e restaurar a saúde é uma prática antiga, que tem se desenvolvido de maneira significativa ao longo dos anos (Souza *et al.*, 2019). Amaral e colaboradores (2021) mencionam que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial depende de medicamentos à base de plantas para cuidados primários de saúde, evidenciando a sua importância na medicina tradicional.

O Brasil, com sua vasta biodiversidade de espécies vegetais, possui um grande potencial para a descoberta de novas substâncias com propriedades terapêuticas (Forzza *et al.*, 2012). No entanto, essa diversidade não garante que todas as espécies sejam seguras para uso medicinal e, muitos compostos vegetais, ainda carecem de estudos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos aprofundados (Cunha, 2014).

A espécie *Rosmarinus officinalis*, pertence à família Lamiaceae e é conhecida popularmente como alecrim. É uma planta nativa da região mediterrânea da Europa, mas atualmente é cultivada em diversas regiões tropicais, incluindo o Brasil, onde pode ser encontrada tanto em quintais residenciais quanto em mercados de plantas medicinais, na forma in natura ou seca (Amaral *et al.*, 2021).

O alecrim é amplamente utilizado na culinária e na cosmética, sendo valorizado por seu aroma refrescante e propriedades terapêuticas (Genena, 2005). Além disso, na medicina popular, é empregado para o tratamento de diversas condições,

como problemas digestivos, circulatórios e reumáticos, além de suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias (Naghibi *et al.*, 2005; Lorenzi; Matos, 2006;).

Esses efeitos terapêuticos estão diretamente relacionados à sua composição fitoquímica. Estudos indicam que os métodos de extração utilizados em laboratório influenciam a composição dos extratos obtidos, uma vez que a polaridade do solvente pode afetar a extração de substâncias como flavonoides, ácidos fenólicos e terpenos, impactando significativamente o perfil químico do extrato e, consequentemente, suas propriedades biológicas (Rockenbach *et al.*, 2008; Vongsak *et al.*, 2013).

Apesar de amplamente utilizadas pela população, plantas medicinais nem sempre são empregadas de forma segura. O uso popular, muitas vezes baseado em tradições orais, pode envolver preparações caseiras sem padronização, o que aumenta o risco de intoxicações, principalmente quando não se conhece a dose adequada, o tempo de uso ou possíveis interações com outros medicamentos (Veiga Junior; Pinto; Maciel, 2005).

Por isso, é fundamental que o consumo dessas plantas seja baseado em informações confiáveis e cientificamente validadas. O Ministério da Saúde, por meio da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), destaca espécies com potencial terapêutico e orienta sobre seu uso seguro. No entanto, muitas dessas plantas ainda carecem de estudos que avaliem seus efeitos adversos em diferentes formas de preparo e concentrações.

Nesse contexto, a avaliação da toxicidade por meio de bioensaios simples e eficazes torna-se essencial.

Para avaliar os possíveis efeitos tóxicos desses compostos, o bioensaio com *Artemia salina* é amplamente utilizado como um método preliminar de triagem na toxicologia de extratos vegetais (Araújo *et al.*, 2010). Esse microcrustáceo é um organismo modelo devido à sua alta sensibilidade a substâncias bioativas, permitindo a estimativa da toxicidade com base na taxa de mortalidade dos náuplios expostos a diferentes concentrações do extrato (Meyer *et al.*, 1982). Além de ser um teste simples e de baixo custo, seu resultado pode ser correlacionado com os dados fitoquímicos, possibilitando a identificação de quais classes de substâncias estão associadas a potenciais efeitos tóxicos (Amarante *et al.*, 2011).

Diante disso, este estudo se justifica pela necessidade de compreender a relação entre a composição química dos extratos de *Rosmarinus officinalis* e sua toxicidade, contribuindo para o uso seguro dessa planta medicinal e para o desenvolvimento de fitoterápicos mais eficazes. Assim, objetiva-se avaliar a toxicidade dos extratos etanólico e hexânico por meio do bioensaio com *Artemia salina*, caracterizar qualitativamente seu perfil fitoquímico e correlacionar as classes químicas identificadas com os efeitos tóxicos observados.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos laboratórios de Ciências Citohistopatológicas e Ciências Químicas do Centro Universitário Santa Rita – UNIFASAR, localizado no município de Conselheiro Lafaiete-MG, Brasil.

As etapas de realização do estudo incluíram: a) aquisição do material vegetal, b) preparo dos extratos, c) testes fitoquímicos qualitativos para identificação de grupos de metabólitos secundários, d) bioensaio com *Artemia salina* para avaliação da toxicidade e, por fim, e) análise e interpretação dos dados obtidos. Abaixo estão descritas, em maior detalhe, as etapas.

Aquisição e preparo do material vegetal

O material vegetal utilizado foi composto de folhas secas de *Rosmarinus officinalis*, adquiridas em uma loja de produtos naturais de Conselheiro Lafaiete, no mês de março de 2025.

Obtenção do extrato etanólico bruto

Com base no protocolo descrito por Neves (2021) com adaptações, para a obtenção do extrato etanólico bruto, pesaram-se 200 g da droga vegetal seca, que

foram transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL. Em seguida, completou-se o volume para 1 L, utilizando-se etanol a 92% (Sul Álcool).

O balão foi vedado e envolto com papel-alumínio, com o objetivo de proteger as substâncias bioativas da degradação pela luz. A solução foi, então, submetida ao processo de maceração, por um período de 7 dias, à temperatura ambiente, com leve agitação diária.

Após o período de maceração, a mistura foi filtrada utilizando-se um funil revestido com gaze. O material sólido remanescente (torta) foi então submetido a uma segunda e terceira extração, utilizando o mesmo volume de etanol 92% e repetindo o procedimento de maceração descrito anteriormente.

Após a última maceração, a mistura foi novamente filtrada com o objetivo de reter partículas maiores. Os três filtrados foram reunidos e, em seguida, submetidos à evaporação utilizando um rotavapor (Modelo TE-221, TECNAL) sob temperatura controlada (50 °C) até a completa eliminação do solvente, obtendo-se, assim, o extrato bruto seco.

As etapas principais do preparo do extrato etanólico estão representadas na Figura 1. De forma esquemática, o processo também pode ser visualizado no fluxograma da Figura 2.



Figura 1 - Etapas preparo do extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis*. Legenda: (A) material vegetal seco transferido para balão volumétrico contendo 1 L de etanol a 92%, (B) balão vedado e envolto com papel-alumínio, (C) evaporação do solvente e (D) extrato etanólico seco obtido após a evaporação total do solvente. Fonte: Autores, 2026.

Decorrido este processo, o rendimento do extrato bruto foi calculado pela seguinte equação (Campos, 2019):

$$Rf: \frac{M_{\text{ext}} (g)}{M_{\text{folhas}} (g)} \times 100 \quad (1)$$

Onde: Rf é o rendimento final do extrato (%);
M_{ext}, a massa do extrato seco (g);
M_{folhas}, a massa do material vegetal seco utilizado (g).

Obtenção do extrato hexânico bruto

A obtenção do extrato hexânico bruto foi realizada de acordo com o mesmo protocolo descrito para o extrato etanólico, substituindo-se apenas o solvente por hexano (p.a., Neon). Foram utilizados 200 g do material vegetal seco, transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com hexano. O material permaneceu em maceração por 7 dias, à temperatura ambiente, com agitação diária. Após esse período, seguiram-se as mesmas etapas de filtração e repetição do processo de extração por mais duas vezes, utilizando o mesmo volume de solvente. Todas as frações foram reunidas e submetidas à evaporação em rotavapor (Modelo TE-221, TECNAL), sob temperatura controlada (40 °C), até a completa eliminação do solvente, obtendo-se o extrato hexânico bruto seco.

Decorrido este processo, o rendimento do extrato bruto foi calculado conforme a equação previamente apresentada. De maneira semelhante, as etapas de obtenção do extrato hexânico estão resumidas no fluxograma da Figura 2.

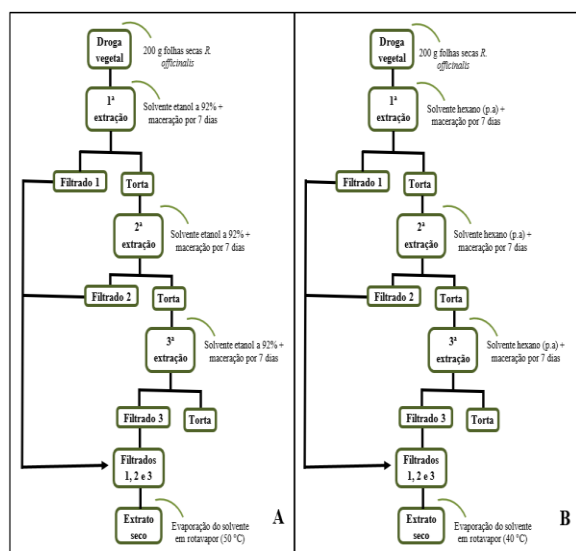


Figura 2 - Fluxogramas do preparo dos extratos etanólico e hexânico de folhas secas de *R. officinalis*.

Legenda: (A) preparo do extrato etanólico e (B) preparo do extrato hexânico. Fonte: Autores, 2026.

Análise fitoquímica qualitativa

A análise fitoquímica qualitativa foi realizada com o objetivo de identificar os principais grupos de substâncias bioativas presentes nos extratos etanólico e hexânico de *Rosmarinus officinalis*. Para isso, foram aplicados testes colorimétricos específicos, que possibilitam a detecção de diferentes classes de metabólitos secundários, como fenóis, flavonoides, saponinas e terpenoides, conforme metodologia descrita por Matos (2009); Mota (2024), com adaptações.

Devido à baixa solubilidade do extrato hexânico em meios aquosos, nas análises que requerem o uso de água como solvente (testes de fenóis e flavonoides), o extrato foi previamente solubilizado em uma pequena quantidade de álcool etílico 95% (p.a. – A.C.S., Dinâmica) antes da adição dos reagentes. Além disso, o teste para saponinas foi aplicado somente ao extrato etanólico, devido a insolubilidade do hexano em meio aquoso e visto que o hexano, por ser um solvente apolar, não extrai esse metabólito de natureza polar em quantidades detectáveis para análise fitoquímica qualitativa.

Teste para fenóis

Para a identificação de fenóis, 10 mg de cada extrato foram solubilizados com 2 mL de água destilada e, em seguida, filtrados, utilizando papel filtro. Logo após, foram adicionados cinco gotas de cloreto férrico a 2% (FeCl₃). A formação de uma coloração verde acastanhada ou preto-azulada é indicativo da presença de fenóis. Para controle, foi preparado um tubo contendo apenas água destilada e o FeCl₃ a 2%, a fim de identificar possíveis alterações de cor não relacionadas aos compostos fenólicos do extrato.

Teste para flavonoides

Para a detecção de flavonoides, foram pesados 10 mg de cada extrato e dissolvidos em 2 mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 2%. O aparecimento de uma coloração amarela indica a presença de flavonoides. Paralelamente, foi preparado um tubo controle contendo 10 mg dos extratos dissolvidos em 2 mL de água destilada.

Teste para terpenoides

Para a detecção de terpenoides, foi realizado o teste de Salkowski. Nesse procedimento, 10 mg de cada extrato foram dissolvidos em 2 mL de clorofórmio



(CHCl₃, p.a., – A.C.S., Synth). Em seguida, adicionaram-se 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄, concentrado, Synth) lentamente pela parede do tubo, para formação de camadas distintas. A presença de terpenoides é confirmada pela formação de uma coloração marrom-avermelhada na interface. Paralelamente, foi preparado um tubo controle contendo apenas clorofórmio e ácido sulfúrico nas mesmas proporções.

Teste para saponinas

Para a identificação de saponinas, foram pesados 10 mg do extrato etanólico, e dissolvido em 5 mL de água destilada em um tubo de ensaio com tampa. O tubo foi agitado vigorosamente por 3 minutos. Após a agitação, o tubo foi deixado em repouso por 15 minutos. A formação de espuma estável por mais de 5 minutos é considerada indicativa da presença de saponinas.

Bioensaio com *Artemia salina*

O bioensaio com *Artemia salina* foi utilizado como método preliminar de avaliação da toxicidade dos extratos de *Rosmarinus officinalis*. Este ensaio é amplamente reconhecido por sua simplicidade, baixo custo, rapidez e segurança, não exigindo condições complexas de laboratório e sendo útil para triagem inicial de substâncias com potencial atividade biológica (Cavalcante *et al.*, 2000; Hirota *et al.*, 2012).

Eclosão dos náuplios de *Artemia salina*

A etapa de eclosão dos cistos de *Artemia salina* seguiu a metodologia adaptada de Meyer e colaboradores (1982). Os cistos foram adquiridos comercialmente (InsetoLab) e mantidos em um recipiente fechado, em um local seco e fresco até o momento da utilização. Inicialmente, preparou-se uma solução salina utilizando sal marinho, em água destilada, na proporção de 30 g/L. O pH da solução foi ajustado para valores entre 8,0 e 9,0 por meio da adição gradual de gotas de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L.

Para simular um ambiente semelhante ao de um aquário, um balão volumétrico de 2000 mL foi preparado para receber aeração constante, promovida pela saída de ar da bomba de vácuo (TECNAL, Modelo R-TE-0582), e uma fonte luminosa foi posicionada próxima ao recipiente para garantir a iluminação, favorecendo a eclosão dos náuplios. O ambiente de incubação foi mantido em temperatura ambiente. Nesse balão foram adicionados 1000 mL da solução salina preparada anteriormente,

juntamente com 0,25 g de cistos de *Artemia salina*. Após 24 horas foi observada a eclosão dos ovos, e após 48 horas as Artemias já estavam prontas para serem imediatamente utilizadas nos bioensaios de toxicidade (Santos *et al.*, 2023).

Preparação da soluções-mãe

A solução-mãe concentrada foi preparada com o intuito de facilitar a realização das diluições subsequentes e obter concentrações uniformes para o ensaio de toxicidade. Para a preparação, utilizaram-se os extratos etanólico e hexânico de *R. officinalis*.

Para cada extrato, 0,1563 g do material seco foi primeiramente dissolvido em 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO 1%). Para garantir a completa homogeneização, as soluções foram levadas ao banho-maria a 45 °C até solubilização total do extrato. Em seguida, o volume foi completado para 50,0 mL em um balão volumétrico, utilizando a água salina. A concentração final da solução-mãe foi de 3,125 µg/mL.

Preparação das soluções-teste e montagem do ensaio

A partir da solução-mãe foram preparadas as soluções-teste nas concentrações finais de 5, 25, 125, 625 e 3,125 µg/mL. Cada concentração foi preparada em triplicata para assegurar a reprodutibilidade dos resultados. Para a realização das diluições, foi utilizada solução salina. As diluições foram realizadas de modo a garantir que o solvente DMSO fosse mantido na concentração final de 1% em todas as soluções-teste.

Em cada tubo foram adicionados 10 náuplios de *Artemia salina* com o auxílio de uma pipeta e sob iluminação proporcionada pela lâmpada utilizada no experimento, e o volume final de cada tubo foi de 5 mL.

Paralelamente, objetivando verificar se o solvente apresenta efeito tóxico sobre os náuplios de *Artemia*, foram preparados dois controles: um controle negativo (CN), contendo apenas 5 mL de solução salina e 10 náuplios de *Artemia*, e um controle solvente (CS) contendo 0,05 mL de DMSO puro e solução salina com volume final de 5,0 mL. Os tubos foram mantidos sob iluminação constante por 24 horas.

Contagem dos náuplios após a exposição

A contagem de náuplios vivos e mortos foi realizada após 24 horas de exposição. Para a contagem, cada tubo de ensaio foi examinado individualmente, sendo aproximado da fonte de luz utilizada na incubação.



Essa técnica permitiu a visualização direta dos organismos, otimizando a contagem. Consideram-se vivos os náuplios que apresentavam qualquer tipo de motilidade ativa (nadando), sendo assim, náuplios que não demonstravam motilidade, mesmo após agitação suave do tubo, foram considerados mortos, seguindo o protocolo de Meyer e colaboradores (1982).

Validação do ensaio

Para assegurar que a toxicidade observada seja atribuída apenas aos extratos testados, a mortalidade dos controles deve ser avaliada e, se necessário, corrigida. O protocolo da WHO (2016) estabelece que, se a mortalidade do grupo controle for superior a 20%, os testes devem ser descartados e repetidos. Se a mortalidade for inferior a 5%, nenhuma correção será necessária, porém, uma mortalidade superior a 5% requer correção.

Dessa forma a porcentagem de mortalidade dos controles foram calculados com base no número de náuplios mortos em relação ao total de organismos expostos, segundo a fórmula (Borges, 2025):

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{N_m}{N_t} \times 100 \quad (2)$$

Onde: N_m = número de náuplios mortos após 24 horas de exposição;

N_t = número total de náuplios utilizados em cada ensaio.

Dessa forma, após obter a porcentagem de mortalidade bruta de ambos os controles (negativo e solvente), a média para cada controle foi calculada a partir das três réplicas, e o maior valor obtido foi utilizado como referência para a validação e posterior correção.

Correção da mortalidade

No experimento a correção da mortalidade foi necessária e, conforme os critérios de validação, o ajuste da mortalidade bruta foi realizado utilizando a fórmula de Abbott (1925):

$$\% \text{ mortalidade (corrigida)} = \frac{\% \text{ mortalidade teste} - \text{controle}}{100 - \text{controle}} \times 100 \quad (3)$$

Os valores de mortalidade corrigida obtidos para as três repetições por concentração foram inseridos diretamente no *software GraphPad Prism* versão 10.6.1.

Análise estatística e determinação da CL_{50}

A concentração letal média (CL_{50}) dos extratos foram determinados através da regressão não-linear no *software GraphPad Prism* (versão 10.6.1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento dos extratos

Conforme apresentado na Tabela 1, o rendimento do extrato etanólico foi de 10,41% e o extrato hexânico foi de 3,71%. O maior rendimento observado para o extrato etanólico pode estar relacionado à polaridade intermediária do solvente, sendo capaz de solubilizar uma ampla gama de substâncias, desde polares (como fenólicos e flavonoides) até substâncias apolares (como terpenoides), conforme descrito por Sultana, Anwar; Ashraf (2009), Anokwuru *et al.* (2011) e Silva (2021).

Tabela 1. Comparação dos rendimentos (%) dos extratos etanólico e hexânico de *R. officinalis* obtidos no presente estudo e por Zeroual *et al.* (2022).

Solvente	Presente estudo (%)	Zeroual <i>et al.</i> (2022) (%)
Etanólico	10,41	13,31
Hexânico	3,71	5,14

Fonte: Autores, 2026.

Por outro lado, o extrato hexânico, por ser um solvente de baixa polaridade, tende a extrair principalmente lipídios, terpenoides e compostos apolares, o que pode explicar o menor rendimento em comparação com o extrato etanólico, conforme discutido por Palaogiannis e colaboradores (2023).

No estudo de Zeroual e colaboradores (2022), utilizando a mesma técnica de extração por maceração, o rendimento do extrato etanólico de alecrim foi de 13,31%, enquanto o extrato hexânico apresentou rendimento de 5,14%. Comparando com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se que o extrato etanólico também apresentou rendimento superior ao extrato hexânico, seguindo a mesma tendência. Embora pequenas diferenças nos valores possam ocorrer devido a variações na origem do material vegetal, condições de secagem e pureza dos solventes, o padrão de maior rendimento para o



extrato etanólico reforça que a polaridade do solvente é um fator determinante no processo de extração, influenciando a quantidade de substâncias bioativas extraídas.

Perfil fitoquímico qualitativo

A análise fitoquímica qualitativa permitiu identificar classes distintas de metabólitos secundários presentes nos extratos de *R. officinalis*. A seguir, são apresentados os resultados obtidos para fenóis, flavonoides, terpenoides e saponinas.

Fenóis

A presença de fenóis foi identificada nos extratos etanólico e hexânico, evidenciada pelo aparecimento de uma coloração preto-azulado. Nos tubos controle (FeCl_3 + água) não houve alteração de cor, o que valida o ensaio realizado.

Essa coloração característica ocorreu devido à adição do reagente cloreto férrico (FeCl_3 2%), que promoveu a formação de complexos entre os íons Fe^{3+} e os grupos hidroxila dos compostos fenólicos, alterando a absorção de luz e confirmando a presença desses metabólitos (Pazinato *et al.*, 2012).

Esses resultados estão em concordância com a literatura, uma vez que outros autores também relataram a presença de compostos fenólicos em *R. officinalis* utilizando diferentes metodologias de extração e análise. No estudo de Genena (2005) o autor identificou o isocarnosol, um diterpeno fenólico característico da espécie, em extrato etanólico obtido por Soxhlet e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). De forma complementar, Ibrahim *et al.* (2022) observaram predominância de diterpenos fenólicos, incluindo rosmanol, carnosol, ácido carnósico e rosmadial, no extrato hexânico, por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray de alta resolução (LC-ESI-HRMS).

Embora o teste qualitativo realizado não permita a identificação individual dos fenóis presentes em *R. officinalis*, a literatura relata que os principais compostos fenólicos encontrados são ácido rosmarínico, ácido cafeico, carnosol e ácido carnósico (Naghib *et al.*, 2005; Begum *et al.*, 2013). A presença desses metabólitos está associada a propriedades antioxidantes, como a neutralização de radicais livres e a redução da peroxidação lipídica (Peres *et al.*, 2021).

Flavonoides

A presença de flavonoides foi evidenciada no extrato etanólico pelo teste com NaOH 2%, em que se observou a coloração amarelada, indicando resultado positivo. No tubo controle (extrato + água destilada) não houve alteração de cor, o que valida o ensaio. A reação observada ocorreu devido à presença de grupos hidroxila (-OH), ligados aos anéis aromáticos dos flavonoides. Na presença de uma base forte (NaOH), esses grupos são desprotonados, provocando alterações na distribuição eletrônica da molécula e, consequentemente, a mudança de cor observada (Harborne, 1998; Mota, 2024).

O extrato hexânico, por outro lado, não apresentou mudança de coloração perceptível, indicando ausência da substância, ou concentrações muito pequenas, não detectadas pela sensibilidade do teste qualitativo. O tubo controle (extrato + água destilada) também não apresentou alteração de cor, reforçando a confiabilidade do ensaio.

Os resultados obtidos neste ensaio estão em conformidade com os descritos na literatura. Mohammed, Oba e Aydinlik (2022), ao realizarem uma triagem fitoquímica preliminar do extrato etanólico do alecrim, também relataram a presença de flavonoides. Os flavonoides apresentam uma variedade de atividades farmacológicas, incluindo efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antiviral, antibacteriano, antialérgico e anticarcinogênico (Simões *et al.*, 2010; Bessa *et al.*, 2013).

Por outro lado, não foram encontrados artigos que relatassem a presença de flavonoides em extratos hexânicos de *R. officinalis*, mesmo quando empregadas técnicas analíticas avançadas. Ibrahim e colaboradores (2022), por exemplo, traçaram o perfil fitoquímico do extrato hexânico de folhas de alecrim por meio de GC/MS e LC-ESI-HRMS, identificando 47 e 31 compostos, respectivamente, com destaque para triterpenoides, monoterpénoides e diterpenos fenólicos, mas sem a detecção de flavonoides. Já no estudo de Esati e colaboradores (2024), foram relatados baixos teores de flavonoides na fração n-hexano de *R. officinalis*, obtida a partir de um extrato etanólico inicial, o que reforça que o solvente hexano isoladamente não é eficiente na extração de flavonoides, devido à sua baixa polaridade.

Terpenoides

A presença de terpenoides foi identificada nos extratos etanólico e hexânico, evidenciada pela formação de uma coloração marrom-avermelhada na interface (duas fases distintas). Nos tubos controle (clorofórmio + ácido sulfúrico) não houve alteração de cor, o que valida o ensaio.

A positividade do teste para terpenoides em ambos os extratos é um resultado esperado. Segundo Jiang,



Kempinski e Chappell (2016), os terpenoides apresentam diversidade química caracterizada por modificações estruturais na molécula, como, adição de açúcares ou ácidos graxos, e presença de grupos funcionais, como álcoois e cetonas. Essas variações estruturais conferem aos terpenoides ampla faixa de polaridade, o que possibilita sua extração tanto por solventes de polaridade intermediária, como o etanol, quanto por solventes apolares, como o hexano.

Saponinas

A presença de saponinas foi observada no extrato etanólico, evidenciada pela formação de uma camada de espuma persistente por mais de cinco minutos após agitação vigorosa do extrato com água destilada. A espuma no teste ocorre pelo fato de as saponinas apresentarem uma natureza anfifílica, com regiões hidrofílicas, que interagem com a água, e regiões hidrofóbicas, que se associam ao ar. Durante a agitação, essas propriedades promovem a formação de micelas estáveis, responsáveis pela formação e persistência da espuma observada no teste (Kumaradewi *et al.*, 2021).

O teste de formação de espuma não foi aplicado ao extrato hexânico. Uma vez que as saponinas são glicosídeos de alta polaridade e o método de detecção exige a solubilização do extrato em meio aquoso. O extrato hexânico é insolúvel em água, o que inviabilizaria a análise e resultaria em um teste inconclusivo.

Mohammed, Oba e Aydinlik (2022), em seus estudos com extrato etanólico de alecrim, também relataram a presença de saponinas. Tais substâncias desempenham diversas funções biológicas e farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antifúngica e efeito hipocolesterolêmico (Penteado; Cecy, 2006; Nsanzamahoro *et al.*, 2024).

Resumo do perfil fitoquímico qualitativo

Para facilitar a visualização dos resultados obtidos nos testes fitoquímicos qualitativos, elaborou-se a Tabela 2, que apresenta de forma resumida a presença (+) ou ausência (–) das principais classes de metabólitos secundários identificadas nos extratos etanólico e hexânico de *R. officinalis*.

Tabela 2. Resumo do perfil fitoquímico qualitativo dos extratos etanólico e hexânico de *R. officinalis*.

Classe de metabólito	Extrato etanólico	Extrato hexânico
Fenóis	+	+

Flavonoides	+	–
Terpenoides	+	+
Saponinas	+	n. a

Legenda: *n.a. = não analisado, devido à insolubilidade do extrato hexânico em meio aquoso.
Fonte: Autores, 2026.

Bioensaio com *Artemia salina*

Após a determinação do perfil fitoquímico, a toxicidade preliminar dos extratos etanólico e hexânico de *Rosmarinus officinalis*, concentrações finais de 5, 25, 125, 625 e 3,125 µg/mL, foi avaliada por meio do bioensaio com *Artemia salina*. A seguir, são apresentados os resultados da análise da curva dose-resposta, a determinação da concentração letal média CL₅₀ e a discussão sobre o potencial tóxico de cada extrato.

Validação do ensaio

Após 24 horas de exposição, a porcentagem de mortalidade bruta foi determinada para os controles, seguindo o cálculo descrito na seção 3.5.4.1 apresentando os seguintes resultados (Tabela 3):

Tabela 3. Mortalidade média dos grupos controle no bioensaio com *A. salina*.

Controle	% de mortalidade média ($\bar{x}$)	Desvio padrão (DP)
Negativo (CN)	3,33%	±5,77
Solvente (CS)	6,67%	±11,55

Fonte: Autores, 2026.

A mortalidade média máxima entre os grupos controle foi de 6,67%, obtida no grupo controle solvente. Visto que este valor é inferior a 20%, o ensaio é considerado válido. Contudo, como o valor é superior a 5%, foi aplicada a fórmula de Abbott (1925) para a correção da mortalidade bruta de todos os extratos, procedimento detalhado no item 5.3.2.

Mortalidade corrigida

Após a validação do ensaio, o cálculo para mortalidade corrigida utilizando a fórmula de correção de Abbott (1925), conforme o detalhamento metodológico da seção 3.5.4.2. foi aplicado cada réplica da concentração. Após os ajustes, os dados

foram inseridos no *software GraphPad 10.6.1* (Tabela 4 e 5), para a construção das curvas dose-resposta e cálculo dos valores da CL_{50} .

Tabela 4. Inserção dos dados de mortalidade corrigida do extrato etanólico no *software GraphPad Prism 10.6.1*

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% mortalidade corrigida		
	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3
5	14.3	14.3	25.0
25	46.4	46.4	35.7
125	35.7	57.1	57.1
625	46.4	57.1	57.1
3125	100.0	100.0	100.0

Fonte: Autores, 2026.

Tabela 5. Inserção dos dados de mortalidade corrigida do extrato hexânico no *software GraphPad Prism 10.6.1*

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% mortalidade corrigida		
	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3
5	46.4	46.4	35.7
25	46.4	57.1	57.1
125	78.6	67.8	67.8
625	100.0	100.0	89.3
3125	100.0	100.0	100.0

Fonte: Autores, 2026.

Concentração letal média (CL_{50}) extrato etanólico

Com base nos dados de mortalidade corrigida, a relação dose-resposta foi analisada por meio da regressão não-linear. A Figura 3 exibe a curva dose-resposta do extrato etanólico, mostrando a relação entre a concentração do extrato (em escala logarítmica) e a mortalidade corrigida (%).

Curva dose-resposta EE

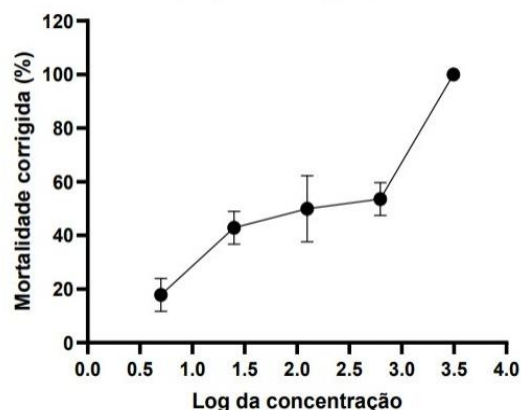


Figura 3. Curva dose-resposta extrato etanólico (EE).
Fonte: Autores, 2026.

O modelo de regressão não linear sigmoide permitiu o cálculo da concentração letal média (CL_{50}), que representa a concentração do extrato capaz de causar 50% de mortalidade dos náuplios de *Artemia salina* após 24 horas de exposição.

O valor de CL_{50} obtido para o extrato etanólico foi de 102,0 $\mu\text{g/mL}$, o que indica que o extrato apresentou uma toxicidade moderada, conforme os critérios propostos por Amarante e colaboradores (2011), que classificam substâncias com CL_{50} superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ como não tóxicas, entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ como moderadamente tóxicas, e inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$ como tóxicas.

Os resultados obtidos neste estudo são diferentes dos observados por Peres e colaboradores (2021), que avaliaram o extrato etanólico de *R. officinalis* frente a *Artemia salina* nas concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$, classificando o extrato como atóxico, com valor de CL_{50} superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Essa diferença entre os valores de CL_{50} pode estar relacionada à diferença na composição fitoquímica dos extratos. No presente trabalho, o teste fitoquímico revelou a presença de terpenoides no extrato etanólico, já no estudo de Peres e colaboradores (2021), tal substância não foi identificada. O que é relevante, já que os terpenoides são substâncias lipofílicas e a *A. salina* é mais sensível a substâncias lipofílicas (Kalčíková; Zagorč-Končan; Zgajnar Gotvaj, 2012), o que pode justificar a maior toxicidade observada.

Segundo Moura e colaboradores (2025), é importante considerar que diversos fatores podem influenciar a presença de metabólitos secundários em extratos vegetais, como sazonalidade, origem botânica, período de coleta, variações ambientais, tipo de solvente e condições de extração empregadas.

Embora ambos os estudos tenham utilizado o método de maceração com etanol, no presente trabalho o processo foi feito por sete dias, sendo repetido três vezes, com o objetivo de esgotar completamente os metabólitos presentes. Já no estudo comparado, a maceração foi realizada por apenas dois dias, sem repetição, o que pode ter resultado em uma extração menos eficiente de compostos lipofílicos, como os terpenoides.

Concentração letal média (CL_{50}) extrato hexânico

Com base nos dados de mortalidade corrigida, a relação dose-resposta foi analisada por meio da regressão não-linear. A Figura 4 exibe a curva dose-resposta do extrato hexânico, mostrando a relação entre a concentração do extrato (em escala logarítmica) e a mortalidade corrigida (%).

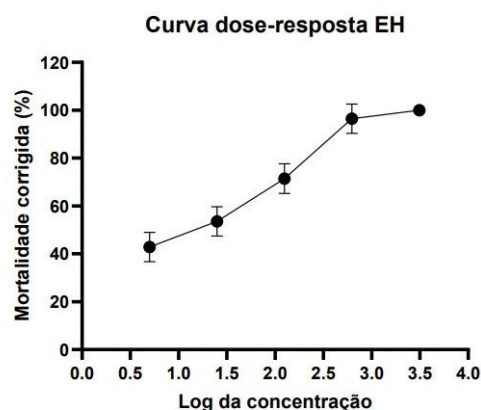


Figura 4. Curva dose-resposta extrato hexânico (EH).
Fonte: Autores, 2026.

O valor de CL_{50} calculado para o extrato hexânico foi de 12,98 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado, por ser inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$, indica que o extrato apresentou uma alta toxicidade, conforme os critérios propostos por Amarante e colaboradores (2011).

Os resultados obtidos mostram que o extrato hexânico apresentou maior toxicidade quando comparado ao extrato etanólico, o que está de acordo quando comparado com outro estudo, com outra espécie, como o realizado por Quaresma, (2023) com *Dysphania ambrosioides*. No trabalho em questão, o extrato etanólico também foi classificado como moderadamente tóxico $CL_{50}= 259,8 \mu\text{g/mL}$, enquanto a fração de hexano foi classificada como tóxica $CL_{50}= 66,1 \mu\text{g/mL}$. Ao utilizar técnicas avançadas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a Espectrometria UV, no extrato etanólico, foi identificado a presença majoritária de flavonoides.

Já a fração de hexano foi identificada como rica em terpenoides e esteroides (por Cromatografia em Camada Delgada – CCD), o que mais uma vez, sugere que a alta toxicidade observada no extrato hexânico pode estar diretamente relacionada à presença de terpenoides, que possuem maior facilidade em interagir com as membranas celulares lipídicas dos náuplios, resultando na maior citotoxicidade observada em concentrações mais baixas (Quaresma, 2023).

Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a composição química diferenciada entre os extratos influencia diretamente o potencial tóxico observado no bioensaio. No entanto, como os testes fitoquímicos realizados foram qualitativos, não é possível afirmar com precisão quais classes de metabólitos estão presentes em maior teor em cada extrato. Assim, recomenda-se a realização de análises quantitativas complementares, como cromatografia e espectroscopia, para confirmar essas hipóteses e melhor compreender a relação entre composição química e toxicidade.

CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que o extrato hexânico se mostrou significativamente mais tóxico, com a CL_{50} de 12,98 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o extrato etanólico apresentou toxicidade mais moderada, com CL_{50} de 102,0 $\mu\text{g/mL}$. A triagem fitoquímica revelou que ambos os extratos contêm fenóis e terpenoides, enquanto flavonoides e saponinas foram detectados apenas no extrato etanólico. Esses resultados indicam uma diferença na composição química entre os extratos, fato que pode ter refletido diretamente em seus perfis toxicológicos.

Dessa forma a maior toxicidade observada no extrato hexânico pode estar relacionada à extração preferencial dos terpenoides que, por serem lipofílicos, possuem maior facilidade em interagir com as membranas celulares dos náuplios, causando a sua morte. Por outro lado, a predominância de componentes mais polares no extrato etanólico, como os flavonoides e saponinas, pode conferir a esse extrato uma atividade biológica menos intensa.

Assim, conclui-se que o bioensaio com *Artemia salina* se mostrou um método eficiente, simples e de baixo custo para a triagem inicial de toxicidade de plantas. Recomenda-se, que estudos futuros sejam realizados com técnicas cromatográficas e espectroscópicas para a identificação e quantificação das substâncias ativas, além de ensaios complementares *in vitro* e *in vivo* que possam confirmar e ampliar os resultados observados neste estudo.



REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, Baltimore, v. 18, n. 2, p. 265–267, abr. 1925.
- AMARAL, S. M. *et al.* Alecrim (*Rosmarinus officinalis*): principais características. *Revista de Casos e Consultoria*, [S. l.], v. 12, n. 1, p. e24651, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/casoseconsultoria/article/view/24651>. Acesso em: 28 maio 2025.
- AMARANTE, C. B. *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de *Montrichardia linifera* (Araceae). *Acta Amazonica*, Manaus, v. 41, n. 3, p. 431–434, 2011. DOI: 10.1590/S0044-59672011000300015.
- ANOKWURU, C. *et al.* Effect of extraction solvents on phenolic, flavonoid and antioxidant activities of three Nigerian medicinal plants. *Nature and Science*, 9(7): 9–17, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/267327206_Effect_of_Extraction_Solvents_on_Phenolic_Flavonoid_and_Antioxidant_activities_of_Three_Nigerian_Medicinal_Plants. Acesso em: 23 set. 2025.
- ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. 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*, Araraquara, v. 31, n. 2, p. 205–209, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/71676>. Acesso em: 1 jul. 2025.
- BEGUM, A. *et al.* An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, v. 12, n. 1, p. 61–74, 2013. Disponível em: <https://www.food.actapol.net/volume12/issue1/abstract-6.html>. Acesso em: 14 ago. 2025.
- BESSA, N. G. F. D. *et al.* Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 15 n. 4, p. 692–707, 2013. DOI: 10.1590/S1516-05722013000500010.
- BORGES, R. M. Protocolo detalhado para o ensaio de citotoxicidade em *Artemia salina*. *protocols.io*, 2025. DOI: 10.17504/protocols.io.x54v9r341v3e/v1.
- CAMPOS, I. Morfoanatomia, atividade alelopática e potencial antimicrobiano do extrato bruto e frações das folhas de *Piper callosum* Ruiz & Pav. (Piperaceae). 2019. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Amazonas, Itacoatira, 2019. Disponível em: http://riu.ufam.edu.br/bitstream/prefix/5663/12/TC_Campos.pdf. Acesso em: 28 maio 2025.
- CAVALCANTE, M. F. *et al.* Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. *Química Nova*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 20–22, 2000. DOI: 10.1590/S0100-40422000000100005.
- CUNHA, A. P. Farmacognosia e fitoquímica. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2014.
- ESATI, N. K. *et al.* Total Flavonoid Levels in n-hexane and Ethyl Acetate Fractions of *Rosmarinus officinalis* L. Leaves and Their Antibacterial and Antioxidant Activities. *Borneo Journal of Pharmacy*, v. 7, n. 1, p. 51–62, 2024. DOI: 10.33084/bjop.v7i1.4034
- FORZZA, R. C. *et al.* New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. *BioScience*, Oxford, v. 62, n. 1, p. 39–45, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.1.8>
- GENENA, A. K. Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante. 2005. 155 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 5. ed. London: Chapman and Hall, 1998. p. 21–72.
- HIROTA, B. C. K. *et al.* Avaliação de toxicidade in vitro: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*. *Visão Acadêmica*, [S. l.], v. 13, n. 2, 2012. DOI: 10.5380/acd.v13i2.27834. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/27834>. Acesso em: 4 ago. 2025.
- IBRAHIM, N. *et al.* *Rosmarinus officinalis* L. hexane extract: phytochemical analysis, nanoencapsulation, and in silico, in vitro, and in vivo anti-photoaging potential evaluation. *Scientific Reports*, v. 12, p. 13102, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16592-7>.
- JIANG, Z.; KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Curr Protoc Plant Biol*, [s.l.], v. 1, p. 345–358, 2016. DOI: 10.1002/cppb.20024.



- KALČÍKOVÁ, G.; ZAGORC-KONČAN, J.; GOTVAJN, A. Z. *Artemia salina* acute immobilization test: a possible tool for aquatic ecotoxicity assessment. *Water Science & Technology*, v. 66, n. 4, p. 903-908, 2012. DOI: 10.2166/wst.2012.271.
- KUMARADEWI, D. A. P. *et al.* Phytochemical Screening and Activity Test of Antioxidant Ethanol Extract of Buni Leaves (*Antidesma bunius* L. Spreng) Using DPPH Method. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, v. 7, n. 2, p. 275-280, 2021. DOI: 10.29303/jppipa.v7i2.675.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006.
- MATOS, F. J. D. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: edições UFC, 2009.
- MEYER, B. N. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Médica*, v.45, p.31-34,1982.
- MOHAMMED, J.; OBA, O.; AYDINLIK, N. P. Preliminary phytochemical screening, GC-MS, FTIR analysis of ethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Coriandrum sativum* L and *Mentha spicata*. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, v. 51, n. 1, p. 93–102, 2022. DOI: 10.15671/hjbc.1073300.
- MOTA, G. C. F. *Estudo da atividade fotoprotetora e antiproliferativa in vitro das espécies vegetais *Lepidaploa rufogrisea*, *Matayba marginata*, *Chamaecrista mucronata* e *Senna reniformis* na região de Ouro Preto - MG*. 2024. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Ouro Preto, 2024.
- MOURA, A. M. A. de. *et al.* Prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Morus nigra* L. *Ciências da Saúde: Abordagens Interdisciplinares e Inovações Científicas – Vol. 3*. 1. ed. [S.l.]: Editora Científica Digital, 2025. p. 71-86. DOI: 10.37885/250819866.
- NAGHIBI, F. *et al.* Labiatae Family in Folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 2, n. 2, p. 63–79, 2005.
- NEVES, N. C. V. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav.: caracterização fitoquímica, estudos mecanísticos da atividade gastroprotetora e avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori*. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.
- Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/41895>. Acesso em: 28 maio 2025.
- NSANZAMAHORO, C. *et al.* Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* leaves. *Journal of Bioresources and Environmental Sciences*, v. 3, n. 3, p. 142-154, 2024. DOI: 10.61435/jbes.2024.19934.
- PALAIIOGIANNIS, D. *et al.* Successive solvent extraction of polyphenols and flavonoids from *Cistus creticus* L. leaves. *Oxygen*, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 274–286, 2023. DOI: 10.3390/oxygen3030018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/oxygen3030018>. Acesso em: 23 set. 2025.
- PAZINATO, H. L. *et al.* Substâncias fenólicas e estudo da teoria ácido-base de Lewis. *Química Nova na Escola*, v. 34, n. 1, p. 43-47, 2012. Disponível em: https://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/05-EA-43-11.pdf. Acesso em: 24 set. 2025.
- PENTEADO, J. G.; CECY, A. T. Alecrim *Rosmarinus officinalis* L. Labiatae (Lamiaceae): uma revisão bibliográfica. Centro Universitário Euro-Americana – UNIEURO, 2006. Disponível em: https://www.unieuro.edu.br/sitenovo/revistas/downloads/farmacia/cenarium_02_02.pdf. Acesso em: 15 ago. 2025.
- PERES, T. R. *et al.* Avaliação fitoquímica, toxicológica e antioxidante da espécie *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim). *Plantas medicinais do estado do Amapá: dos relatos da população à pesquisa científica*. Macapá: Editora Científica, 2021. p. 68-77. DOI: 10.37885/210404185.
- QUARESMA, A. C. S. Avaliação da toxicidade e estudo in silico de compostos de *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants. 2023. 106 f. Belém: Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.
- ROCKENBACH, I. I. *et al.* Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, supl., p. 238–244, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500036>.
- SANTOS, B. F. de S. *et al.* Toxicidade de produtos naturais e a *Artemia salina*. *Ciências Agrárias: limites e potencialidades em pesquisa*. Vol. 3.



Sete Lagoas: Editora Científica Digital, 2023. p. 9-27. DOI: 10.37885/231014642.

SILVA, M. de O. Estudo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante da casca de café (*Coffea arabica* L.). 2021. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora Artemed, 2010.

SOUZA, A. X. *et al.* Plantas medicinais e fitoterápicos utilizados por pacientes hipertensos do NASF de Jaíba - MG. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 21, n. 2, p. 140–147, 2019. DOI: 10.1590/1983-084X/20_02_020.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, [S.l.], 14(6): 2167–2180, 2009. DOI: 10.3390/molecules14062167. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/14/6/2167>. Acesso em: 23 set. 2025.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519–528, jun. 2005. DOI: 10.1590/S0100-40422005000300026.

VONGSAK, B. *et al.* Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, v. 44, p. 566–571, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.09.021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. 2. ed. Updated June 2018. Geneva: World Health Organization, 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250677/1/9789241511575-eng.pdf>. Acesso em: 31 out. 2025.

ZEROUAL, A. *et al.* Effects of extraction technique and solvent on phytochemicals, antioxidant, and antimicrobial activities of cultivated and wild rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Taounate region (northern Morocco). *Biointerface Research in Applied Chemistry*, [S.l.], v. 12, n. 6, p. 8441–8452, 2022. DOI: 10.33263/BRIAC126.84418452.