

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química

AVALIA
ORNAMEN



ANTAS
M Artemia

Relatório Referente ao Estágio de
Conclusão de Curso – Química
Habilitação Bacharelado

Aluna: Karina Zaia Machado
Orientadora: Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente

Florianópolis, julho de 2003.

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PLANTAS
ORNAMENTAIS FRENTE AO TESTE COM *Artemia*
salina Leach.

Relatório Referente ao Estágio de
Conclusão de Curso – Química
Habilitação Bacharelado,
realizado no LQPN no período de
março a julho / 2003

Karina Zaia Machado

aluna

Inês Maria Costa Brighente

orientadora

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Histórico	3
3.2. Plantas Tóxicas	4
3.2.1. Plantas Tóxicas Estudadas	6
3.3. TESTE DE TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i>	19
4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivos Gerais	20
4.2. Objetivos Específicos	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1. Equipamentos	21
5.2. Substâncias utilizadas	21
5.3. Coleta e Identificação das Espécies Vegetais	21
5.4. Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Bruto	21
5.5. Teste de Toxicidade Frente a <i>Artemia salina</i>	22
5.6. Investigação Química Preliminar	24
5.7. Estudo Fitoquímico do Extrato de <i>Zantedeschia aethiopica</i>	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6.1. Análise do Bioensaio Utilizando <i>Artemia salina</i>	29
6.2. Análise dos Ensaios Qualitativos para a Determinação das Classes de Produtos Naturais Presentes no Extrato, Através de Marcha Analítica	32
6.3. Análise do Estudo Fitoquímico do Extrato de <i>Zantedeschia aethiopica</i>	31
7. CONCLUSÃO	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
9. ANEXOS	39

1. RESUMO

Plantas tóxicas podem causar sérios danos a seres humanos e animais, com prejuízos significativos a saúde pública e a pecuária. Segundo o Centro de Informação Toxicológica do estado de Santa Catarina (CIT-SC), um número restrito de plantas ornamentais está relacionado com a maioria das intoxicações, sendo que comigo-ninguém-pode responde sozinho por 30% dos casos. Outras plantas como aroeira, arruda, copo-de-leite, coroa-de-cristo, espada-de-são-jorge e espirradeira, que serão estudadas neste trabalho, seguem a lista das principais plantas tóxicas. O bioensaio que utiliza *A. salina* apresenta boa correlação com ensaios de toxicidade em geral e anti-tumorais. Sendo assim, este trabalho utiliza o bioensaio de *A. salina* na avaliação do grau de toxicidade de algumas plantas ornamentais, notoriamente tóxicas. Por este bioensaio, toma-se como base para considerar uma planta tóxica, o valor de $DL_{50} < 1000$ ppm.

As espécies ornamentais foram identificadas no Departamento de Botânica-UFSC. O material botânico foi submetido a secagem com posterior maceração em etanol. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo e avaliados quanto a toxicidade frente a *A. salina* em concentrações de 50-1000 ppm. Os testes foram feitos em triplicata, com dez larvas por tubo de ensaio, utilizando $K_2Cr_2O_7$ como controle positivo ($DL_{50} = 20-40$ ppm). Após 24 hs, foi determinado a % de mortalidade para cada concentração e a DL_{50} foi calculada através do gráfico de % de mortalidade em função do logaritmo da concentração.

Das onze plantas testadas, as que apresentaram maior toxicidade foram *Ruta graveolens* (arruda), *Sansevieria trifasciata* (espada-de-são-jorge), *Zantedeschia aethiopica* (copo-de-leite), *Hedera helix* (hera) e *Nerium ollander* (espirradeira), sendo que os demais extratos não apresentaram toxicidade, segundo este bioensaio. Porém, para os extratos inativos, a toxicidade pode estar relacionada com compostos termo- ou foto-sensíveis, que não foram detectados por este método.

Finalmente, no extrato de *Zantedeschia aethiopica* foram feitos alguns estudos fitoquímicos prévios.

2. INTRODUÇÃO

A toxicologia das plantas, relacionada à espécie humana, assume aspectos variados e importantes, interessando diferentes campos, entre os quais destaca-se a medicina, biologia, botânica e química. A intoxicação aguda, quase sempre por ingestão acidental de uma planta ou de alguma de suas partes tóxicas, é de incidência preponderante no grupo pediátrico. Embora de incidência universal, este tipo de intoxicação possui distribuição e intensidade nitidamente regionais. Entre os adultos, a intoxicação por plantas é muito pouco freqüente, e quando ocorre, é quase sempre devida a ingestão de uma espécie tóxica que é confundida com alimento, ou então conseqüente a atividades industriais ou agrícolas, sendo nesse caso, mais um problema alérgico ou físico do que toxicológico propriamente dito. A intoxicação crônica conseqüente à ingestão continuada, acidental ou propositada de certas espécies vegetais, é responsável por distúrbios clínicos muitas vezes complexos e graves.

Assim, as principais medidas preventivas para diminuir o risco de intoxicação com plantas são: divulgar o máximo possível e por todos os meios de comunicação, as espécies tóxicas mais comuns; recomendar a necessidade de orientação médica ao se utilizar algum preparado vegetal para fins medicinais, e finalmente educar a população sobre a inconveniência de ingerir ou manusear qualquer espécie vegetal desconhecida. Portanto, é necessário conhecer as plantas perigosas da região, da casa e do quintal, conhecê-las pelo aspecto e pelo nome (Schavartsman, 1992).

Neste trabalho pretende-se aplicar o teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, a fim de avaliar o grau de toxicidade de uma variedade de plantas ornamentais, reconhecidamente tóxicas. *A. salina* (Artemiidae) é um microcrustáceo que tem sido usado com sucesso como teste alternativo para determinação da toxicidade de produtos químicos e naturais (Sam, 1993; Meyer et al., 1982). Sabendo-se que a utilização de plantas ornamentais que possuem algum efeito tóxico ao homem e animais é muito grande, objetivou-se inicialmente o estudo de onze espécies tóxicas, entre estas, algumas registradas como causadoras de intoxicação pelo Centro de Informação Toxicológica em SC (CIT-SC).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. HISTÓRICO

Ao longo do tempo, plantas tóxicas foram consideradas de modo muito diverso. Nos primórdios da sua origem e evolução, o homem percebeu que as plantas tinham além da capacidade de alimentar e curar, a de poder matar.

Ampla utilização é referida na Idade Média, com fins políticos, militares ou pessoais, como recurso em envenenamentos intencionais. Na Grécia antiga, onde a produção de gêneros alimentícios era escasso, o governo estabeleceu medidas drásticas para impedir a fome utilizando-se da "cicuta". Por este motivo indivíduos com mais de 60 anos, eram eliminados sumariamente, sendo a "cicuta" (*Conium maculatum* L.) o meio usado para extermínio das pessoas já alquebradas e inaptas para o trabalho. Sócrates um dos maiores filósofos da história, quando condenado à morte pelo Sinédrio, teve como agente da sua sentença, a "cicuta".

Muitas plantas venenosas, como a beladona (*Atropa belladonna*) e a digital ou dedaleira (*Digitalis lanata*), fornecem substâncias, que quando usadas na dosagem correta, possui grande valor terapêutico ou medicinal.

Em épocas remotas, e também no século XX em algumas regiões, plantas tóxicas exerceram papel importante para prover alimentação, através do uso como veneno de flechas na caça ou como veneno para peixes. Os caboclos brasileiros usam as espécies do grupo dos timbós, sapindáceas e leguminosas para envenenar a água dos rios e assim matar peixes. Esse tipo de pesca, apesar de predatório, permite, com pouco esforço, resultados imediatos dos mais compensadores.

Os índios por sua vez, envenenavam suas flechas com o curare. Esse extrato, obtido de certas plantas do gênero *Strychnos* e de *Chondrodendron tomentosum*, tem ação paralisante e é mortífero, por atacar os músculos inspiratórios.

Mais recentemente, ao fim do século XIX e início do século XX, plantas tóxicas exerceram importante papel como fonte de substâncias ativas capazes de propiciar modelos moleculares para o desenvolvimento de fármacos.

O homem aprendeu sobre as plantas pelo processo da tentativa e erro. Hoje vivemos num mundo em que existe certo conhecimento sobre os transtornos que as plantas podem

acarretar ao homem. As plantas ornamentais são as que se encontram mais próximas e de fácil acesso, plantas essas que embelezam e podem trazer sensações agradáveis ao homem pela sua beleza exterior. Entretanto, elas trazem também danos irreparáveis, pois por trás de tanta beleza, pode conter na sua constituição química, elementos não apropriados a espécie humana e dos animais, com prejuízos significativos à saúde pública e à pecuária.

3.2. PLANTAS TÓXICAS

As plantas são seres vivos complexos, e como tais apresentam um extraordinário metabolismo, que leva à produção de uma grande variedade de substâncias químicas. Algumas destas substâncias como, por exemplo, proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, originárias do metabolismo primário, são comuns a todos os seres vivos, sendo usadas no crescimento, na reprodução e na manutenção do vegetal. No entanto, um grande número de compostos químicos produzidos pelos vegetais serve a outros propósitos. Os pigmentos (flavonóides, antocianinas e betalaínas) e os óleos essenciais (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides) atraem polinizadores, enquanto algumas outras substâncias como os taninos, as lactonas sesquiterpênicas, os alcalóides e os iridóides, além de apresentarem sabores desagradáveis, podem ser tóxicas e irritantes para outros organismos. Estas substâncias, originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a determinados grupos de organismos, são produtos do metabolismo secundário (Vickery & Vickery, 1981). Elas protegem as plantas contra predadores e patógenos (Poser & Mentz, 2001).

Várias destas substâncias tóxicas podem causar graves envenenamentos em seres humanos ou em animais domésticos quando plantas que as contenham são ingeridas, ou quando entram em contato com a pele. No entanto, a simples presença destas substâncias em uma determinada espécie vegetal parece não ser suficiente para qualificá-la como tóxica. O primeiro requisito para suspeitar da possível toxicidade de uma planta, é o relato de uma pessoa que tenha desenvolvido um quadro clínico após a ingestão ou o contato com a espécie em questão. Todavia, pode acontecer de uma outra pessoa (ou animal nos casos veterinários) ter o mesmo tipo de contato com a espécie, e não ser observada sintomatologia aparente. Isto pode ser consequência de um, ou da associação de vários

fatores, tornando incerta a condição de planta tóxica admitida anteriormente. Sendo assim, para a qualificação de uma planta como tóxica ou não tóxica, é necessário ter em mente as seguintes variáveis (Schvartsman, 1992): i) Diferentes partes de uma mesma planta (raiz, caule, flores, frutos e sementes) frequentemente contêm diferentes concentrações de substâncias químicas; ii) A idade da planta e o estado de amadurecimento dos frutos contribuem para a variabilidade das concentrações das substâncias; iii) Clima, solo e estação do ano alteram a síntese de alguns compostos; iv) Variedades da mesma espécie podem apresentar constituições químicas diferentes; v) Patologias vegetais como ataques de fungos, ataques de bactérias e até mesmo a predação por herbívoros, podem induzir o vegetal a produzir substâncias que normalmente não produz; vi) Indivíduos diferentes apresentam diferentes taxas de sensibilização a certas substâncias vegetais; vii) A intoxicação pode estar limitada à quantidade de vegetal ingerido, ou à maneira de ingestão (bem ou mal mastigado).

A descrição botânica da planta, com fotografia detalhada, nomes vulgares e científicos e de algumas, até sinônimos estrangeiros, visa ajudar rapidamente os responsáveis por vidas, como médicos e veterinários, a identificar a planta tida como tóxica, pois em alguns casos o tempo é fator vital. É fácil saber se a planta é uma erva, arbusto, árvore ou trepadeira; se apresenta látex ou não, pelos urticantes, espinhos; qual tipo de folha, cor das flores e forma dos frutos, etc. características estas úteis para a identificação, pois em casos de emergência as plantas parecidas sempre são da mesma espécie ou do mesmo gênero, ou, ainda, da mesma família.

O conceito de substâncias tóxicas é bastante relativo, pois depende da dosagem e do indivíduo. Há substâncias altamente tóxicas que, em dosagens mínimas, entram na composição de vários remédios.

Na grande maioria das intoxicações por plantas sempre ocorre, em alguma fase de sua evolução, distúrbios digestivos, incluindo não apenas manifestações gastrintestinais, tais como vômitos, cólicas abdominais e diarreia, como também comprometimento hepático, que usualmente é de difícil diagnóstico, além dos distúrbios do trato digestivo superior, incluindo boca e faringe. A ocorrência de distúrbios gastrintestinais pode ser devida a vários tipos de agentes tóxicos existentes na planta, entre os quais podem ser citados: proteínas tóxicas, glicocalcóides, saponinas, resinas, entre outros.

Em algumas obras clássicas (Hoehne, 1978; Kingsbury, 1964), centenas de plantas são citadas como tóxicas. No entanto, a margem de certeza sobre a toxicidade de uma planta é limitada por uma série de fatores. Para ocorrer a intoxicação, seja por ingestão de uma dose tóxica, seja pelo contato através da pele, devem ser vencidos, no processo, os mecanismos próprios de defesa da cada organismo. Assim, uma planta pode ser potencialmente tóxica, e apesar disso, não provocar a intoxicação, determinando, nesse caso, a convicção equivocada de ausência de toxicidade (Simões et al., 1999).

A verificação da toxicidade depende principalmente de experimentos em animais, que nem sempre reproduzem a toxicidade em seres humanos, ou de relatos sobre intoxicações acidentais. Infelizmente, a maior parte destes relatos não é acompanhada de informações quanto a quantidade ou parte do vegetal ingerido, ou ainda, quanto à identificação da planta através de nomes científicos.

3.2.1. PLANTAS TÓXICAS ESTUDADAS

Alamanda

Allamanda cathartica, planta disseminada por todo país, pertence à família botânica das Apocynaceas, apresenta-se popularmente sob vários nomes como por exemplo, Alamanda, Alamanda-amarela, Dedal-de-dama, Orelia, Quatro patacas amarela, Santa Maria (Correa, 1984).

Trata-se de uma trepadeira arbustiva e lactescente, semi-lenhosa, vigorosa, de folhas variáveis, brilhantes e espessas, apresentando flores amarelas em forma de funil, freqüente em jardins (Schvartsman, 1992). Figura 1.

Todas as partes desta planta são consideradas de potencial toxicidade, especialmente o látex resinoso (Simões et al., 1999).

Estudos fitoquímicos realizados por alguns autores revelaram a presença de esteróides e triterpenos (Gupta et al., 1969). Akah & Offiah (1992) isolaram do extrato das folhas substâncias farmacologicamente ativas capazes de estimular os movimentos peristálticos. Análises cromatográficas deste extrato revelaram a presença de alcalóides,

saponinas, flavonóides e carboidratos, mas seus papéis específicos nos efeitos purgativos não foram estudados. Porém, é possível que as saponinas contidas no extrato possam elevar os efeitos tóxicos, devido às suas propriedades emolientes ou estimulantes (Akah & Offiah 1992). Coppen (1983) e Abdel-Kader et al. (1997) isolaram iridóides de *A. cathartica*, sendo que o primeiro cientista relacionou a atividade algicida observada, à presença de iridóides glicosídicos.

O extrato etanólico de folhas e galhos de *A. cathartica* apresentou moderada neutralização do efeito hemorrágico do veneno de cobras da espécie *Bothrops atrox* (Otero et al., 2000). Allamadin, um iridóide lactônico com atividade antileucêmica isolado desta planta teve sua estrutura elucidada por Kupchan et al. (1974). Plumieride, um outro iridóide glicosídico, apresentou forte fungitoxicidade contra alguns dermatófitos causadores de micose em animais e seres humanos (Tiwari et al., 2002).

A ingestão desta planta pode ocasionar distúrbios gastrintestinais intensos, com náuseas, vômitos, cólicas e diarreia (Simões et al., 1999). O tratamento deve ser iniciado com lavagem gástrica, levando-se em consideração as propriedades cáusticas do vegetal. As manifestações digestivas exigem apenas tratamento sintomático, complementado por correção adequada dos distúrbios hidreletrolíticos, que são complicações relativamente freqüentes (Schvartsman, 1992).

Popularmente, esta planta é usada como purgativa quando em dose mínima, e também no tratamento contra a sarna (Correa, 1984).

Aroeira

Conhecida popularmente pelos nomes de aroeira-vermelha, aroeira-da-praia e aroeira-mansa, a espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi pertence à família botânica Anacardiaceae, sendo muito utilizada em arborização de ruas e parques.

Trata-se de uma árvore de até 10 metros de altura. Possui folhas compostas, imparipenadas, com pecíolos cilíndricos na parte inferior e mais ou menos alados; folíolos oblongo-elípticos ou obovados, estreitos na base e obtuso ou agudo ou provido de um pequeno dente no ápice, cerrados, membranáceos, glabros; flores amarelo pálidas pequenas, dispostas em panículos de 5 a 10 cm de comprimento; fruto globoso vermelho pálido luzidio (Correa, 1984). Figura 2.

Esta espécie é bastante utilizada na medicina popular. Contudo, trata-se de uma espécie tóxica, que deve ser usada com muita precaução.

Segundo Morton (1978), crianças que ingeriram alguns frutos verdes ou maduros sofreram distúrbios gastrintestinais e, o contato com os frutos, pode originar alergias que afetam mãos, braços e rosto.

O quadro toxicológico caracteriza-se por dermatite, apresentando eritema, pápulas e vesículas com prurido intenso. A hipersensibilização pode decorrer do contato direto da planta com a pele ou, em muitos casos, apenas pela proximidade do vegetal, devido à presença de substâncias alergizantes voláteis (Simões, 1999). O tratamento pode ser feito utilizando antissépticos de ação local e, nos casos mais graves, é recomendada a administração de corticóides e anti-histamínicos (Simões, 1999).

Os frutos de *S. terebinthifolius* possuem efeito inibitório sobre a fosfolipase A2 (Jain et al., 1995), podendo assim, ser útil no controle de processos inflamatórios tal como artrite reumatóide, asma e psoríase (Waite, 1987; Wong & Dennis, 1990).

Arruda

Planta originária da Europa e comumente cultivada em nossos jardins, a *Ruta graveolens*, é bastante conhecida desde a antiguidade principalmente por estar ligada às superstições populares. Pertencente à família Rutaceae, é conhecida popularmente pelos seguintes nomes vulgares: Arruda-comum, arruda-dos-jardins, arruda-fedorenta, ruta, ruta-de-cheiro-forte, arruda-doméstica, erva-arruda.

Apresenta-se como sub-arbusto, de cheiro forte e desagradável, ramificado desde a base, possui folhas alternadas e flores verde-amarelas (Correa, 1984). Figura 3.

Esta planta é usada desde a antiguidade para proteger as pessoas de mau-olhado. Com os seus ramos asperge-se água benta sobre as multidões. Muitas pesquisas fitoquímicas foram desenvolvidas com *R. graveolens*.

Toda a planta, principalmente os brotos terminais e as flores, possuem entre outras substâncias, albumina vegetal, “inulina” e um óleo volátil, “rutina”, amarelo-esverdeado, espesso, amargo, de cheiro forte e desagradável, ao qual são atribuídas em grande parte as suas virtudes medicinais (Correa, 1984).

R. Graveolens é considerada tóxica. Administração oral de 5g/Kg de peso corporal de folhas desta planta a caprinos causou tremor, dispnéia, diurese frequente, descoordenação de movimentos, ataxia e paralisia com morte após 1 a 7 dias (Agra et al., 2002). Foi reportado que *R. graveolens* causou dermatite fototóxica. Os componentes fototóxicos pertencem ao grupo de furano-cumarina e furano-quinolina (Schempp, et al., 1999). O extrato de éter de petróleo de *R. graveolens* mostrou um significativo efeito citotóxico. Neste extrato foi encontrado biflavonóides (Trovato, et al., 1996). Conway & Slocumb (1979) descreveram que esta planta é usada como emenagoga e abortiva.

Esta planta pode ser perigosa quando ingerida em grandes quantidades, mas possui também propriedades medicinais. *Ruta graveolens* é uma espécie promissora na produção de furano-cumarinas, muito usadas na dermatologia (Milesi et al., 2001).

Ruta graveolens faz parte da composição de alguns fitoterápicos na forma de infusão, sendo usado para normalização das funções do ciclo menstrual, fragilidade dos capilares sanguíneos, combate a calvície, ansiedade e insônia, incontinência de urina e prisão de ventre. A extração dos princípios ativos com azeite comestível origina um extrato oleoso que é usado como vermífugo. Para combater a sarna e piolhos, é usada na forma de tintura e para aplicar nas varizes e sarar flebites, é usada na forma de cataplasma (<http://www.Plantastoxicas.cjb.net>)

Comigo-ninguém-pode

Comigo-ninguém-pode é o nome popular dado a duas espécies do gênero *Dieffenbachia*: *D. picta* Schott e *D. seguine* Schott, ambas pertencentes à flora Amazônica. As duas são polimorfos e dificilmente distinguíveis na prática. De modo geral, apresentam caule espesso e ereto, folhas grandes, oblongas, vistosas, pecioladas, verde-escuras, com manchas esbranquiçadas de vários aspectos (Schvartsman, 1992). Figura 4.

Rizzini & Occhioni (1957, apud Scavone & Panizza, 1980), relatam as seguintes características distintivas: 1- as folhas de *D. picta* apresentam máculas numerosas, muitas vezes confluentes, espalhadas por toda a superfície; 2 – *D. seguine* geralmente apresenta folhas completamente verdes, e suas nervuras são mais proeminentes.

Estas espécies são frequentemente cultivadas como ornamentais, principalmente na decoração de ambientes interiores devido a sua resistência à baixa luminosidade (Simões et al., 1999). Esta é uma das folhagens mais populares e um poderoso amuleto contra inveja e mau olhado.

A natureza química das substâncias responsáveis pela toxicidade de *Dieffenbachia* ainda não foi completamente esclarecida. Essas plantas, assim como outras da família Araceae, têm como uma das características anatômicas a presença de um grande número de cristais de oxalato de cálcio, na forma de agulhas, denominadas ráfides, e estão contidos dentro de células injetoras denominadas idioblastos (Carneiro et al., 1985).

O mecanismo da reação alérgica foi estudado experimentalmente, tendo sido demonstrado que a ação desencadeada não é apenas mecânica, mas sim mediado pela presença de substâncias de natureza lipídica constituídas de ácidos graxos insaturados que atuam como substâncias irritantes juntamente com os cristais de oxalato de cálcio (Carneiro et al., 1989). Foi apontado a presença de enzimas proteolíticas envolvidas no mecanismo de intoxicação (Rauber, 1985).

Os casos de intoxicações mais frequentes ocorrem com crianças, devido à ingestão ou contato com a mucosa oral. Os sintomas se desenvolvem rapidamente, ocorrendo irritação com sensação de queimadura, salivação intensa, edema dos lábios, língua e garganta, podendo dificultar ou impedir a fala e causar distúrbios respiratórios. O contato com a seiva do vegetal, de forma direta ou indireta, pode provocar severa irritação da pele ou inflamação ocular, acompanhada de edema e fortes dores, as quais podem durar até algumas semanas. Algumas vezes, ocorrem distúrbios gastrintestinais, com cólicas abdominais, náuseas e vômitos (Simões et al., 1999).

O tratamento é sintomático, com administração de líquidos gelados (águas, chás, sucos) ou emolientes (leite, gelatina), para proporcionar alívio. Caso necessário, são administrados analgésicos, antiinflamatórios e anti-histamínicos, para combater a dor e o edema. Não é recomendado fazer lavagem gástrica nem provocar vômito, devido à presença das microagulhas (ráfides). Áreas irritadas por contato, como pele e olhos, devem ser lavadas com grande quantidade de água corrente e utilização de colírios antissépticos, no caso dos olhos (Simões et al., 1999).



Figura 1 – *Allamanda cathartica*
(alamanda)



Figura 2 - *Schinus terebinthifolius*
(aroeira)



Figura 3 – *Ruta graveolens*
(arruda)



Figura 4 – *Dieffenbachia spp.*
(comigo-niguém-pode)

Copo-de-leite

Em função do quadro toxicológico e quimiotaxonomia, idêntico ou semelhante às espécies *Dieffenbachia*, essa espécie será sumariamente descrita a seguir.

O copo-de-leite é originário do sul da África e cultivado como ornamental, ocorrendo também como espontâneo em locais encharcados (Simões et al., 1999).

Conhecida cientificamente por *Zantedeschia aethiopica*, é uma planta ornamental muito apreciada pela sua inflorescência. Possui espata muito branca irregularmente campanulada, espádice cilíndrico e amarelo. Grandes folhas cordiformes-sagitadas (Schvartsman, 1992). Figura 5.

Toxicidade, formas de intoxicação, efeitos clínicos potenciais e tratamento são semelhantes aos descritos para comigo-ninguém-pode.

A partir do extrato acetato de etila e metanólico de *Z. eathiopica* foram isolados dois triterpenos cicloartane, 10 esteróides com o núcleo colesteno, três lignanas e dez fenilpropanóides. Ensaio anti-alga mostraram boa atividade para alguns dos compostos aromáticos (Della Greca et al., 1998).

Coroa-de-Cristo

A espécie *Euphorbia milii*, conhecida pelos nomes populares coroa-de-cristo, martírio, coroa-de-espinhos, colchão-de-noiva, dois irmãos, bem casados martírios, é muito cultivada no Brasil, como ornamental e como cerca viva.

Apresenta grande número de espátulas rígidas e pontiagudas e pequenas flores de coloração avermelhada. Produz uma seiva abundante e muito leitosa (Schvartsman, 1992). Figura 6.

As espécies do gênero *Euphorbia*, apresentam potencial efeito moluscicida. Teoricamente estas plantas podem ser uma solução de baixo custo e ecologicamente correta no controle de vetores da esquistossomose (Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000). Porém, as propriedades tóxicas inviabilizam o uso destas espécies (Cruz et al., 1996).

Das partes aéreas do vegetal foram isolados diterpenos denominados miliaminas de A a I, responsáveis pela ação irritante (Uemura & Hirata, 1973). Esse grupo de compostos foi bastante estudado em função da sua ação co-carcinogênica (Marston & Hecker, 1983).

Os casos de intoxicação mais freqüentes são devido ao contato do látex com a pele e mucosas, podendo causar sérias irritações. As lesões caracterizam-se inicialmente por edema e eritema, evoluindo para a formação de vesículas e pústulas, normalmente pruriginosas e doloridas. O contato do látex ou dos dedos contaminados com os olhos, pode provocar conjuntivite e, em casos mais graves, cegueira temporária (Simões et al., 1999). O tratamento é sintomático.

Espada-de-são-jorge

Sansevieria trifasciata pertence a família Agavaceae. Herbácea rizomatosa perene da África, de 70-90 cm de altura com folhas espessas. São cultivadas diversas variedades de folhas com margens creme-amareladas, de folhas curtas com manchas verde-claro transversais, de folhas acinzentadas com manchas amareladas nas margens, entre outras. Inflorescências longas com flores pequenas de importância secundária. É cultivada em vasos, no sol ou a sombra. Resiste bem a solos áridos e multiplica-se por divisão de touceiras. Figura 7 (Byrd, 1995; Lorenzi & Souza, 1981).

Entre os supersticiosos, acredita-se que esta planta traga felicidade e fartura a quem a cultiva.

A maceração das folhas em álcool é eficaz em fricções contra o reumatismo. Cortando-se suas folhas em pedacinhos e levando-as a fervura, obtém-se uma solução para lavar os cabelos o que provoca uma melhor circulação do sangue no couro cabeludo. Ainda pode ser usada para banhar o corpo todo, causando ação benéfica sobre a pele (Körbes, 1995). Contudo o uso desta planta não é indicado para fins medicinais principalmente domésticos, pois trata-se de uma planta reconhecidamente tóxica.

Análise fitoquímica da planta inteira resultou no isolamento de quatro glicosídeos pregnânicos (Mimaki et al., 1997). Estes mesmos autores isolaram também, doze saponinas esteroidais (Mimaki et al., 1996). González et al. (1972) isolaram ainda, do extrato etanólico não hidrolisado de *S. trifasciata*, β -sitosterol e cinco sapogeninas espirostano.

Apesar destes estudos fitoquímicos, são poucos os estudos farmacológicos para esta espécie. A espécie *S. glauca* foi considerada tóxica a *A. salina* no teste de toxicidade frente a *A. salina* (Franssen et al., 1997).

Espirradeira

Espirradeira, Oleander, Loandro, Loandro-da-índia, Loureiro-rosa, Flor-de-são-josé, são alguns nomes populares conhecidos para a espécie *Nerium oleander* L. da família Apocynaceae.

Planta herbácea que chega a atingir 2 a 4 m de altura; caule cilíndrico com ramos cinzentos acastanhados; folhas opostas, pecioladas, lanceoladas, nervura principal impressa na face superior e saliente na face inferior; inflorescências terminais, flores geralmente rosadas, corola grande vistosa. Frutos contendo numerosas sementes revestidas de pêlos (Schvartsman, 1992). Figura 8.

Entre as várias plantas extremamente venenosas conhecidas e que se acham em íntimo contato com o homem e os animais domésticos, esta ocupa lugar saliente por ser vivaz e rústica, sem maiores exigências de clima e solo, constituindo o ideal das plantas ornamentais, por associar a elegância do porte, a abundância da floração e o perfume agradável das flores (Correa, 1984).

As propriedades tóxicas desta planta são conhecidas há séculos, desde a época dos hebreus e egípcios. Todas suas partes são venenosas para o homem, sendo seus efeitos mais importantes devido à presença de numerosos glicosídeos, alguns cardioativos (Siddiqui et al., 1986), como a oleandrina, rosagenina, neriina D, neriina F, cortenerina, etc.. Rosagenina, extraída da casca, é considerada extremamente tóxica, de propriedades semelhantes às da estricnina. Da planta foram extraídos também óleos voláteis, vitamina C e glicosídeos cianogênicos (Schvartsman, 1992).

Oleandrina, de fórmula $C_{31}H_{48}O_9$, tem estrutura química semelhante às dos glicosídeos digitálicos e é encontrada no vegetal na proporção de 0,08% (Schvartsman, 1992). Smith et al. demonstraram que o glicosídeo cardiotônico, oleandrina, é eficaz em inibir o câncer de próstata, *in vitro*.

O quadro tóxico inicia-se com manifestações gastrintestinais incluindo náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarréia. Distúrbios neurológicos precedem ou são concomitantes aos cardíacos e compreendem tontura, alterações do equilíbrio, midríase, sonolência, torpor e coma. O óbito pode ocorrer por parada cardíaca em sístole.



Figura 5 - *Zantedeschia aethiopica*
(copo-de-leite)



Figura 6 – *Euphorbia milli*
(coroa-de-cristo)



Figura 7 – *Sansevieria trifasciata*
(espada-de-são-jorge)



Figura 8 – *Nerium ollander*
(espirradeira)

Hera

Originária da Europa, Norte da África, Ásia e Ilhas das Canárias, *Hedera helix* L. pertencente a família Araliáceae é conhecida popularmente pelo nome de hera. Seu maior valor é ser uma preciosa planta de adorno, graças à sua aderência às rochas, aos muros, paredes e árvores, tornando-se muito empregada na jardinocultura. Estende-se pelo chão cobrindo-o com sua densa folhagem ou prende-se aos muros e árvores por meio de raízes adventícias. Possui folhas alternas, lustrosas, verde-escuras ou manchadas de branco-acinzentado; flores pequenas, verde-amareladas; o fruto é uma baga preta (Schvartsman, 1992). Figura 9.

A hera está incluída no grupo das plantas produtoras de saponinas (Bedir et al., 2000), substâncias que de um modo geral tem efeitos irritantes, produzem lesões celulares e modificam a permeabilidade celular. A absorção intestinal é lenta e difícil, por isso são pouco frequentes as manifestações sistêmicas, caracterizadas principalmente por hemólise eritrocitária (Schvartsman, 1992).

Da hera extrai-se um glicosídeo específico “hederina” (Guiraud-Dauriac et al., 1997), que é particularmente abundante nos frutos e tem efeito, em pequenas doses, como vaso-constritora e como hemolítico.

As folhas podem ser usadas, internamente, contra o catarro crônico das vias respiratórias entre outras aplicações medicinais (Correa, 1984). Tintura preparada a partir do extrato seco de *H. helix* é usada para várias doenças do trato respiratório, tal como infecções crônicas e agudas e ainda para aliviar a tosse (Trute & Nahrstedt, 1994).

Os frutos são notoriamente venenosos e ingeridos em certa quantidade provocam febre, com forte aceleração do pulso, delírio (Correa, 1984).

Jibóia

A espécie *Scindapsus pictus*, é bastante cultivada como planta ornamental. É uma planta semi-herbácea vigorosa, ascendente das Ilhas Salomão, com folhas espessas, coriáceas, variegadas de amarelo ou branco, grandes nas folhas idosas. Nas plantas ainda jovens, de ramagem fina, as folhas são pequenas, sem variação, o mesmo acontecendo quando crescendo na sombra. As folhas jovens podem atingir de 8-10 cm, enquanto as

adultas podem alcançar 60 cm de comprimento. Costuma ser cultivada apoiada em suportes, a pleno sol e como forração em locais sombreados. Nesta última situação, mantém as folhas pequenas. Dado o seu crescimento impestuoso, se apoiada em palmeiras, pode sufocá-la, levando-as a morte. Multiplica-se facilmente por estacas que enraízam mesmo na água (Lorenzi & Souza, 1981). Figura 10.

Poucos estudos fitoquímicos foram feitos com esta planta. Em algumas espécies de *Scindapsus* foi encontrado flavona C-glicosídeos, quercetina (flavonol) e chrysoeriol (flavona) (Williams et al., 1981).



Figura 9 – *Hedera helix* L.
(hera)



Figura 10 – *Scindapsus* sp.
(jibóia)

Mamona

Originária da Ásia Meridional e facilmente encontrada em todo o Brasil, a espécie *Ricinus communis* que pertence a família Euforbiaceae é bastante conhecida como planta venenosa. É chamada popularmente de mamona, mamoeiro, Carrapateiro, Palma-cristi.

Trata-se de um arbusto com cerca de 2m de altura, possui caule nodoso, ramificado, folhas alternas, palmatiformes, longamente pecioladas, inflorescências terminais, alternas, parecendo feixes de filetes reunidos. O fruto é uma noz redonda, geralmente espinhosa que aloja as sementes (Correa, 1984). Figura 11.

O óleo de mamona ou óleo de rícino, devido a alta viscosidade e estabilidade, tem amplo emprego industrial e também é utilizado em alguns medicamentos como purgante drástico (Simões et al., 1999). A semente contém uma toxalbumina, a ricina que contém duas cadeias polipeptídicas presas por uma ligação de dissulfeto, e um corpo cristalino nitrogenado, de fórmula $C_8H_8O_2N_2$, chamado ricinina, que tem algumas características dos alcalóides (Schvartsman, 1992). A ricina possui diversos efeitos tóxicos nas células de diferentes órgãos viscerais. Esta proteína induz o stress oxidativo, provocando toxicidade renal (Kumar et al., 2003).

A ricina é muito estável em condições normais, não se deteriorando após meses, mas por ação do calor ou da luz sua ação tóxica diminui. Após ingestão da semente mastigada, a ricina é rapidamente absorvida. Seu metabolismo ainda não é bem conhecido. (Schvartsman, 1992).

A intoxicação por ingestão das sementes caracteriza-se por vômitos, diarreia, cólicas violentas, lesões renais, distúrbios neurológicos, letargia, apnéia e coma (Simões et al., 1999). O tratamento deve ser rápido e enérgico. A estimulação de vômitos e lavagem gástrica deve ser imediata, seguida da administração de eletrólitos, grande quantidade de líquidos, controle renal, sanguíneo e das funções hepáticas. Se necessário, transfusão sanguínea (Simões et al., 1999).



Figura 11 – *Ricinus communis* L.
(mamona)

2.3. TESTE DE TOXICIDADE FRENTE A *Artemia salina*

O teste de letalidade *in vivo* em organismos animais simples, tal como o teste de letalidade contra *Artemia salina*, desenvolvido por Meyer et al. (1982), pode ser usado para determinar a toxicidade de diferentes produtos químicos e naturais. Este bioensaio geral detecta uma ampla faixa de atividades biológicas e uma diversidade de estruturas químicas.

Artemia salina Leach é um microcrustáceo marinho comumente conhecido por larva de camarão ou “nauplius”, pertence à subclasse Branchiopoda, ordem Anostraca. Os ovos deste crustáceo podem ser facilmente adquiridos em lojas de animais marinhos, e as larvas desenvolvem-se rapidamente em água salgada artificial, constituindo uma facilidade para a cultura do organismo.

Este bioensaio baseia-se na premissa de que compostos bioativos são tóxicos em altas doses. Devido a grande sensibilidade de *A. salina*, este bioensaio está estreitamente relacionado com a atividade biológica geral, pois todo o composto que possui alguma atividade, também apresenta certa toxicidade. Além disso, este método tem boa reprodutibilidade e apresenta boa correlação com ensaios de citotoxicidade e antitumorais, servindo também de “pré-screen” antitumoral (Hamburger & Hostettmann, 1991). O bioensaio apresenta ainda correlação com testes de atividades larvicida e inseticida (McLaughlin, 1991), antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MacRae et al., 1988), parasiticida (Sahpaz et al., 1994) e tripossomicida (Zani et al., 1995), podendo então, ser usado como “pré-screen” para monitorar o fracionamento de extratos potencialmente tóxicos, com a vantagem de não requerer técnicas assépticas, podendo ser realizado no próprio laboratório de fitoquímica.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto visa o estudo de uma variedade de plantas ornamentais, notoriamente tóxicas, a fim de avaliar o grau de toxicidade frente ao bioensaio utilizando *A. salina*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Fazer uma pesquisa bibliográfica envolvendo plantas ornamentais tóxicas;
- ii) Coletar e identificar o material vegetal;
- iii) Obter o extrato bruto de cada planta coletada por maceração em etanol;
- iv) Realizar o teste de toxicidade frente a *A. salina* nos extratos obtidos, a fim de avaliar o grau de toxicidade (valores de DL_{50}) das diversas plantas;
- v) Realizar ensaios qualitativos para a determinação das classes de produtos naturais presentes no extrato, através de marcha analítica;
- vi) Analisar através de estudos fitoquímicos o extrato de *Zantedeschia aethiopica* (copo-de-leite).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Equipamentos

Para o bioensaio utilizou-se de garrafas plásticas e transparentes de refrigerante, bombinha de aquário, placas para os testes e pipetas automáticas com as seguintes capacidades: 5-50 μL e 50-200 μL .

Já para o fracionamento, utilizou-se a vidraria adequada e o auxílio de um rotaevaporador.

5.2. Substâncias utilizadas

Os solventes utilizados, como o etanol e dimetilsulfóxido (DMSO) entre outros, e o tween 80 (polioxietilensorbitano monooleato), foram obtidos comercialmente.

O sal usado no controle positivo, dicromato de potássio, é de grau de pureza P.A.. O sal marinho utilizado para a produção do mar artificial foi obtido na loja de aquários Botiquário. Juntamente com o sal marinho, adquiriu-se os cistos de *Artemia salina*, que foram armazenados em local seco à temperatura ambiente.

5.3. Coleta e identificação das espécies vegetais

As espécies aqui em estudo, foram coletadas em Florianópolis, entre os meses de maio e dezembro de 2002, e identificadas no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, pelo professor Daniel de Barcellos Falkenberg.

5.4. Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Bruto

Para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos brutos foram utilizados cerca de 500 g de material vegetal picado e macerado em álcool etílico de grau comercial, e acondicionados em frascos de vidro à temperatura ambiente durante quinze dias. O macerado foi filtrado e evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida

(temperatura ~ 65 °C). Os extratos brutos obtidos foram conservados em câmara fria inferior a 4°C e protegidos da luz.

5.5. Teste de toxicidade frente a *Artemia salina*

Como meio de cultura utilizou-se uma solução de sal marinho ou salina (cerca de 20 g de sal marinho por litro água destilada), onde filtrava-se a solução a fim de se obter a solução saturada de salina.

Para a eclosão dos cistos utilizou-se uma garrafa plástica e transparente de refrigerante com o fundo cortado, como aquário e outra, como suporte. Fez-se uso também de uma bombinha de aquário, Figura 12. Em um litro de salina colocou-se meia colher de café de cistos. As larvas encontravam-se prontas para os teste de toxicidade 72 horas após os cistos serem colocados em meio aquoso.

Os teste de toxicidade frente a *Artemia salina* seguiu a metodologia de Meyer (1982) com pequenas modificações.



Figura 12 – Sistema simulando o ambiente marinho da *Artemia salina*.

Os extratos brutos eram dissolvidos em solventes apropriados, a fim de se obter uma concentração final de 10.000 ppm, então, diluições eram feitas com o objetivo de se obter a concentração desejada para o teste.

Em uma placa contendo 24 pocinhos colocava-se 1 mL da salina com 1% (v/v) tween 80 em cada pocinho e de 7 a 10 larvas, que eram coletadas do meio salino utilizando pipeta automática. Para facilitar a coleta das larvas era aproximado uma fonte luminosa devido ao fototropismo das mesmas.

Inicialmente, cada extrato bruto era testado nas seguintes concentrações, 100, 500 e 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$). Para cada concentração fazia-se três repetições e estas eram acompanhadas do controle positivo e negativo. Depois da análise destes dados preliminares as concentrações eram ajustadas conforme a necessidade. Cada extrato era testado pelo menos duas vezes para que o resultado fornecido fosse mais confiável.

A leitura dos testes sempre foi feita 24 horas após o início dos mesmos. As larvas mortas foram contadas com ajuda de uma lupa em oposição a um fundo escuro. A concentração letal para matar 50% das larvas após 24 hs de exposição, a DL_{50} crônica foi determinada através de um gráfico de mortalidade (%) em função do logaritmo da dose.

O controle negativo consiste em aplicar, na mesma concentração que o extrato testado, apenas o solvente utilizado na dissolução da amostra. Já o controle positivo foi feito com um sal de metal pesado, dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), cuja toxicidade está entre 20 e 40 ppm (Sam, 1993).

Utilizou-se o método descrito por Reed-Muench (Ipsen e Feigl, 1970; Miya *et al.*, 1973), para calcular a DL_{50} com intervalo de confiança de 95%. Este método assume que um animal que sobrevive a uma determinada dose também sobreviverá a uma dose menor, conseqüentemente, um animal que morre com uma certa dose também morrerá com uma dose maior. Assim, as informações de uma dada concentração podem ser somadas aos dados de outra dose testada, mostrando que existe uma relação entre a dose testada e a mortalidade, no sentido de quanto maior a dose, maior será a letalidade das larvas.

Este método permite o uso da fórmula para a estimativa do erro padrão, SE DL_{50} .

$$SE DL_{50} = (0,79.h.R/n)^{1/2}$$

Onde h = média dos intervalos entre as doses (usando o logaritmo da dose). R = faixa interquartilico ($DL_{75} - DL_{25}$) e n = média do número de animais. O limite de confiança de 95% pode ser derivado da seguinte fórmula: $\log DL_{50} \pm 2 \times SE \log DL_{50}$

5.6. Investigação química preliminar

Atendendo ao estudo dos possíveis princípios ativos presentes nas espécies aqui em estudo, foram realizados os ensaios qualitativos preliminares, a partir dos extratos brutos, seguindo a marcha analítica (Domínguez, 1973; Matos, 1988; Souza, 1991), conforme Figura 13. Esta marcha analítica permite detectar classes de metabólitos secundários de plantas como alcalóides, flavonóides, terpenos, entre outros.

Identificação de alcalóides:

- *Meyer*: Dissolve-se 1,36 de cloreto de mercúrio em 60 mL de água destilada. Depois, adiciona-se a uma solução de 5,0g de KI e 10 mL de água destilada. Completa-se a 100 mL com água.
- *Dragendorff*: Dissolve-se 8,0g de subnitrito de bismuto $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ em 20 mL de HNO_3 e 27,2 g KI em 50 mL de água. Misturam-se as duas soluções e deixa-se repousando por 24 horas, completa-se com 100 mL de água destilada.
- *Beltrand*: Dissolve-se 5,0g de ácido sílico-tungstíco são dissolvidos em uma solução de ácido sulfúrico 6N de 100 mL.

Estes ensaios dão reações positivas, quando se observa a formação de um precipitado ou turbidez no tubo de ensaio.

Identificação de esteróides, fitoesteróides, glicosídeos esteroidais e triterpênicos:

- Prova de *Liebermann-Burchard*: Mistura-se 1,0 mL de anidrido acético com 1,0 mL de clorofórmio, resfria-se e adiciona-se uma gota de ácido sulfúrico concentrado. A reação é positiva quando aparece uma coloração laranja.
- Prova de *Rosenheinn*: Uma solução clorofórmica da substância se põe em contato com ácido tricloroacético 90% em água destilada. É positivo para coloração violeta intensa, que depois de 20 minutos muda para azul.

Identificação de flavonóides e flavonóides glicosídeos:

- Os extratos alcoólicos incolores ou ligeiramente amarelos de um vegetal, se tratados com limalhas de magnésio e três gotas de ácido clorídrico concentrado, observa-se imediatamente uma coloração laranja, roxo-azulado ou violeta.

Identificação de taninos:

- *Cloreto Férrico*: Adiciona-se 1 gota de FeCl_3 1% dissolvidos em água destilada sobre 0,2 mL de solução aquosa da substância (em tubo de ensaio). A reação é positiva, se aparecer uma coloração verde, azul ou pardo escuro.

Identificação de sesquiterpen-lactonas:

- *Prova de Baljet*: Prepara-se 2 soluções de volumes iguais, misturadas antes de usar. Solução A (1,0g de ácido pícrico em 100 mL de etanol) e solução B (10g de hidróxido de sódio em 100 mL de água destilada). Para 2-3 mg de composto adiciona-se 3 a 4 gotas do reativo. A reação é positiva ao observar a formação de coloração laranja ou vermelho escuro.

Identificação cumarinas:

- Aplica-se uma gota da solução etérea sobre um papel filtro, onde o mesmo é exposto à luz ultravioleta (365nm). O teste é considerado positivo com o desenvolvimento de fluorescência.

Identificação de leucoantocianidinas:

- A 0,2 mL da solução a se analisada adiciona-se 2-3 gotas de HCl concentrado e leva-se a ebulição em bico de Bunsen. A reação é positiva com o aparecimento de uma coloração vermelha.

Identificação de ácidos orgânicos:

- Evaporar 10 mL de solução até a secura e adicionar 5 mL de água destilada. Determinar o pH da solução, se for ácido confirma-se a presença de ácidos orgânicos.

Identificação de grupos fenólicos:

A 2 mL da solução aquosa obtida acima, adiciona-se 2 gotas de solução de FeCl₃ 1%. O desenvolvimento de coloração azul ou vermelha confirma a presença de fenóis

5.7. Estudo fitoquímico do extrato de *Zantedeschia aethiopica* (copo-de-leite)

O extrato bruto de *Z. aethiopica* foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel onde utilizou-se 5 g de extrato bruto, que foi dissolvido com um mínimo de acetona e misturado com 10 g de sílica gel para formar uma pastilha contendo todo o material adsorvido à sílica. A eluição da coluna foi realizada utilizando o seguinte sistema de eluentes em ordem crescente de polaridade, hexano / acetato de etila / etanol, conforme tabela 1. As sub-frações foram coletadas e concentradas em um evaporador rotativo sob

pressão reduzida e transferidas para frascos menores. As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada.

As frações que apresentaram precipitado, receberam um tratamento diferenciado, na tentativa de isolamento dos possíveis compostos. Estas frações foram estudadas pela análise conjunta de dados espectroscópicos, tais como infravermelho (IV), cromatografia gasosa (CG), ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e carbono 13 (RMN ^{13}C).

Tabela 1 – Frações eluídas através da coluna cromatográfica

Hexano (%)	Acetato de Etila (%)	Etanol (%)	Frações eluídas
100	---	---	1-2
95	5	---	3-5
90	10	---	6-12
85	15	---	13-25
80	20	---	26-31
70	30	---	32-35
60	40	---	36-37
50	50	---	38-59
20	80	---	60-63
---	50	50	64-69
---	---	100	Final de coluna

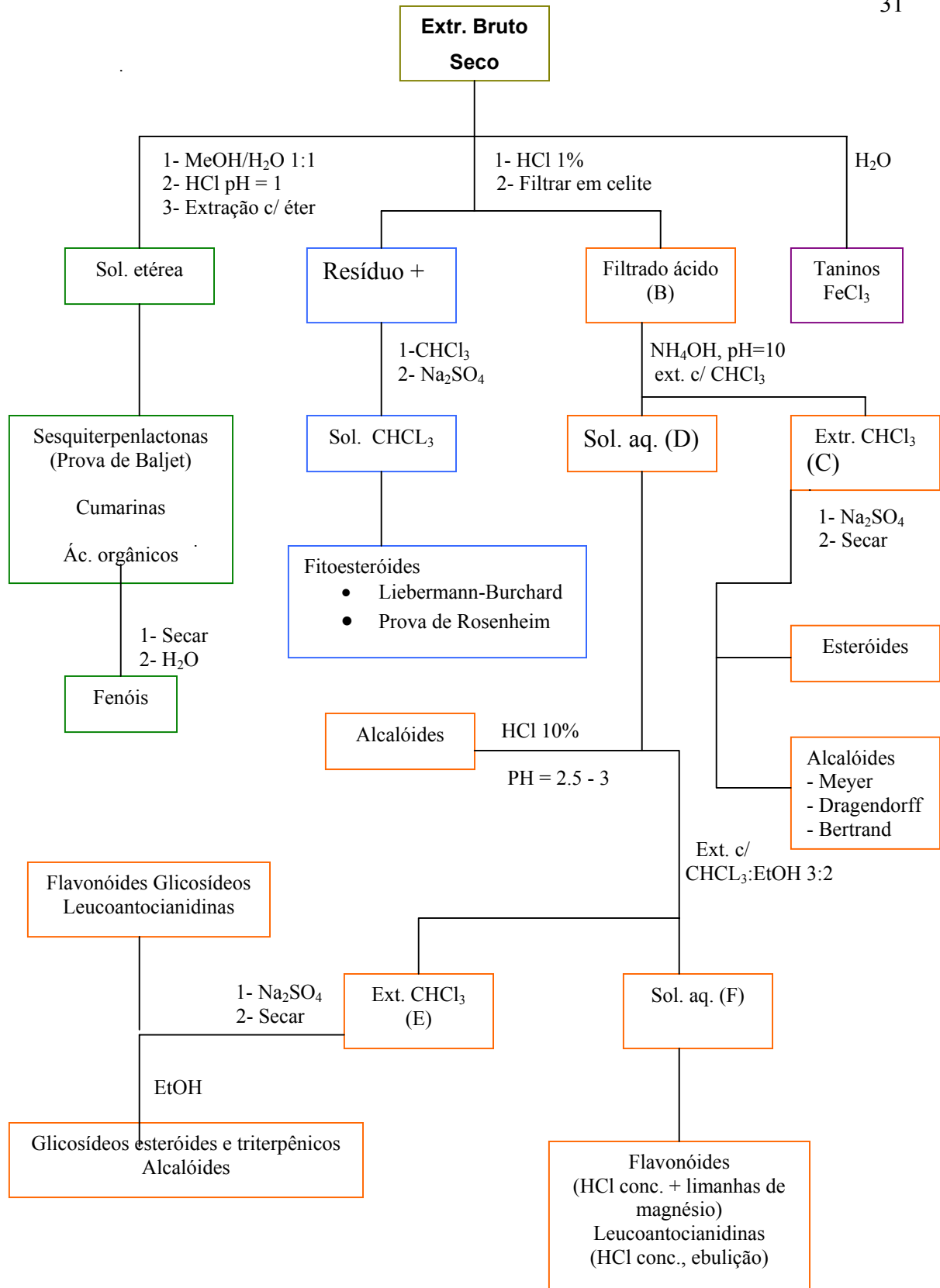


Figura 13 - Fluxograma da marcha analítica

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas tóxicas são importantes fontes de substâncias ativas, pois podem causar intoxicação em seres humanos ou em animais, com prejuízos significativos à saúde pública e a pecuária. Segundo o Centro de Informação Toxicológica do estado de Santa Catarina (CIT-SC), um número restrito de plantas ornamentais está relacionado com a maioria das intoxicações, sendo que comigo-ninguém-pode responde sozinho por 30% dos casos. Plantas pertencentes a família Araceae (copo-de-leite, jibóia, costela-de-adão, antúrio) e da família Euphorbiaceae (coroa-de-cristo, mamona, noqueira) seguem a lista das principais plantas tóxicas.

Estudou-se onze plantas ornamentais, notoriamente tóxicas, quanto a classificação botânica, toxicidade frente a *A. salina* e pesquisa das principais classes de metabólitos secundários encontrados. Na Tabela 2, encontram-se listadas as espécies de plantas identificadas, seu nome popular e científico e a Família botânica a qual pertencem.

Tabela 2 - Plantas tóxicas estudadas.

NOME POPULAR	NOME CIENTÍFICO	FAMÍLIA
Alamanda	<i>Allamanda cathartica</i>	Apocynaceae
Aroeira	<i>Shinus terebinthifolius</i> Raddi	Anacardiaceae
Arruda	<i>Ruta graveolens</i> L.	Rutáceas
Comigo-ninguém-pode	<i>Dieffenbachia</i> sp.	Araceae
Copo-de-leite	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Araceae
Coroa-de-cristo	<i>Euphorbia milii</i>	Euphorbiaceae
Espada-de-são Jorge	<i>Sansevieria</i> cf. <i>trifasciata</i>	Agavaceae
Espirradeira	<i>Nerium ollandier</i> L.	Apocynaceae
Hera	<i>Hedera helix</i>	Araliaceae
Jibóia	<i>Scindapsus aureus</i>	Araceae
Mamona	<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae

6.1. Análise do Bioensaio utilizando *A. salina*

O bioensaio que utiliza *Artemia salina* Leach é um procedimento simples, de baixo custo e apresenta boa correlação com outros ensaios biológicos.

Os extratos estudados neste trabalho mostraram resultados interessantes quanto a letalidade frente a *A. salina*, que é um bioensaio usado com sucesso para detectar

toxicidade de compostos ou extratos de plantas. Por este bioensaio, toma-se como base para considerar uma planta tóxica, o valor $DL_{50} < 1000$ ppm (Meyer et al., 1982).

Na Tabela 3 encontram-se listados os valores de DL_{50} e o limite de confiança de 95% das espécies estudadas, assim como a parte da planta utilizada para fazer o extrato. Dessas plantas, as que apresentaram maior toxicidade frente ao bioensaio com *A. salina*, foram *Ruta graveolens* (arruda), *Sansevieria trifasciata* (espada-de-são-jorge), *Zantedeschia aethiopica* (copo-de-leite), *Nerium ollander* (espirradeira) e *Hedera helix* (hera).

Tabela 3- Resultados obtidos frente ao bioensaio com *Artemia salina* dos extratos brutos das plantas tóxicas.

Nome popular	Partes utilizadas da planta	Valores de DL_{50} (ppm)	Limite de confiança 95%
Alamanda	Folhas e caules	Superior a 1000	-----
Aroeira	Folhas e caules	Superior a 1000	-----
Arruda	Folhas e caules	741,3	660,7-831,7
Comigo-ninguém-pode	Folhas e caules	Superior a 1000	-----
Copo-de-leite	Flores	870,3	729,5-1039,9
Coroa-de-cristo	Folhas e caules	Superior a 1000	-----
Espada-de-são-jorge	Folhas e caules	389,0	375,8-421,7
Espirradeira	Folhas e caules	794,3	609,5-1035,1
Hera	Folhas e caules	912,0	860,1 – 966,3
Jibóia	Folhas e caules	Superior a 1000	-----
Mamona	Folhas, caules e sementes	Superior a 1000	-----

Os extratos de *Alamanda cathartica*, *Schinus terebinthifolius*, *Euphorbia milli*, *Dieffenbachia sp.*, *Scindapsus sp.* e *Ricinus comunis* foram os que apresentaram atividade pouco significante ($DL_{50} > 1000$ ppm), mostrando menor toxicidade diante deste método. Isto não significa que estes extratos sejam menos tóxicos, pois a toxicidade pode estar relacionada com compostos termo- ou foto-sensíveis, que não foram detectados por

este método. Um exemplo é a mamona que apresenta uma proteína, a ricina que exerce intensa ação irritante sobre a mucosa gastrointestinal, e esta pode ter sofrido desnaturação durante o processo de evaporação do solvente. A coroa-de-cristo e comigo-ninguém-pode que causam dermatite através do contato com a planta, também não se mostraram tóxicos para *A. salina*.

6.2. Análise dos ensaios qualitativos para a determinação das classes de produtos naturais presentes no extrato, através de marcha analítica.

A marcha analítica preliminar aplicada aos extratos brutos das espécies estudadas mostrou que a arruda e coroa-de-cristo foram as mais ricas na diversidade de compostos secundários. Na tabela 4 encontram-se os resultados dos ensaios qualitativos realizados para a determinação das classes de produtos naturais presentes nos extratos obtidos.

6.3. Análise do estudo fitoquímico do extrato de *Zantedeschia aethiopica* (copo-de-leite).

Foi escolhido para um estudo fitoquímico preliminar, o extrato hidroalcoólico das flores do copo-de-leite, por apresentar atividade frente a *A. salina* e possuir pouco estudo fitoquímico.

O fracionamento através de coluna cromatográfica e análise através de cromatografia em camada delgada levou a separação das frações 1, 6, 7, 9 e 10, as quais foram analisadas através de espectroscopia de Infra Vermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) e Cromatografia Gasosa (CG).

A fração 1, tinha uma aparência engordurada de cor esbranquiçada. Sua análise através de cromatografia em camada delgada, revelada em iodo, mostrou apenas uma mancha, sendo assim esta seria uma fração interessante, que mereceria a realização de outras análises mais detalhadas. Foi realizada análise por cromatografia gasosa (Anexo 1), e seu cromatograma detectou muitos picos, mostrando a presença de vários compostos diferentes, que podem ser hidrocarbonetos e ésteres de ácidos graxos de cadeia longa.

Como o espectrômetro de Espectrometria de Massa encontra-se desativado, não será possível no momento, dar continuidade ao estudo desta fração.

As frações 6 e 7 apresentaram-se na forma de um semi-sólido de cor laranja bastante parecidas, e foram reunidas por apresentarem semelhança em suas cromatografias em camada delgada. Esta nova fração (6+7), foi submetida à análise em cromatografia gasosa, que detectou três picos bem definidos que confirmam a presença de três compostos majoritários, e outros pequenos picos que podem ser compostos minoritários ou apenas contaminação na amostra. Anexo 2.

A fração 8 também estava na forma de um semi-sólido, porém de cor laranja mais intensa do que as frações 6 e 7. Esta foi analisada em cromatógrafo gasoso (Anexo 3), onde foi detectado a presença de um composto majoritário. Sendo assim, a fração apresenta um grau de pureza considerável, sendo merecedora de um estudo mais detalhado.

As frações 9 e 10, apresentaram suas cromatografias em camada delgadas muito semelhantes, sendo assim reunidas, originando uma nova fração (9+10). Esta foi submetida às técnicas de infravermelho (Anexo 4) e cromatografia gasosa (Anexo 5). O espectro de infravermelho mostra uma absorção em $3422,82\text{ cm}^{-1}$ característica da deformação axial de O-H, parecendo existir a sobreposição de duas bandas de O-H. A absorção em $3009,55\text{ cm}^{-1}$ é característica da deformação axial da ligação carbono de dupla ligação. Duas bandas intensas absorvem na região $2856,53\text{ cm}^{-1}$ e $2928,73\text{ cm}^{-1}$, são características de vibrações de deformação axial de C-H (CH_3 , CH_2 e CH). A banda em $1738,72\text{ cm}^{-1}$ indica a presença do grupo funcional carbonila que sugere a presença de éster. Há uma banda de intensidade moderada a fraca que absorve em aproximadamente em 1630 cm^{-1} , que corresponde a vibrações de deformação axial de C=C de alcenos não-conjugados. As absorções em $1458,81\text{ cm}^{-1}$ e $1376,10\text{ cm}^{-1}$ também são características da deformação da ligação C-H. A absorção em $1170,78\text{ cm}^{-1}$ caracteriza a deformação axial da ligação C-O, que pode ser de álcool ou de éter. Através da cromatografia gasosa constatou-se a presença de três compostos majoritários.

Esta fração (9+10), foi purificada após ter seu sobrenadante separado, e sua recristalização, apresentou um precipitado de leve coloração laranja. Uma nova análise de cromatografia gasosa (Anexo 6), detectou não mais uma mistura de três compostos

majoritários, mas uma fração de maior pureza, representada por um pico mais intenso e bem mais definido, além de vários outros menos intensos. Também foi realizada uma nova análise de infravermelho (Anexo 7), que mostrou-se muito parecido ao anterior, salvo uma maior diferença na intensidade entre a banda característica de carbonila (que sugere ser de éster, $1740,02\text{ cm}^{-1}$) e as bandas duas bandas que absorvem na região $2854,11\text{ cm}^{-1}$ e $2927,38\text{ cm}^{-1}$, características de vibrações de deformação axial de C-H (CH_3 , CH_2 e CH).

A ressonância magnética nuclear de próton, mostrou a presença de hidrogênio ligado a carbono de dupla trissubstituída em 5,36 ppm, hidrogênio ligado a C-O em 3,73 ppm. Em 2,11 ppm e 2,01 ppm observa-se picos relativos a hidrogênios alílicos e alfa-carbonílicos, respectivamente. A presença de grande quantidade de sinais na região entre 1,53 a 0,67 ppm é indicativo da presença de hidrogênios de CH, CH_2 e CH_3 (Anexo 8).

A análise por ressonância magnética nuclear de ^{13}C (Anexos 9.1 e 9.2) mostra um pico em 174,6 ppm relativo a carbonila de éster e no intervalo de 122,4 ppm – 141,4 ppm a existência de 8 átomos de carbono que representam carbonos com dupla ligação. Na região entre 62,1 ppm até 72,5 ppm aparecem cinco picos que representam o deslocamento químico da ligação C-O, que pode ser de éster ou álcool. Percebe-se também a presença de vários átomos de carbono do tipo CH_3 , CH_2 e CH.

O espectro, DEPT 90 (Anexo 10), mostra a presença de 18 átomos de carbono CH, sendo que destes, oito fazem dupla ligação e outra informação importante é a presença de três átomos de carbonos ligados a oxigênio (CH-O). O DEPT 135 (Anexo 11), mostra a presença de três átomos de carbono terminais ligados a oxigênio ($\text{CH}_2\text{-OH}$).

Considerando que estudos fitoquímicos realizados no extrato de *Zantedeschia aethiopica* foram isolados diferentes esteróides das frações menos polares (Della Greca, 1998), as análises espectroscópicas de IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C , sugerem a presença de esteróis na fração analisada. A presença do grupo $\text{CH}_2\text{-OH}$ no espectro de DEPT 135, mostra a possível presença de um esteroide diferente dos isolados anteriormente (Della Greca, 1998). Portanto, mais estudos são necessários no sentido de isolar e identificar este composto, com aplicação posterior do teste de toxicidade frente a *Artemia salina*.

TABELA 4 – Resultados dos ensaios qualitativos realizados para a determinação das classes de produtos naturais presentes nos extratos obtidos.

Classes de produtos naturais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Taninos	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Sesquiterpen-lactonas	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Cumarinas	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Ac. Orgânicos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenóis	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Fitoesteróis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esteróides (CHCl ₃)	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Alcalóides (CHCl ₃)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcalóides (aq.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonóides (aq.)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas (aq.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonóides Glicosídeos (CHCl ₃)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Leucoantocianidinas (CHCl ₃)	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Glicosídeos esteróides e triterpênicos	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Alcalóides (CHCl ₃)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1 = Alamanda, 2 = Aroeira, 3 = Arruda, 4 = Comigo-ninguém-pode, 5 = Copo-de-leite, 6 = Coroa-de-cristo, 7 = Espada-de-são-jorge, 8 = Espirradeira, 9 = Hera, 10 = Jibóia, 11 = Mamona, (+) = Presença, (-) = Ausência.

7. CONCLUSÕES

O bioensaio utilizando o teste de letalidade de *Artemia salina* Leach, como parâmetro para a avaliação da toxicidade geral, apresentou-se viável, barato, rápido e simples, pois não são necessárias técnicas assépticas, equipamentos ou treinamento especial.

Das onze plantas submetidas a este bioensaio, apenas cinco apresentaram valor significativo de toxicidade frente a *A. salina*, foram estas: *Ruta graveolens* (arruda), *Sansevieria trifasciata* (espada-de-são-jorge), *Zantedeschia aethiopica* (copo-de-leite), *Nerium ollander* (espirradeira) e *Hedera helix* (hera).

Os extratos de *Alamanda cathartica*, *Schinus terebinthifolius*, *Euphorbia milli*, *Dieffenbachia sp.*, *Scindapsus sp.* e *Ricinus comunis*, não mostraram toxicidade diante do bioensaio com *A. salina*. Porém, para estes extratos inativos, a toxicidade pode estar relacionada com compostos termo- ou foto-sensíveis, que não foram detectados por este método. A inatividade pode estar associada ainda, a sazonalidade, a idade e parte usada destas plantas.

O ensaio qualitativo, feito através da marcha analítica pode servir no auxílio de posteriores análises fitoquímicas mais avançadas dos extratos vegetais.

As análises fitoquímicas preliminares de *Zantedeschia aethiopica*, em conjunto com análises espectroscópicas sugeriram a presença de esteróis nas frações menos polares da cromatografia em coluna.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Kader, M.S. Wisse, J., Evans, R., van der Werff H., Kingston D.G.I. *Journal Natural Products* **60**, 1294-1297, 1997.
- Agraa, S.E.I., Badwi, S.M.A., Adam, S.E.I., *Tropical Animal Health and Production*, **34**, 271-281, 2002.
- Akah, P.A. & Offiah, V.N. *International Journal of the Pharmacognosy*, **30**, 213-217, 1992.
- Bedir, E., Kirmizipekmez, O., Sticher, O., Cali, S., *Phytochemistry*, **53**, 905-909, 2000.
- Byrd, A., **Color Cyclopedia of exotic Plants and Trees**. 2^a Ed. pp. 256, 1995.
- Carneiro, C.M.T.S., Neves, L.J., Pereira, N.A. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **57**, 392-393, 1985.
- Carneiro, C.M.T.S., Neves, L.J., Pereira, E.F.R., Pereira, N.A. *Revista Brasileira Farmacêutica*, **70**, 11-13, 1989.
- Conway, G.A. & Slocumb, J.C., *Journal of Ethnopharmacology*, **1**, 241-261, 1979.
- Coppen, J.J.W. *Phytochemistry*, **22**, 179-182, 1983.
- Correa, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1984.
- Cruz, C.M., Kasper, P., Cataldo, A., Zamith, H. P., Paumgarten, F. J., *Brazilian Journal of Medical and Biological Reserach*, **29**, 1519-1523, 1996.
- Della Greca, M., Ferrara, M., Fiorentino, A., Mònaco, P., Previtiera, L., *Phytochemistry*, **49**, 1299-1304, 1998.
- Domínguez, X.A., **Metodos de Investigacion Fitoquímica**, Centro Regional de Ayuda Técnica, AID, Bueno Aires, 1973.
- Franssen, F.F.L.J., Berger, I., Medinilla Aldana, B.E., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**, 1500-1503, 1997.
- Guiraud-Dauriac, H. Ghachou, C.M., Laget, M., De Méo, M., Duménil, G., *Mutation Research*, **379**, S131, 1997.
- González, A.G., Freire, R., García-Estrada, M.G., Salazar, J.A., Suárez, E., *Tetrahedron*, **28**, 1289-1297, 1972.
- Gupta, N.C., Singh, B., Bhakuni, D.S. *Phytochemistry* **8**, 791-792, 1969.
- Hamburger, M. & Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **30**, 3864-3868, 1991.
- Hoene, F.C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. 2^o Ed., São Paulo, Imprensa Novos Horizontes, 1978.
- <http://www.Plantastoxicas.cjb.net>
- Ipsen, J. & Feigl, P., **Bancroft Introduction to Biostatistics**, 2nd ed., Harper & Row, New York, 1970, cap. 15.
- Jain, M. K., Yu, B-Z., Rogers, J. M., Smith, A. E., Boger, E. T. A., Ostrander, R. L., Rheinglod, A. L., *Phytochemistry*, **39**, 537-547, 1995.

- Kingsbury, J.M. **Poisonous plants of the United States and Canadá**. Englewood Cliffs, Prentice Hall, 1964.
- Körbes, V.C. Ir., **Plantas Mediciniais**, 48 ed., Francisco Beltrão: Associação de Estudos, Orientação e Assistência Rural, 1995.
- Kumar, O., Sugendran, K., Vijayaraghavan, R., *Toxicon*, **41**, 333-338, 2003.
- Kupchan, S.M., Desserti, A.L., Balylock, B.T., Bryan, R.F. *Journal Organic Chemistry* **39**, 2477-2482, 1974.
- Lorenzi, H., Sousa, H.S.. **Plantas Ornamentais no Brasil arbustivas, herbáceas e trepadeiras**, Ed. Plantaum LTDA, pp. 173, 1981.
- Marston, A. & Hecker, E. *Planta Médica*, **47**, 141-147, 1983.
- Mclaughin, J.L., **Methods in Plant Biochemistry**. Hostettmann, K., Ed.; Academic Press, London, 1991, vol. 6, pp.1.
- McRae, W.D., Hudson, J.B., Towers, G.H.N., *Journal of Ethnopharmacology* **22**, 143-146, 1988.
- Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, B.; Mclaughlin, J. L. *Planta Médica*, **45**, 31-36, 1982.
- Milesi, S., Massot, B., Gontier, E., Bourgaud, F., Guckert, A., *Plant Science*, **161**, 189-199, 2001.
- Mimaki, Y., Inoue, T., Kuroda, M., Sashida, Y., *Phytochemistry*, **44**, 107-111, 1997.
- Mimaki, Y., Inoue, T., Kuroda, M., Sashida, Y., *Phytochemistry*, **43**, 1325-1331, 1996.
- Miya, T.S., Holck, H.G.O., Yim, G.K.W., Menear, J.H., Spratto, G.R. *Laboratory Guide in Pharmacology*. 4th ed., Burgess Publishing, Minneapolis, 1973, pp. 127.
- Morton, J.F., *Fla. State Hort. Soc.*, 71, 372-380, 1978.
- Oliveira-Filho, E.C. & Paumgartten, F.J. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **46**, 342-350, 2000.
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S.L., Osório, R.G., Saldarriaga, M., Díaz, A. *Ethnopharmacology*, **73**, 233-241, 2000.
- Rauber, M.D. *Clinical Toxicology*, **23**, 79-90, 1985.
- Sahpaz, S. *Planta Medica* **60**, 538-541, 1994.
- Sam, T. W. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In: **Bioactive natural products**. Colegata, S. M. e Molyneuse, R. J. EUA: Ed. CRC Press, 1993.
- Scavone, O. & Panizza, S. **Plantas tóxicas**. CODAC-USP, São Paulo, 1980.
- Schempp, C.M., Schöpf, E., Simon, J.C., *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*, **50**, 432-434, 1999.
- Schvartsman, S. **Plantas Venenosas**, São Paulo, Sarvier, 1992.
- Simões, C.M.O., **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, UFRS/UFSC, 1999, cap. 35.
- Smith, J.A., Madden, T., Vijjeswarapu, M., Newman, R.A., *Biochemical Pharmacology*, **62**, 309-321, 2001.

- Siddiqui, S., Hafeez, F., Begum, S., Siddiqui, B. *Phytochemistry*, **26**, 237-241, 1986.
- Tiwari, T.N., Pandey, V.B., Dubey, N.K. *Phytotherapy Research*, **16**, 393-394, 2002.
- Trovato, A., Monforte, M.T., Rossitto, A., Forestieri, A.M., *Bollettino Chimico Farmaceutico*, **135**, 263-266, 1996.
- Trute, A & Nahrstedt, A., *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2**, 126, 1994.
- Uemura, D. & Hirata, Y. *Tetrahedron Letters*, **11**, 881-884, 1973.
- Waite, M. **The Phospholipases**, Plenum Press, New York, 1987.
- Williams, C.A., He, J.B., Mayo, S.J. *Phytochemistry*, **20**, 217-234, 1981.
- Wong, P.Y.K. & Dennis, E.A. **Phospholipase A2: Role and Function in Inflammation**. Plenum Press, New York, 1990.
- Vichery, M.L. & Vichery, B. **Secondary Plant Metabolismo**. The Macmillan Press Ltd., Hong Kong, 1981.
- Zani, C.L., Chaves, P.P.G., Queiroz, R., Mendes, N.M., Oliveira, A.B., Cardoso, J.E., Anjos, A.M.G., Grandi, T.S. *Phytomedicine*, **2**, 47, 1995.

9. ANEXOS

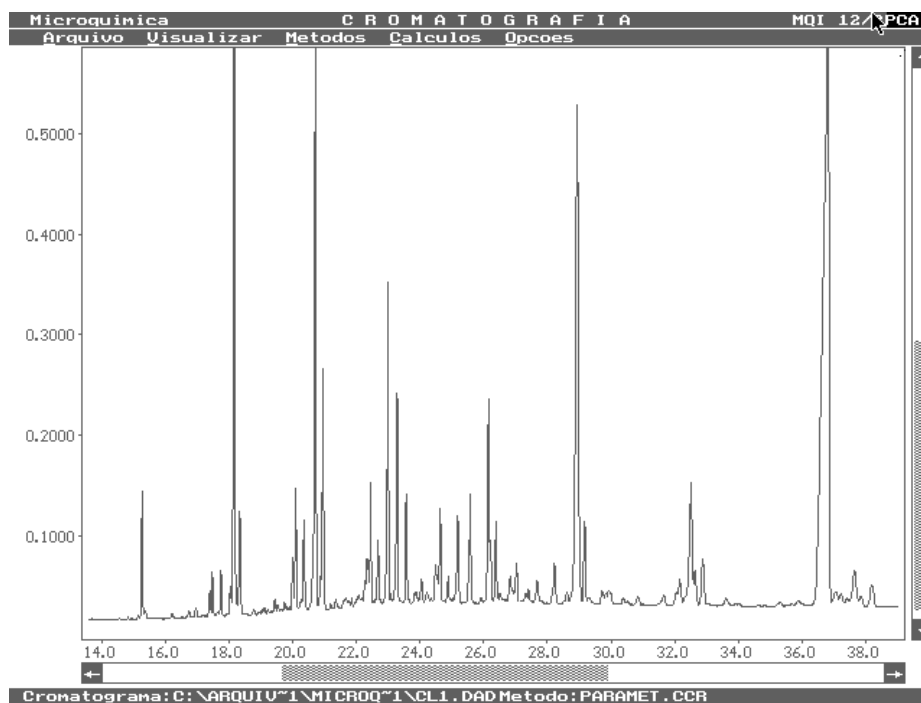


Figura 14 (anexo 1) – Cromatografia gasosa da fração 1.

Condições de análise: Coluna CBP20; temperatura da coluna: 200°C; temperatura do detector: 235°C; temperatura do injetor: 235°C; temperaturas inicial e final: 60°C – 295°C (10°C/min.); solvente: Diclorometano.

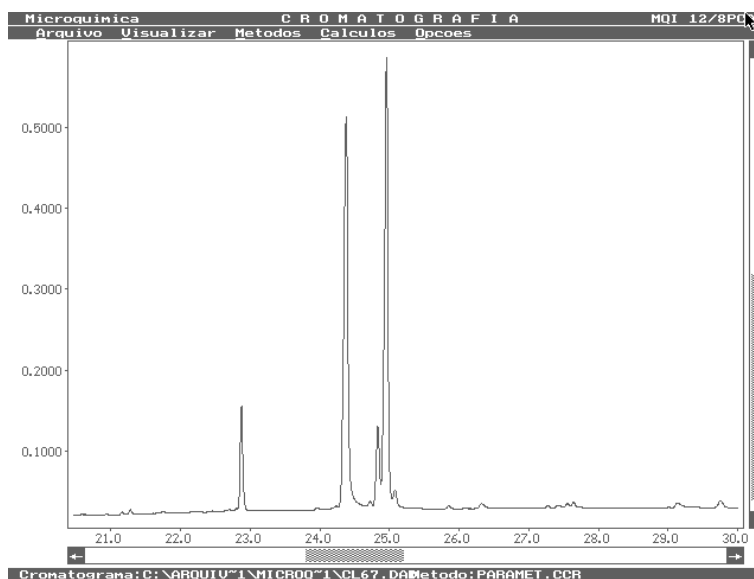


Figura 15 (anexo 2) – Cromatografia gasosa da fração (6+7).

Condições de análise: Coluna CBP20; temperatura da coluna: 200°C; temperatura do detector: 235°C; temperatura do injetor: 235°C; temperaturas inicial e final: 60°C – 295°C (10°C/min.); solvente: Diclorometano.

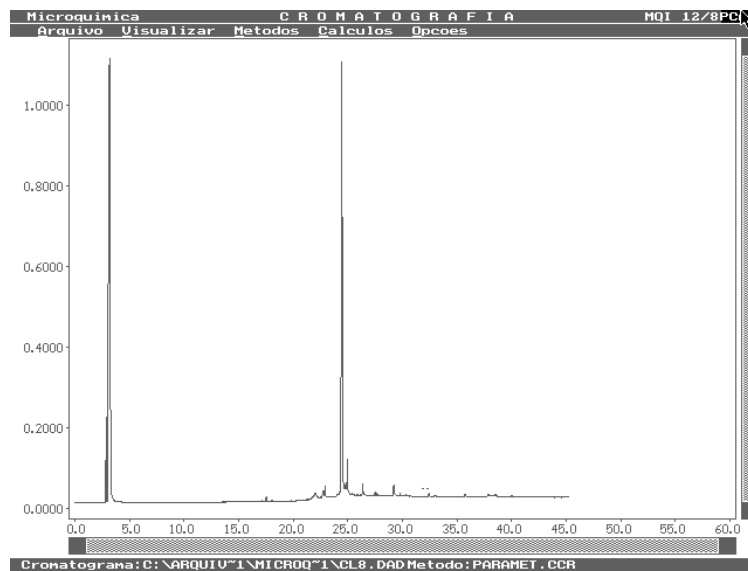


Figura 16 (anexo 3) – Cromatografia gasosa da fração 8.

Condições de análise: Coluna CBP20; temperatura da coluna: 200°C; temperatura do detector: 235°C; temperatura do injetor: 235°C; temperaturas inicial e final: 60°C – 295°C (10°C/min.); solvente: Diclorometano.

Figura 17 (anexo 4) – Infravermelho da fração (9+10), em pastilha de KBr.

Figura 18 (anexo 5) – Cromatografia gasosa da fração (9+10).

Condições de análise: Coluna CBP20; temperatura da coluna: 200°C; temperatura do detector: 235°C; temperatura do injetor: 235°C; temperaturas inicial e final: 60°C – 295°C (10°C/min.); solvente: Diclorometano.

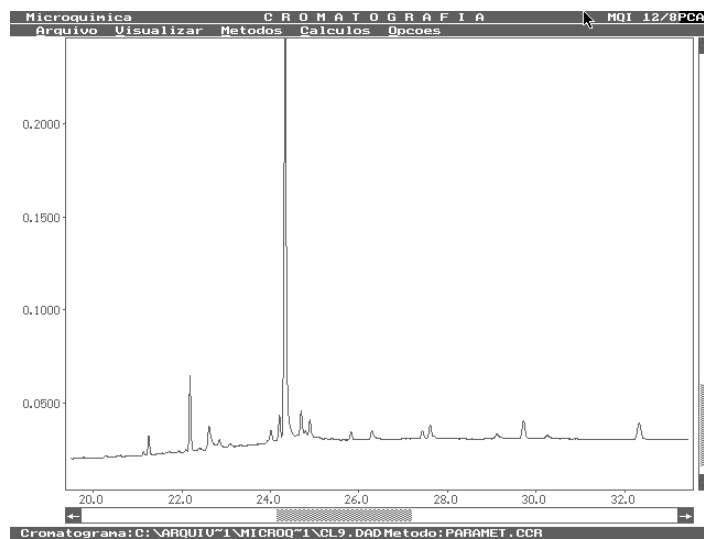


Figura 19 (anexo 6) – Cromatografia gasosa da fração purificada (9+10) .

Condições de análise: Coluna CBP20; temperatura da coluna: 200°C; temperatura do detector: 235°C; temperatura do injetor: 235°C; temperaturas inicial e final: 60°C – 295°C (10°C/min.); solvente: Diclorometano.

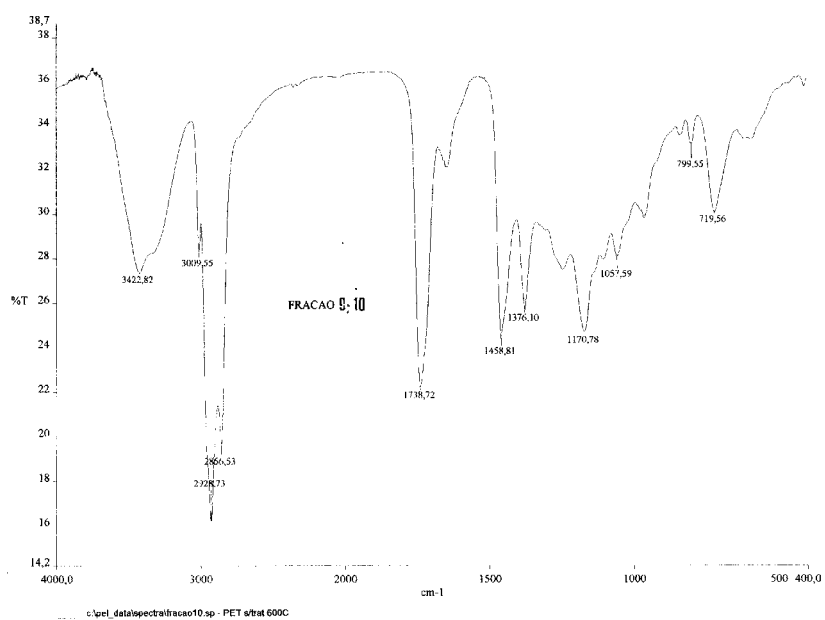


Figura 20 (anexo 7) – Infravermelho da fração purificada (9+10), em pastilha de KBr.

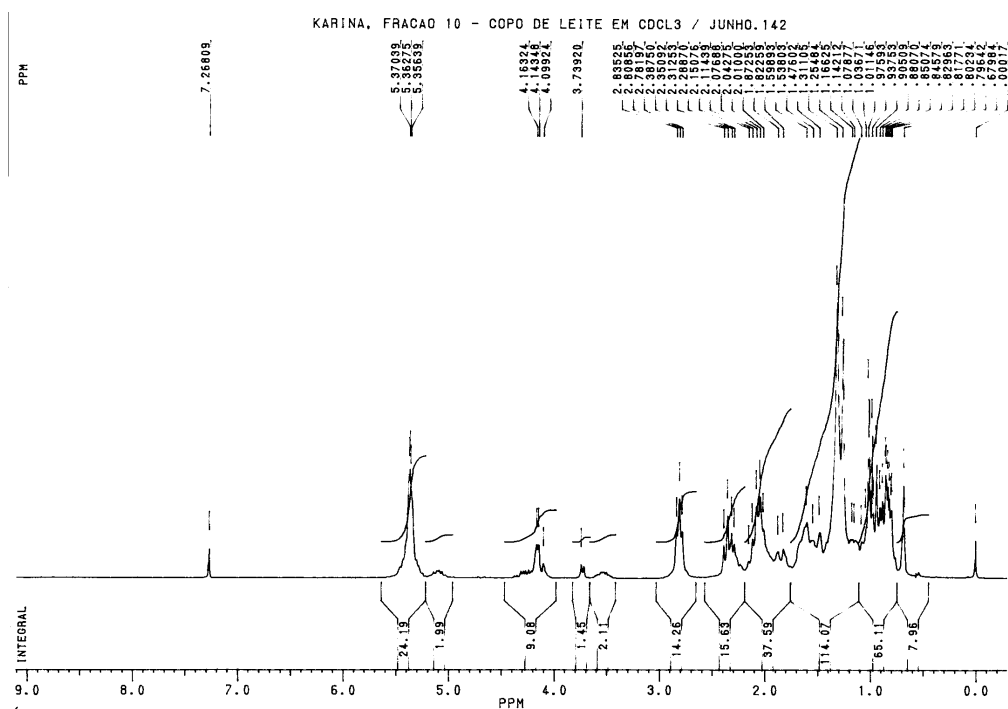


Figura 21 (anexo 8) – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da fração purificada (9+10), em CDCl_3 .

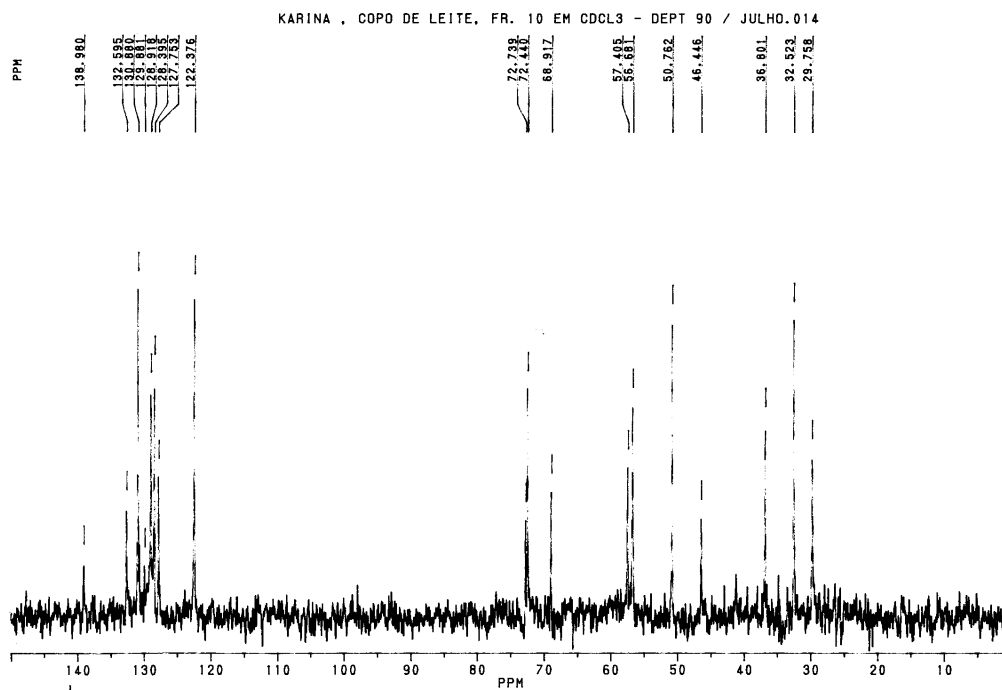


Figura 24 (anexo 10) – DEPT 90 da fração purificada (9+10), em $CDCl_3$.

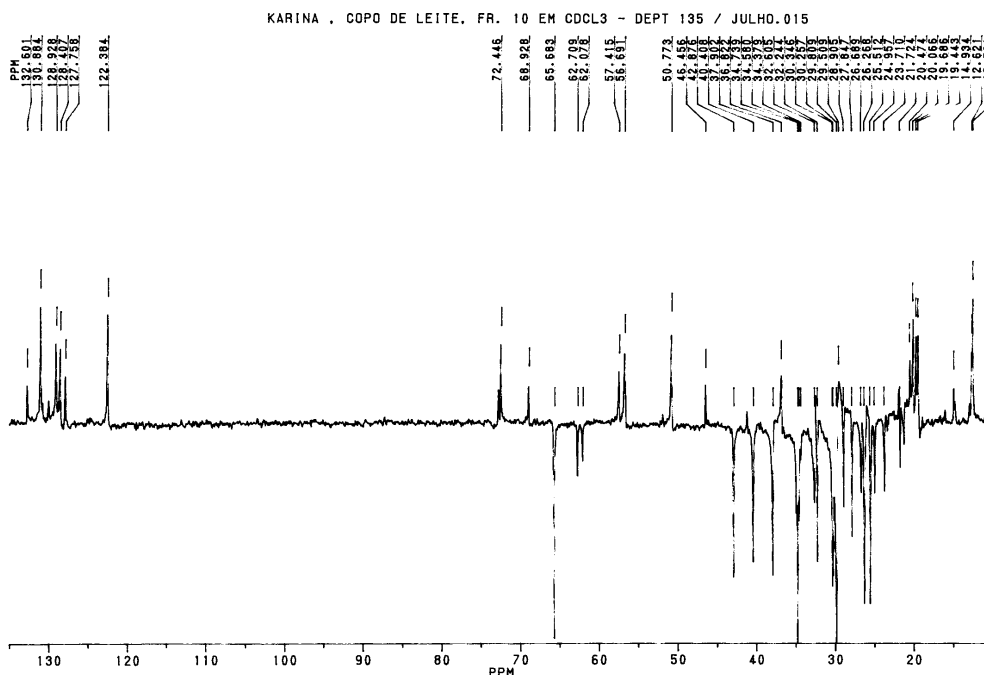


Figura 25 (anexo 11) – DEPT 135 da fração purificada (9+10), em $CDCl_3$.

