

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS

ELLIS MARINA SZABO

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ECOTOXICIDADE DOS EXTRATOS
DAS FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium* Sendtn.
(Solanaceae)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2014

ELLIS MARINA SZABO

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ECOTOXICIDADE DOS EXTRATOS
DAS CASCAS E FOLHAS DE *Cestrum intermedium* Sendtn.
(Solanaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Tecnologia em
Processos Ambientais da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná como
requisito parcial para obtenção de título de
Tecnóloga.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriane Martins De
Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes
Miguel

CURITIBA

2014

ELLIS MARINA SZABO

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ECOTOXICIDADE DOS
EXTRATOS DAS FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium*
Sendtn. (Solanaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:



Membro 1 – Prof^a Dr^a Wanessa Ramsdorf
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR



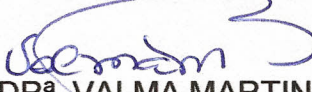
Membro 2 – Prof. Dr. Thomaz Pagioro



Orientadora – Prof^a Dr^a Adriane Martins de Freitas
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR



Co-Orientador – Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Departamento de Farmácia, UFPR



Coordenadora de Curso – PROF^a. DR^a. VALMA MARTINS BARBOSA

Curitiba, agosto de 2014.

RESUMO

SZABO, Ellis Marina. Avaliação preliminar da ecotoxicidade dos extratos das cascas e folhas de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae). 2014. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Tecnologia em Processos Ambientais). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

Este trabalho apresenta uma abordagem teórico-prática da avaliação do potencial ecotoxicológico e perfil fitoquímico de *Cestrum intermedium* Sendtn., uma espécie de solanácea nativa do Brasil, muito utilizada como ornamento por suas flores serem atraentes e de odor agradável. Por ser considerada a planta tóxica de maior importância em regiões do sul do país, desenvolvendo quadro hepatotóxico em gado bovino que ingere suas folhas, ocasionando morte na maioria dos casos, foi realizado o estudo ecotoxicológico preliminar desta espécie, uma vez que somente estudos toxicológicos veterinários foram realizados. A toxicidade aguda dos extratos brutos e frações de cascas e folhas da espécie foi avaliada em náuplios de microcrustáceo de água salgada *Artemia salina* e larvas de *Aedes aegypti*. Os bioensaios traçaram um perfil ecotoxicológico preliminar da espécie, evidenciando atividade tóxica em ambos os organismos. Os resultados dos bioensaios foram avaliados juntamente com o perfil fitoquímico obtido pela realização de ensaio sistemático fitoquímico, possibilitando inferir quais classes de metabólitos secundários são os responsáveis pela atividade. Estas informações são úteis para avaliar possíveis aplicações ambientais de extratos da espécie vegetal, sendo necessária investigação toxicológica aprofundada para avaliar a viabilidade.

Palavras-chave: Coerana. Ecotoxicidade. Espécies vegetais. *Artemia salina*. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

SZABO, Ellis Marina. Preliminary ecotoxicity evaluation of *Cestrum intermedium* Sendtn.'s (Solanaceae) leaves' and barks' extracts. 2014. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Tecnologia em Processos Ambientais). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

This work presents a theoretical and practical approach for preliminary ecotoxicity evaluation and phytochemical profile of *Cestrum intermedium* Sendtn., a native from Brazil Solanaceae species, broadly used as ornament for it's attractive flowers release a pleasant odor. In some southern regions is considered to be the most important toxic plant, for causing liver toxicity in cattle resulting in death most of the times. For those reasons, a preliminary ecotoxicological study was developed, since only veterinarian toxicological studies were ever developed. Leaves' and barks' gross extracts and it's fractions were evaluated in acute toxicity for salt water microcrustacean (*Artemia salina*) and *Aedes aegypti* larvae, showing toxic activity. Bioassays' results were evaluated observing results from phytochemical essays, providing a active secondary metabolic panorama. These information are useful for evaluating environmental applications viability, considering more deeper toxicological studies.

Palavras-chave: Coerana. Ecotoxicity. Herbal species. *Artemia salina*. *Aedes aegypti*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Floração em ramo de <i>Cestrum intermedium</i> em maio de 2013..	15
Figura 2	Distribuição de <i>Cestrum intermedium</i> no território brasileiro.....	15
Figura 3	Exsicata de <i>Cestrum intermedium</i>	16
Quadro 1	Classificação taxonômica de <i>Cestrum intermedium</i>	17
Quadro 2	Comparação entre Toxicologia Clássica e Ecotoxicologia.....	18
Figura 4	Exsicata de <i>Cestrum intermedium</i> depositada no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba.....	23
Figura 5	1: Folhas segmentadas dos caules; 2: Lenho; 3: Caules e cascas (denominados cascas).....	24
Figura 6	Esquema de obtenção de extratos brutos e frações e extrato aquoso	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teor de umidade, cinzas e densidade aparente de folhas de <i>C. intermedium</i>	33
Tabela 2	Teor de umidade, cinzas e densidade aparente de cascas de <i>C. intermedium</i>	34
Tabela 3	Determinação do teor de sólidos do extrato etanólico bruto e aquoso de <i>C. intermedium</i>	34
Tabela 4	Análise sistemática fitoquímica do extrato etanólico das folhas e cascas de <i>C. intermedium</i>	35
Tabela 5	Análise sistemática fitoquímica do extrato aquoso das folhas e cascas de <i>C. intermedium</i>	36
Tabela 6	Toxicidade dos extratos brutos e frações com <i>Artemia salina</i>	37
Tabela 8	Toxicidade dos extratos brutos e frações com <i>Aedes aegypti</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

CE ₅₀	Concentração efetiva que afeta 50% dos indivíduos
DMSO	Dimetilsulfóxido
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
°GL	Graus Gay Lussac
p/V	Relação Peso/ Volume
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
ISO	International Organization for Standardization
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
EBF	Extrato Bruto Folhas
HF	Fração Hexano Folhas
CF	Fração Clorofórmio Folhas
AEF	Fração Acetato de Etila Folhas
RF	Fração Remanescente Folhas
EBC	Extrato Bruto Cascas
HC	Fração Hexano Cascas
CC	Fração Clorofórmio Cascas
AEC	Fração Acetato de Etila Cascas
RC	Fração Remanescente Cascas
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 FAMÍLIA <i>Solanaceae</i>	11
3.2 GÊNERO <i>Cestrum</i>	13
3.3 ESPÉCIE <i>Cestrum intermedium</i>	15
3.4 ECOTOXICOLOGIA.....	18
3.4.1 Ensaio Ecotoxicológicos.....	20
3.4.1.1 Ensaio de Toxicidade aguda em <i>Artemia salina</i>	21
3.4.1.2 Ensaio de Toxicidade Aguda em <i>Aedes aegypti</i>	22
4 METODOLOGIA.....	23
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	23
4.2 TRATAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	24
4.3 ENSAIOS FÍSICOS-QUÍMICOS.....	25
4.3.1 Determinação da Perda por Dessecação.....	25
4.3.2 Determinação do Teor de Cinzas Totais.....	26
4.3.3 Determinação da Densidade Aparente.....	26
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES.....	26
4.4.1 Obtenção dos Extratos Brutos.....	26
4.4.2 Reserva de Extrato Bruto Etanólico.....	27
4.4.3 Determinação do Teor de Sólidos.....	27
4.4.4 Obtenção das Frações dos Extratos Brutos.....	28
4.5 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO.....	29
4.6 BIOENSAIOS.....	30
4.6.1 Avaliação da toxicidade aguda em <i>Artemia salina</i>	30
4.6.2 Avaliação da toxicidade aguda em <i>Aedes aegypti</i>	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	33
5.1.1 Determinação do teor de umidade e cinzas das folhas e cascas.....	33
5.1.2 Determinação do teor de sólidos das folhas e cascas.....	34
5.2 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO.....	34
5.3 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM <i>Artemia salina</i>	36
5.4 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM <i>Aedes aegypti</i>	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A busca de diversos setores industriais por novas substâncias com propriedades interessantes a suas atividades é crescente (BRAZ FILHO, 2010). Procuram alternativas a produtos utilizados em nosso cotidiano, como agroquímicos, aditivos alimentares e medicamentos, a fim de reduzir efeitos danosos inerentes ao seu uso ou melhorar suas performances. Segundo Braz Filho (2010), estas alternativas são provenientes não somente de origens sintéticas, mas também de origens vegetais, uma vez que plantas são fontes significativas de novos compostos, sendo bastante investigadas para obtenção de inovações.

As propriedades interessantes geralmente são desencadeadas pelas substâncias naturais presentes nas plantas, denominadas metabólitos. Os metabólitos primários são substâncias essenciais ao funcionamento adequado do metabolismo básico da planta, tais como carboidratos e proteínas. Os metabólitos secundários, de maneira geral, são todos os outros. O conhecimento sobre identificação, complexidade e quantidade destes tem crescido geometricamente, evidenciando padrões entre o vasto compilado de dados arrecadado, inclusive sobre toxicidade (KINGBURY, 1979).

O Ministério do Meio Ambiente (2014) afirma que, por ter proporções continentais, o Brasil apresenta diversos ecossistemas e biomas, estando na principal posição entre os países megadiversos e detém a maior biodiversidade do planeta. É fundamental que pesquisas com espécies nativas sejam intensificadas, valorizando nossa biodiversidade local ainda pouco estudada, contribuindo para caracterização dos metabólitos presentes na flora nacional.

As solanáceas apresentam diversos exemplares de potencial tóxico, sendo alguns do gênero *Cestrum*, dentre os exemplares, está a *Cestrum intermedium*. Devido ao quadro hepatotóxico ocasionado em bovinos que ingerem folhas de *Cestrum intermedium*, podendo chegar a óbito, reportado em Furlan et al. (2008), Bandarra et al. (2009) e Wouters et al. (2013), pode-se sugerir que há possibilidade de ocorrer danos a outros níveis tróficos. Os metabólitos responsáveis por essa atividade ainda não foram elucidados, uma vez que espécie não apresenta estudos químicos ou ecotoxicológicos aprofundados, somente estudos veterinários. Pertence a uma família rica em substâncias bioativas, tornando viável sua investigação. Um

estudo ecotoxicológico preliminar habilita ou não os extratos da espécie para utilização em possíveis aplicações ambientais (atuando como inseticida em plantação, por exemplo). Para tanto, justifica-se a investigação da *Cestrum intermedium* a fim de avaliar o potencial ecotoxicológico da espécie, resultando em informações inéditas em relação à espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar as propriedades ecotoxicológicas de extratos de *Cestrum intermedium* através de ensaios de exposição aguda com *Artemia salina* e de *Aedes aegypti*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Delinear perfil fitoquímico dos extratos e frações de folhas e cascas de *Cestrum intermedium*
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos e frações de folhas e cascas de *Cestrum intermedium* empregando naúplios de microcrustáceo *Artemia salina* e larvas de *Aedes aegypti*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA Solanaceae

Cerca de cem gêneros compõe a família Solanaceae, uma das maiores e mais complexas dentre as Angiospermas, abrigando em torno de duas a três mil espécies, de acordo com o The Plant List. A família Solanaceae está incluída na subclasse Asteridae, ordem Solanales de acordo com Cronquist (1981). Distribuída geograficamente de forma muito ampla, com centros de diversidade na América do Sul, América do Norte e Oceania, possui representantes herbáceos, arbustivos, arbóreos, escandentes e epifíticos, desenvolvendo-se em grande variabilidade de ambientes, desde campos a florestas, além de regiões antropizadas. São dispersas predominantemente por animais, principalmente morcegos e pássaros. Diversos processos históricos como a migração de espécies, eventos geológicos e evoluções resultantes do isolamento geográfico e ecológico influenciam a distribuição geográfica, que nem sempre é uniforme, principalmente por fatores ambientais como vento, temperatura, taxa de precipitação, altitude e tipo de solo (VENDRUSCOLO, 2009).

As solanáceas geralmente apresentam diversos metabólitos secundários bioativos (alguns tipos de alcaloides, terpenos, flavonoides, saponinas, antraquinonas e outros), configurando ausência ou presença de determinado metabólito, servindo como classificação quimiotaxonômica dos membros da família (SILVA e AGRA, 2005; VAZ, 2008). É provável que os metabólitos secundários tenham surgido como produtos finais de ciclos metabólicos incompletos ou não totalmente balanceados e com potencial tóxico, caso acumulassem em tecidos. As plantas, ao longo de seu curso evolutivo, desenvolveram a capacidade de tornar estas substâncias tóxicas em atóxicas, estocá-las em locais inativos metabolicamente e também empregá-las como defesa contra predadores (KINGSBURY, 1979).

No grau da evolução em que as plantas se encontram, os metabólitos secundários são fundamentais em questão de defesa contra herbívoros, quaisquer que tenham sido os motivos para seu surgimento. Porém, para uma planta ser considerada efetivamente tóxica, não basta a simples presença de metabólitos

tóxicos. Deve ser capaz de apresentá-lo em concentração suficiente para intoxicar o organismo, além de driblar quaisquer mecanismos fisiológicos ou bioquímicos que possam oferecer a fim de inativá-la. Portanto, mesmo que uma planta tenha quantidades significativas de um metabólito tóxico, não se pode presumir que definitivamente tenha o poder de envenenar um organismo (KINGSBURY, 1979).

A verificação da toxicidade depende de experimentos em animais, que nem sempre mimetizam a toxicidade em humanos. O principal interesse em plantas tóxicas reside no potencial em intoxicar seres humanos e animais, resultando em prejuízos significativos à saúde pública e pecuária (SCHENKEL et al., 2002). Existem numerosas espécies vegetais de toxicidade variada, sendo as ornamentais de risco relativamente pequeno, apesar de existirem casos de efeitos mais lesivos. Algumas plantas ornamentais podem produzir efeitos irritantes, distúrbios cutâneos e até sistêmicos. Diversas solanáceas, quando ingeridas, ocasionam um quadro tóxico semelhante entre si, sobressaindo os gêneros *Datura*, *Cestrum* e *Solanum*. O efeito tóxico advém dos diversos alcaloides nelas presentes (SCHVARTSMAN, 2004).

Fazem parte da família: batata (*Solanum tuberosum*), berinjela (*Solanum melongena*), tomate (*Solanum lycopersicum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e beladona (*Atropa belladonna*), Coeranas (*Cestrum* spp) cada qual importante em diferentes aspectos nutricionais, econômicos, toxicológicos e medicinais (SILVA e AGRA, 2005; VAZ, 2008). Dentre os membros da família usados para cultivo ornamental, principalmente pelas flores, destacam-se algumas espécies, como as trepadeiras de *Solanum* com flores roxas e frutos vermelhos. As espécies de *Cestrum* com flores amarelo-ovo e inflorescência semelhante a um guarda-chuva, *Petunia* e *Salpiglossis* também são cultivadas para fins ornamentais. Muitas plantas desta família são tóxicas, em destaque a *Atropa belladonna*, de onde se extrai a atropina, medicamento largamente utilizado na terapêutica (JOLY, 1985).

Evidências indicam que as solanáceas tem potencial terapêutico que deve ser investigado. Diversos membros da família Solanaceae são utilizados popularmente para tratamento de inúmeras moléstias, como exemplo, a berinjela para eliminar cálculos de bexiga (PASTORE et al., 2002). No entanto, algumas solanáceas apresentam propriedades tóxicas em determinadas dosagens, como a *Datura stramonium* L. (erva-do-diabo), *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) e *Brunfelsia uniflora* (Pohl) D. Don. As folhas e frutos verdes do tomate (*Solanum lycopersicum* L.),

quando ingeridos, podem causar intoxicação extrema e levar à morte por falha respiratória (LORENZI; MATOS, 2008).

A principal causa da toxicidade dominante desta família advém dos alcaloides, substâncias orgânicas cíclicas com nitrogênio em estado de oxidação negativa, com distribuição limitada entre os organismos vivos. Esse grupo químico tem grande impacto na economia, medicina e até em setores sociais e políticos, desde a execução de Sócrates com extrato de cicuta, contendo coniina, passando pelo uso do curare nas pontas de flechas, contendo tubocurarina, até o uso da atropina, extraída de *Datura stramonium* L., como antiespasmódico. Os alcaloides afastam predadores pela toxicidade e também pelo seu gosto amargo, apesar de inúmeros deles também apresentarem diversas aplicações na terapêutica (HENRIQUES et al., 2002).

Algumas espécies de Solanaceae, como as folhas de tabaco preparadas para a confecção de charutos e cigarros, que resultam em alto teor de nicotina e outros alcaloides, tem aplicações ambientais. Soluções a 40% deste preparado são utilizadas como inseticidas agrícolas, especialmente em horticultura e floricultura, sendo ambientalmente viável por tratar-se de substâncias naturais e biodegradáveis (LORENZI; MATOS, 2008).

3.2 GÊNERO *Cestrum*

O gênero *Cestrum* (do grego: 'kestron', de 'kestron' = dardo) tem suas espécies difundidas nas zonas tropicais e subtropicais das Américas, podendo ser considerado o segundo maior da família das solanáceas, abrigando cerca de 200 espécies. O Brasil é um dos maiores centros de diversidade de espécies, estimando que algo em torno de 50 das aproximadas 200 estão presentes na América. Pertencente à tribo *Cestreae* G.Don e à subfamília *Cestroidae* Schltld., o gênero tem a maior diversidade de espécies e endemismo nos biomas de Mata Atlântica e Cerrado, ameaçados por desmatamento (SOARES, 2006; SOARES et al., 2007; KISSMANN; GROTH, 2000).

Tipicamente americano, conta com espécies de valor ornamental (*C. diurnum* L., *C. nocturnum* L., entre outras), empregadas na medicina popular (*C. laevigatum* Schltld., *C. sendtnarianum* L., entre outras) ou causadores de intoxicações e até

morte em animais (*C. intermedium* Sendtn., *C. laevigatum* Schltldl., entre outras). Um quadro toxicológico similar ao que ocorre em *Cestrum intermedium* acontece em *Cestrum laevigatum*, que contém saponinas esteroidais tóxicas (gitogenina e digitogenina) e cestrumida. Ainda assim, não há levantamento aprofundado das espécies brasileiras, resultando que as propriedades de muitas delas não estejam descritas (SOARES, 2006; SOARES et al., 2007; KISSMANN; GROTH, 2000; COUTINHO et al., 2013).

Embora seja considerado o segundo maior gênero da família Solanaceae, não há extensa investigação das espécies brasileiras de *Cestrum*, ocasionando que a identidade de muitas delas permaneça duvidosa. As relações intergenéricas, a estabilidade morfológica interespecífica e a variação morfológica intraespecífica comprometem a identificação dos táxons e a avaliação da magnitude do gênero, gerando opiniões divergentes quanto ao número de espécies e a circunscrição do gênero (SOARES et al., 2007).

A taxonomia do gênero é muito complexa, pois tem grande semelhança morfológica com o gênero *Sessea* Ruiz et Pav., causando dificuldades de identificação. As características compartilhadas por *Cestrum* e *Sessea* são o porte arbustivo ou arbóreo, flores sempre articuladas na base, corola tubulosa, androceu com cinco estames inclusos no tubo, anteras dorsifixas, nectário anelar e frutos paucisseminados. Diferem-se pelo tipo de fruto e particularidades nas sementes, em *Cestrum* angulosas, não aladas e alojadas no interior de bagas carnosas e em *Sessea* compridas, aladas e contidas em cápsulas lenhosas (SOARES, 2006).

Em território brasileiro, as espécies são conhecidas pelo nome vulgar 'coerana' (do tupí-guarani: 'cuí' = pimenta, e 'rana' semelhante, uma vez que seus frutos assemelham-se às bagas de pimenta). Algumas espécies de *Cestrum* são plantas ornamentais muito populares como a Coerana-amarela (*C. corymbosum* Schltldl.), arbusto nativo do Brasil, cujas sementes servem de alimento para pássaros e a Dama-da-noite (*C. nocturnum* L.), arbusto originário das Antilhas, que pode causar reações alérgicas devido ao seu marcante perfume (LORENZI; SOUZA, 2008).

Com base nas características do cálice e da corola, as espécies de *Cestrum* foram classificadas por Dunal (1852) como *Habrothamnus* (Endl.) Schltldl. e *Eucestrum*. Posteriormente, Urban (1903) adicionou a seção *Pseudocestrum* com base em uma espécie das Antilhas. Mais recentemente, o estudo filogenético de

Montero-Castro et al. (2006), indica que não são monofiléticas as seções tradicionalmente propostas em *Cestrum* (GALLEGO, 2011).

3.3 ESPÉCIE *Cestrum intermedium*

A *Cestrum intermedium* Sendtn. é uma espécie que ocorre tanto à beira de matas quanto em locais antropizados. Há indícios da floração (Figura 1) ocorrer de março a maio, assim como em dezembro e a frutificação em abril, maio, junho, agosto, dezembro e janeiro. É uma das espécies do gênero *Cestrum* responsáveis por intoxicações em rebanhos bovinos, levando a lesões hepáticas e consequentes danos à economia (SOARES et al., 2007). Sua ocorrência no território brasileiro está ilustrada na Figura 2.



Figura 1 - Floração em ramo de *Cestrum intermedium* em maio de 2013
Fonte: Acervo pessoal (2013).



Figura 2 - Distribuição de *Cestrum intermedium* no Território Brasileiro
Fonte: Adaptado de REFLORA (2012).

A espécie de porte arbustivo ou arbóreo, popularmente chamada de ‘mata-boi’, ‘coerana’, ‘peloteira ou piloteira preta’ e ‘erva-de-tinta’, de acordo com Kissmann e Groth (2000), tem como espécie o nome de *intermedium* por ser considerada uma forma intermediária entre *parqui* e *cuspidatum* e como sinônimo *C. megalophyllum* Witasek. É conhecidamente tóxica para gado bovino e experimentalmente denominada hepatotóxica, levando à insuficiência hepática aguda, em doses únicas de 25 g.kg⁻¹. Um quadro clínico semelhante a compostos hepatotóxicos agudos é ocasionado pela ingestão de folhas de *Cestrum intermedium* (mostrada na Figura 3) (BANDARRA et al., 2009, WOUTERS et al., 2013).



Figura 3 - Exsicata de *Cestrum intermedium*
Fonte: REFLORA (2012).

Os sintomas de intoxicação em gado bovino são de anorexia, tremores musculares, andar cambaleante, pelos arrepiados, focinho seco e abundante salivação. As fezes apresentam-se secas, com presença de muco e estrias de sangue ou pastosas e escuras. Os animais apoiam a cabeça contra obstáculos ou permanecem deitados. O óbito pode ocorrer entre um e três dias após a ingestão de partes da planta devido a lesões no fígado. É recomendada a remoção das plantas em áreas de pastagem, tomando o cuidado de retirar as partes cortadas do alcance dos animais, pois os componentes tóxicos permanecem ativos e as folhas cortadas

e murchas são ingeridas com maior facilidade (RIET-CORREA; MÉNDEZ; SCHILD, 1993; KISSMANN; GROTH, 2000).

No extremo oeste e noroeste de Santa Catarina, assim como no Sudoeste do Paraná, é considerada a planta tóxica de maior importância. Apresenta morbidade variável ao gado que a consumiu, mas ocorre em até 70% dos casos. Os compostos responsáveis ainda não são conhecidos (RIET-CORREA; MÉNDEZ; SCHILD, 1993; KISSMANN; GROTH, 2000). Há espécimes presentes no Parque Municipal do Barigui, na cidade de Curitiba, contemplando a floresta ombrófila mista da região (KOZERA et al., 2006).

Trata-se de uma planta perene, higrófito e heliófito, disseminada por sementes (glabras, amarelo brilhantes, podendo apresentar fragmentos aderentes ao fruto), com tendência a restabelecer-se após corte; apresenta tronco com ramos compridos e glabros e raízes bem desenvolvidas; suas folhas são alternas, dispostas à volta dos ramos com curto distanciamento, apresentando pecíolos de até 15 mm; os limbos são estreito-lanceolados, atenuados na base e de ápice subacuminado, com até 14 cm de comprimento, lisos, glabros e verdes; inflorescências verde-amareladas, predominantemente axilares, em corimbos com até 15 flores, com brácteas pequenas; frutos pretos quando maduros (KISSMANN; GROTH, 2000).

A *Cestrum intermedium* é uma traqueófito da classe das *Magnoliopsidas*, de ordem *Solanales* e Família *Solanaceae*. Tem como subespécie *Cestrum intermedium* Witasek var. *Virgatum* (STEHMANN, 2012). A taxonomia da espécie está descrita no Quadro 1.

REINO	Plantae
FILO	Tracheophyta
CLASSE	Magnoliopsida
ORDEM	Solanales
FAMÍLIA	Solanaceae
GÊNERO	<i>Cestrum</i>
ESPÉCIE	<i>Cestrum intermedium</i> Sendtn.
SUBESPÉCIE/ SINÔNIMOS	<i>Cestrum intermedium</i> Witasek var. <i>Virgatum cuspidatum</i> Sendtn.

Quadro 1 - Classificação Taxonômica de *C. intermedium*
 Fonte: REFLORA (2012); Arctos (2013).

3.4 ECOTOXICOLOGIA

Em 2008, Zagatto apresenta a definição de ecotoxicologia, elaborada pelo *Committee of the International Council of Scientific Unions (ISCU)*:

Ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado.(Zagatto, 2008, p. 6)

A ecotoxicologia exige conhecimentos de diversas áreas, pois avalia os danos ocorridos em ecossistemas após a contaminação e previsão de impactos futuros. Ecologia, Toxicologia, Biologia, Bioquímica, Estatística, Limnologia e diversas outras disciplinas se enquadram na aplicação de Ecotoxicologia (ZAGATTO, 2008).

Toda a substância tem potencial tóxico de ação. Frente à capacidade dos seres vivos desencadearem mecanismos de proteção, geralmente metabólicos, substâncias tóxicas podem ter seu efeito mensurado em bioensaios. Efeitos estes que podem apresentar-se no DNA, transporte de elétrons, sistemas enzimáticos, compartimentos celulares e até gerar formações celulares, que nem sempre são facilmente visualizados, tornando viável o uso de biotestes para avaliar resultados sem discriminar a causa fisiológica de um dano, como por exemplo “morto” e “não-morto” (KNIE; LOPES, 2004).

A ecotoxicologia difere-se da toxicologia clássica especialmente em seu objeto de estudo (homem e espécies de ecossistemas). No Quadro 2, estão as diferenças básicas entre Toxicologia Clássica e Ecotoxicologia ressaltadas por Zagatto (2008):

Toxicologia Clássica (mamíferos)	Ecotoxicologia
Objetiva proteger o homem	Objetiva proteger populações e comunidades (aves, peixes, mamíferos e outros organismos aquáticos e terrestres)
Utiliza ratos, camundongos, coelhos, cobaias, etc.	Podem ser utilizados os próprios animais que se almeja proteger
Como a espécie de interesse é o homem, há menor grau de incerteza na extrapolação	A extrapolação dos dados é mais difícil devido às variações de fatores ambientais (pH, temperatura, dureza das águas, etc.)
continua	

continuação	
Toxicologia Clássica (mamíferos)	Ecotoxicologia
A dose do agente químico é calculada e injetada diretamente no indivíduo	A concentração do agente químico no meio (ar, água, solo, alimento) é mais variável
Maior ênfase em elucidar o mecanismo de ação	Maior ênfase à medida da concentração do agente químico no meio, com vistas às necessidades reguladoras, mecanismos de ação e relação estrutura/atividade
Metodologias bem desenvolvidas, sendo suas limitações e utilização bem conhecidas	Metodologias mais novas, algumas padronizadas, outras em desenvolvimento

Quadro 2 - Comparação entre Toxicologia Clássica e Ecotoxicologia
Fonte: Zagatto (2008).

Organismos vivos são expostos a agentes ambientais capazes de induzir modificações químicas em nível celular e molecular, ocasionadas por agentes químicos, físicos ou biológicos. A bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporada ao processo de identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas. Para tanto, são utilizados ensaios biológicos, a fim de avaliar os efeitos diversos e outras propriedades lesivas (SOUZA, 2005).

Análises químicas de substâncias identificam e quantificam compostos, enquanto análises biológicas qualificam os efeitos causados por eles. Entre as análises biológicas, estão as ecotoxicológicas, revelando efeitos agudos ou crônicos causados por substâncias na matéria viva, com a grande vantagem de, muitas vezes, evidenciarem reação para concentrações inferiores às detectáveis por análises químicas. A principal finalidade da ecotoxicologia é verificar se, e em que proporção, determinada substância (pura ou em mistura) é nociva, além de que maneira e em que local ocorrem estes efeitos. Os sistemas vivos (organismos inteiros ou apenas parte deles) respondem de forma específica a perturbações diretas ou indiretas promovidas por compostos nocivos. Em alguns casos, a resposta é tão visível e mensurável, que podem ser considerados sensores biológicos de medição de efeitos (KNIE; LOPES, 2004; GUARANTINI et al., 2004).

3.4.1 Ensaios Ecotoxicológicos

A aplicação de ensaios ecotoxicológicos é muito vasta, desde avaliar o risco potencial de substâncias químicas ao meio ambiente, monitorar a qualidade de águas e solos, controle da eficiência e fiscalização de Estações de Tratamento de Esgotos, passando pela identificação de substâncias poluidoras, determinação de biodegradabilidade de substâncias, chegando à investigação de sinergismo e antagonismo entre substâncias e seu potencial bioacumulativo (KNIE; LOPES, 2004).

De acordo com Knie e Lopes (2004) as reações de plantas e animais ocasionadas a partir do contato com contaminantes da natureza levaram à consideração o emprego de organismos como indicadores de impactos ambientais. Ao longo dos anos, diversos procedimentos foram desenvolvidos e aperfeiçoados, visando garantir a uniformidade entre ensaios. Hoje, em essência, as metodologias aplicadas são as mesmas aprimoradas outrora, porém, com adaptações que agregam descobertas posteriores a suas consagrações na comunidade científica. Os ensaios são padronizados internacionalmente pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) e pela *International Organization for Standardization* (ISO), garantindo a comparabilidade de resultados entre laboratórios (KNIE; LOPES, 2004). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) padroniza os ensaios ecotoxicológicos no Brasil.

A maioria dos biotestes tem o objetivo de encontrar agentes capazes de afetar a níveis fisiológicos e moleculares o organismo exposto. É valioso utilizar organismos sensíveis a substâncias presentes em mais de um ambiente (aquático, terrestre e atmosférico) e que permitam a detecção de muitas classes de danos em diversos tipos de célula (SOUZA, 2005).

De acordo com Knie e Lopes (2004), independentemente do objetivo da análise ecotoxicológica, alguns critérios devem ser obedecidos nos biotestes. São eles:

- O cultivo ou manutenção dos organismos-teste, mantendo sempre o sistema de teste disponível;
- Escolha de organismo-teste de sensibilidade equilibrada, a fim de evitar falsos-positivos ou falsos-negativos;

- Padronização das condições de teste, garantindo a reprodutibilidade e a validade estatística do resultado;
- Realização dos testes de maneira que racionalize o tempo, espaço físico, recursos, materiais e organismos-teste, principalmente para testes de rotina;
- O tempo entre o primeiro contato do organismo-teste e a amostra até o surgimento de reações visíveis ou mensuráveis, denominado rapidez, deve ser o mais curto possível. Principalmente por ter um importante papel no *screening* de substâncias, atendimento de acidentes ou como sistema de alerta em forma de biomonitores.

Para diferentes objetivos, opta-se por diferentes princípios de análise. Os testes agudos detectam efeitos imediatos e, geralmente, irreparáveis. Os efeitos agudos são causados geralmente por altas concentrações. Os testes crônicos ou subletais evidenciam danos causados por longas exposições a baixas concentrações (KNIE; LOPES, 2004; GUARANTINI et al., 2008).

A verificação da toxicidade depende de experimentos em animais, que nem sempre mimetizam a toxicidade em humanos. O principal interesse em plantas tóxicas reside no potencial em intoxicar seres humanos e animais, resultando em prejuízos significativos à saúde pública e às atividades pecuárias e ao ambiente. Porém, alguns tóxicos podem gerar danos ao ecossistema, sem apresentar toxicidade aos humanos (SCHENKEL et al., 2002; GUARANTINI et al., 2004). A relevância em avaliar o potencial ecotoxicológico de *Cestrum intermedium* fica evidente, principalmente por já estar comprovada sua toxicidade em bovinos, como relatado em Furlan et al. (2008), Bandarra et al. (2009) e Wouters et al. (2013).

3.4.1.1 Ensaio de Toxicidade aguda em *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade em *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salobra/salgada, é um bioensaio largamente utilizado em pesquisas de produtos naturais. Seus cistos liofilizados são comercializados como alimento para peixes de aquário e são eclodidos de maneira prática. Trata-se de um experimento simples (fácil domínio, sem necessidade de assepsia, rápido e acessível economicamente) e seus usos incluem investigação de fontes de toxicidade de amostras ambientais e misturas químicas, detecção de toxinas naturais em alimentos e produtos

farmacêuticos, além de parâmetros de citotoxicidade (MEYER et al., 1982); (PERSOONE; WELLS, 1987). O objetivo do método concentra-se em avaliar preliminarmente se existem compostos bioativos e se há necessidade de submeter as amostras a ensaios mais específicos. Desde a introdução por Meyer et al. (1982), verificando a toxicidade aguda de extratos de diversas espécies vegetais, este método vem sendo utilizado no isolamento de agentes antitumorais ativos *in vivo* e pesticidas produzidos por plantas (GHISALBERTI, 2008). Obtém-se uma boa correlação entre o bioensaio prévio realizado em *Artemia salina* e os testes em culturas celulares tumorais. Diversos estudos procuram correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como: antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, entre outras (SIQUEIRA et al., 1998).

3.4.1.2 Ensaio de Toxicidade Aguda em *Aedes aegypti*

O ensaio de toxicidade aguda em *Aedes aegypti* verifica o efeito biológico de compostos complexos ou isolados em larvas, buscando alternativas para o controle da proliferação do mosquito de maior dispersão em áreas urbanas no mundo. O controle de proliferação tem relevância para a saúde pública, uma vez que o *Aedes aegypti* tem capacidade de vetorizar os quatro sorotipos de dengue e vírus da febre amarela (SILVA, 2004).

Há populações de *Aedes aegypti* resistentes aos inseticidas convencionais empregados, levando a tentativas mal sucedidas de controle dos vetores da dengue. Portanto, a busca por alternativas eficientes no combate das larvas ou do próprio mosquito, além de baixa toxicidade ao meio ambiente, enquadra extratos vegetais e substâncias naturais como alvo de pesquisas para controle do desenvolvimento de *Aedes aegypti* (HEMINGWAY e RANSON, 2000).

Após a obtenção dos ovos de *Aedes aegypti*, trata-se de um ensaio de fácil execução e rápido. Semelhante ao ensaio de toxicidade com *Artemia salina*, é um importante ensaio de toxicidade preliminar e pode evidenciar possibilidades relevantes para controle do vetor da dengue, problema de saúde pública em nosso país, devendo ser analisado com ensaios toxicológicos mais aprofundados.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Para a obtenção do material botânico *Cestrum intermedium*, foi avaliado um possível exemplar da planta, presente no bairro Campo Comprido, na cidade de Curitiba (25°26'46.3"S 49°20'50.5"W). A identificação foi realizada por Osmar dos Santos Ribas, curador do Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, comparando às exsicatas arquivadas no herbário. O depósito da exsicata do material identificado ocorreu nesta instituição, sob o registro MBM384025 (Figura 4). Após o processo de identificação e depósito de exsicata, ramos do exemplar foram coletados no mês de abril de 2013.

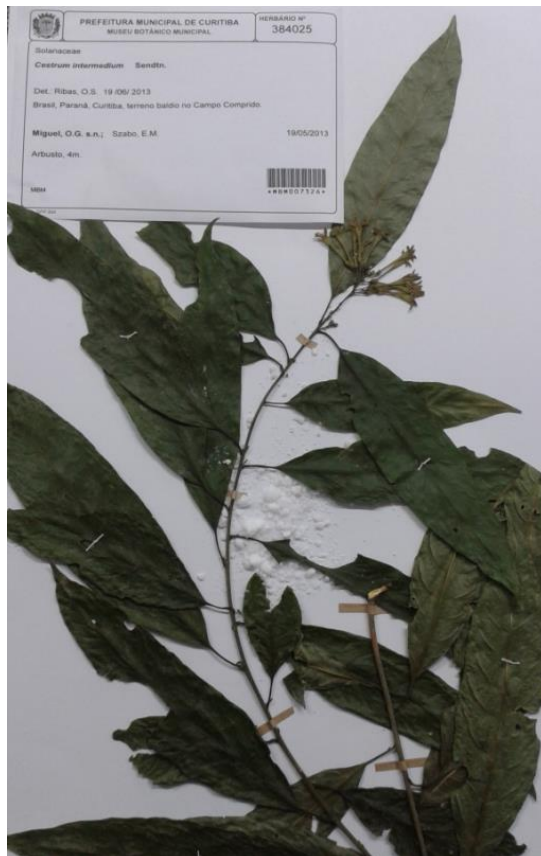


Figura 4 - Exsicata de *Cestrum intermedium* depositada no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba
Fonte: Acervo pessoal (2013).

4.2 TRATAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO

Após a coleta, iniciou-se o preparo do material botânico para subsequente obtenção dos extratos de folhas e cascas. Para tanto, as folhas foram separadas dos ramos, gerando dois objetos de estudo. Os ramos foram segmentados com auxílio de tesouras de jardinagem, sendo os mais espessos descascados com auxílio de facão, sendo o lenho inutilizado e as cascas reunidas aos ramos previamente segmentados, como mostra a Figura 5. Para o presente trabalho, o material resultante da união dos ramos segmentados e cascas dos ramos mais espessos foi denominado como cascas de *Cestrum intermedium*.



Figura 5: 1: Folhas segmentadas dos caules; 2: Lenho; 3: Caules e cascas (denominados cascas).

Fonte: Acervo pessoal (2013).

As folhas e cascas foram processadas separadamente. Primeiramente, foram secas em estufa com circulação de ar forçada constante a 60° C por 12 horas, a fim de estabilizar processos enzimáticos e de degradação, garantindo integridade do material botânico, de acordo com o método descrito na Farmacopeia Brasileira (2010). Em seguida, foram trituradas em moinho de martelos e facas (marca TRAPP

modelo TR40), facilitando o manuseio do material e otimizando a percolação de solventes para a extração de seus componentes. No fim deste processo, obteve-se cerca de 990 g de folhas e 1850 g de cascas, em fragmentos menores que 3 mm. O armazenamento do material seco, estabilizado e triturado ocorreu em local fresco, ao abrigo de luz e de baixa umidade.

4.3 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Os ensaios físico-químicos são importantes parâmetros a se estabelecer, pois servem para definir/confirmar padrões de controle de qualidade para determinada espécie, uma vez que denunciam adulterações ou falsificações de material. No caso de *Cestrum intermedium*, foram estabelecidos pela primeira vez, trazendo dados inéditos ao compilado da espécie.

4.3.1 Determinação da Perda por Dessecação

O procedimento foi executado em sextuplicata através do método gravimétrico, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010). Utilizando material triturado, seco e estabilizado, foi pesado um grama (1 g) de amostra em cadinho de porcelana previamente seco, padronizado e identificado. O conjunto foi levado à estufa de circulação de ar forçada a 100-105° C, por cinco horas. Os cadinhos foram depositados em dessecador até resfriamento completo (permanecendo livres de variação de massa por absorção de umidade do ar) e procedeu-se à pesagem novamente. O teor de umidade pode ser determinado a partir da diferença entre a umidade do material estabilizado e a umidade do material seco em estufa (em massa) em relação ao material estabilizado, caracterizando a perda por dessecação (em U%, porcentagem de umidade), como demonstrado na equação:

$$U\% = \frac{(\text{Massa Cadinho Material Estabilizado} - \text{Massa Cadinho Material Seco em Estufa}) \cdot 100}{\text{Massa Cadinho Estabilizado} - \text{Massa Cadinho}}$$

4.3.2 Determinação do Teor de Cinzas Totais

Utilizando o material processado no ensaio de Determinação da Perda por Dessecação, em seguida foi realizada a Determinação do Teor de Cinzas Totais de acordo com a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010). Os cadinhos (sextuplicata) recém-pesados na etapa final da Determinação do Teor de Umidade foram inseridos em mufla, com aumento de temperatura gradativo até $600\pm 25^\circ\text{C}$, até que todo o material se tornasse cinzas. Os cadinhos foram colocados em dessecador para resfriamento (livres de variação de peso por absorção de umidade do ar), para então proceder-se à pesagem. O Teor de Cinzas Totais foi calculado em relação ao material estabilizado, de acordo com a equação:

$$\text{Cinzas}\% = \frac{(\text{Massa Cadinho Cinzas} - \text{Massa Cadinho}) \cdot 100}{\text{Massa Cadinho Material Estabilizado}}$$

4.3.3 Determinação da Densidade Aparente

A determinação da densidade aparente do material foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010). A partir do material estabilizado e triturado, foi determinada a densidade aparente das folhas e cascas em sextuplicata, verificando o volume que o material compactado ocupa em proveta de plástico após um número padronizado de batidas.

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

4.4.1 Obtenção dos Extratos Brutos

Os extratos brutos etanólicos das folhas e cascas secas e estabilizadas foram obtidos em aparelho de Soxhlet com etanol (95° GL) ao longo de oito horas. Os

extratos brutos aquosos de folhas e cascas secas e estabilizadas foram obtidos a 20% (p/v) em Banho-maria (70°C) ao longo de uma hora (1 h). Os resíduos foram filtrados e lavados com água quente (70° C). Os extratos aquosos foram utilizados somente na realização do Ensaio Sistemático Fitoquímico, imediatamente após a obtenção, a fim de evitar proliferação microbológica e possível degradação dos extratos.

4.4.2 Reserva de Extrato Bruto Etanólico

Para atender aos objetivos do presente trabalho, foi necessária a disponibilidade de extratos brutos etanólicos filtrados, extratos brutos etanólicos concentrados e suas frações em escala de polaridade, para diferentes aplicações.

A partir dos extratos brutos etanólicos filtrados das folhas e cascas, foi realizada parte do Ensaio Sistemático Fitoquímico (verificar item 4.5) assim como o Ensaio de Teor de Sólidos. Após a realização destes, para contemplar os bioensaios propostos, foi necessária a obtenção de frações dos extratos brutos, reservando previamente o equivalente a 5 g destes extratos (peso dos extratos evaporado). Para tanto, uma alíquota (cerca de cinco gramas) de cada extrato bruto etanólico foi reservada. A partir da Determinação de Teor de Sólidos (4.4.3), foi determinado o volume (mL) dos extratos brutos necessários para contemplar a quantidade pré-estabelecida de cinco gramas (5 g).

As amostras de extratos brutos que não foram consumidas no Ensaio Sistemático Fitoquímico, Ensaio de Teor de Sólidos ou reservadas para avaliação direta nos bioensaios foram concentradas em rotaevaporador, recuperando o etanol, para então proceder-se ao fracionamento com solventes em escala de polaridade crescente.

4.4.3 Determinação do Teor de Sólidos

A partir da Determinação do Teor de Sólidos Totais, foi possível determinar o rendimento dos extratos e frações, uma vez que o volume de extratos obtidos é conhecido, assim como a quantidade (g) de material botânico seco utilizado. Essa

informação nos permite rastrear a quantidade de material botânico seco e estabilizado que provoca os efeitos observados nos organismos a partir das concentrações de extratos e frações estabelecidas. Essa relação estabelece um padrão interessante, pois é possível extrapolar os efeitos biológicos além da solução do extrato em si, já que se pode determinar quanto de planta há na concentração escolhida para teste, facilitando a determinação de dose em alguns casos de toxicidade, como a intoxicação do gado bovino.

Utilizando placas de Petri, foi determinado o Teor de Sólidos de alíquotas de extratos brutos etanólicos, assim como dos extratos brutos aquosos, todas em triplicata. As alíquotas foram levadas a secagem total em estufa a 60° C e o Teor de Sólidos foi determinado pela diferença de massa entre a placa vazia e placa com extrato seco, após resfriamento em dessecador. Com esta informação, tem-se a possibilidade de correlacionar volume de extrato bruto com peso de extrato bruto seco, uma vez que o resultado expresso é dado em g/mL, contemplando o item 4.4.2.

4.4.4 Obtenção das Frações dos Extratos Brutos

O fracionamento dos extratos brutos em escala de polaridade é realizado para auxiliar a identificação das possíveis classes de metabólitos com atividades nos bioensaios, justamente por segmentar as classes reunidas em um só extrato em quatro frações distintas. Além de facilitar a identificação, a possibilidade de isolamento destes metabólitos interessantes é muito maior desta forma, se comparada às tentativas baseadas apenas no extrato bruto. Os extratos brutos não são fracionados em totalidade, pois é importante avaliá-los íntegros nos ensaios biológicos, uma vez que as classes metabólicas reunidas podem apresentar efeitos distintos às classes isoladas, através de mecanismos de sinergismo ou antagonismo.

Após a realização do Ensaio Sistemático Fitoquímico e reservada a alíquota de extratos brutos etanólicos necessária aos procedimentos de bioensaios, o restante dos extratos brutos foi fracionado por extração líquido-líquido em aparelho de Soxhlet modificado, em etapas sequenciais com hexano, clorofórmio e acetato de etila (em escala crescente de polaridade). O produto remanescente da última etapa

de fracionamento desta cascata será denominado como fração hidroalcoólica ou remanescente. Por fim, foram obtidas oito frações (quatro de folhas e quatro de cascas: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e remanescente) correspondendo a quatro polaridades. Estas frações serão avaliadas nos bioensaios juntamente com os próprios extratos brutos. O diagrama de obtenção e fracionamento dos extratos está detalhado na Figura 6.

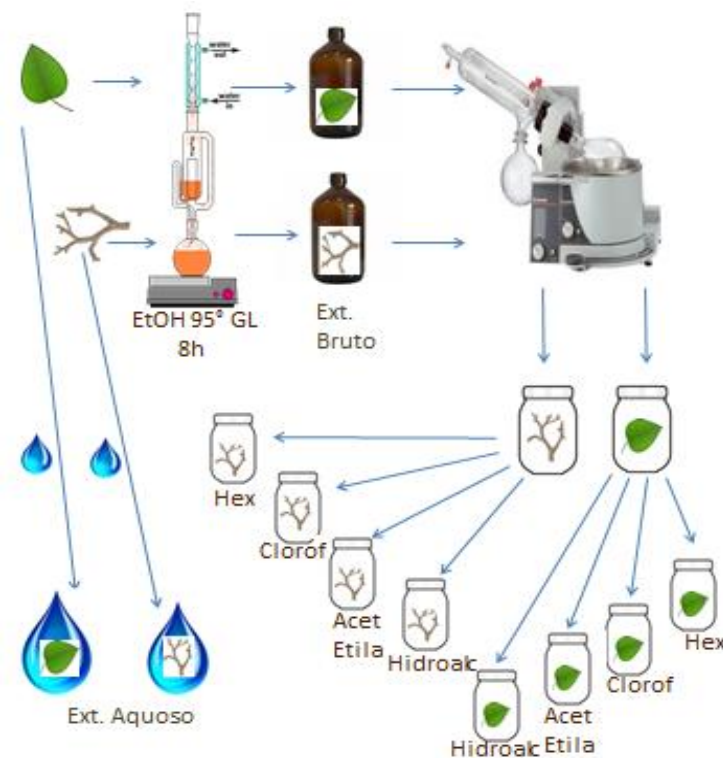


Figura 6 – Esquema de obtenção de extratos brutos e frações e extrato aquoso
 Fonte: A autora (2013).

4.5 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO

A análise fitoquímica preliminar é realizada para obter informações qualitativas acerca dos principais grupos de metabólitos que se encontram presentes na amostra. Utilizando o método apresentado por Moreira (1979) adaptado por Miguel (2003), foi realizada a avaliação fitoquímica preliminar dos extratos de cascas e folhas de *C. intermedium*, buscando verificar as classes de metabólitos solúveis em etanol e em água, utilizando então os extratos brutos e os aquosos, em diferentes momentos.

O Ensaio Sistemático Fitoquímico utiliza diversas reações específicas que indicam qualitativamente a presença de determinados metabólitos, seja por mudança de coloração, precipitação, formação de gás ou fluorescência, às vezes utilizando mais de um método. A metodologia detalhada é extensa e rebuscada, sendo suprimida deste trabalho. Os testes realizados estão indicados nos resultados.

4.6 BIOENSAIOS

4.6.1 Avaliação da toxicidade aguda em *Artemia salina*

Para a avaliação de toxicidade aguda no microcrustáceo de água salina *Artemia salina* foi utilizado o método descrito por Meyer et al. (1982) com adaptações de Petrobrás (1996). A partir desse método é possível determinar a CE_{50} em $\mu\text{g/mL}$ de compostos ativos e extratos no meio. Solução salina de sal marinho artificial em água destilada (30 g/L) foi utilizada como meio de eclosão e cultivo dos microcrustáceos, como controle negativo e como solvente para o controle positivo e para as amostras. O pH foi controlado para viabilizar a sobrevivência dos náuplios, uma vez que valores de pH superiores a 6,0 são ideais para o desenvolvimento de *Artemia salina*, não devendo ultrapassar pH 10,5.

Cistos de alta eclosão de *Artemia salina* adquiridos em loja de pet shop foram colocados em funil de separação (cerca de 200 mg cistos/L) com solução salina por 24 horas para eclodirem, sob aeração contínua, ausência de luz (viabilizada por papel alumínio ao redor do funil), controle de temperatura (27-30° C) e pH (8-9). Ao fim das 24 horas, o papel alumínio foi aberto na parte inferior, próximo à torneira e foi posicionada iluminação artificial (lâmpada fria). Devido ao fototropismo dos náuplios, a coleta foi facilitada com o uso da torneira do funil. Os cistos não eclodidos foram descartados e o funil foi reabastecido com nova salina e os náuplios reinseridos, novamente sob aeração e ausência de luz por mais 24 horas. Ao fim deste período, os náuplios foram coletados e em seguida inseridos nos meios-teste e controles.

As soluções de extratos brutos e frações de folhas e cascas foram testadas nas concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de solução salina, em

quadruplicata, acondicionadas em placas-teste de cultura celular de 24 poços (marca Prolab). Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% em salina, para viabilizar a solubilização e garantir da concentração efetiva das amostras. Portanto, além do controle negativo (salina livre de DMSO), os náuplios também foram avaliados com o solvente (DMSO 1% em salina), a fim de comprovar ausência de toxicidade nos náuplios. Como controle positivo foi utilizado dodecilsulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de solução salina. Todos os controles também foram realizados em quadruplicata.

Em cada poço foram colocados 10 náuplios e, em seguida, cerca de 2,5 mL de amostra-teste. As placas foram incubadas em estufa (27-30° C) ao longo de 24 horas e o número de imóveis por poço foi contabilizado com auxílio de iluminação artificial e lupa. As placas foram incubadas e novamente avaliadas após outras 24 horas, contemplando exposição dos organismos em 24 e 48 horas. Os resultados foram analisados pelo método estatístico Probitos e os valores de CE₅₀ com 95% de intervalos de confiança foram determinados. Foram consideradas amostras ativas as que CE₅₀ forem menores que 1000 ppm (1000 µg/mL).

4.6.2 Avaliação da toxicidade aguda em *Aedes aegypti*

A atividade larvicida dos extratos brutos e frações de *Cestrum intermedium* em *Aedes aegypti* foi verificada segundo a metodologia do World Health Organization (WHO) (1981a) com modificações. Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller (utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticida para a espécie *Aedes aegypti*) foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz – RJ. Para a eclosão dos ovos, foram adicionados 500 mL de água mineral em Becker de plástico e levados à estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) em temperatura de 27 ± 2 °C e umidade relativa de 80 ± 5%.

A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (Aldon Basic, MEP 200 Complex) do período de eclosão até o 3° estágio larval (aproximadamente dois dias). Foram testadas as soluções de concentração de 10, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL dos extratos e frações de folhas e cascas, solubilizando as amostras com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em água mineral. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando 10 organismos por replicata. Como controle negativo foi utilizada

a solução DMSO 0,5% em água mineral e o inseticida utilizado como controle positivo foi o Temefós (organofosforado) grau técnico 90% lote 005/2011 (marca Fersol Mairinque), em concentração 0,060 mg/mL (o dobro concentração letal que causa imobilidade de 99% de uma cepa susceptível), como definido pela WHO (1981 a,b).

A atividade larvicida foi avaliada após 24 e 48 horas por meio da contagem do número de larvas imóveis em cada amostra. Os valores da concentração efetiva (CE_{50}) em $\mu\text{g/mL}$ foram determinados utilizando o método de análise Probitos com 95% de intervalos de confiança.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

O teor de umidade máximo para vegetais estabilizados determinado por diversas farmacopeias varia entre 8 e 14%, com pouquíssimas exceções. Esse intervalo garante o controle da ação de enzimas que acarretariam a degradação de constituintes químicos, degradação por hidrólise e desenvolvimento microbiano. A determinação do teor de cinzas determina substâncias inorgânicas não-voláteis (minerais) e pode servir, assim como o teor de umidade e densidade aparente, como parâmetro de controle de qualidade, evitando falsificações ou adulterações (FARIAS, 2010). Estes parâmetros são intrínsecos a cada espécie e podem ser considerados como identidade da planta, sendo que foram determinados para *Cestrum intermedium* pela primeira vez.

5.1.1 Determinação do teor de umidade e cinzas das folhas e cascas

A partir da metodologia descrita nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3, foram obtidos os resultados de folhas e cascas para Teor de Umidade (%), Teor de Cinzas Totais (%) e Densidade Aparente (g/mL), apresentados na Tabela 1 e 2, para cada uma das seis replicatas, evidenciando seus valores médios. Os resultados médios (U% = 8,756, Cinzas% = 0,86 e Densidade Aparente = 0,2540 g/mL para folha e U% = 3,303, Cinzas% = 0,466, Densidade Aparente = 0,2710 g/mL) são coerentes, pois se enquadram em valores preconizados por farmacopeias de vários países.

Tabela 1: Teor de umidade, cinzas e densidade aparente de folhas de *C. intermedium*

Nº amostra	U%	Cinzas%	Densidade Aparente (g/mL)
1	8,665	0,876	0,2434
2	8,823	0,877	0,2478
3	8,749	0,855	0,2588
4	8,772	0,851	0,2488
5	8,690	0,858	0,2686
6	8,840	0,850	0,2567
média	8,756±0,07	0,86±0,01	0,2540±0,009

Tabela 2: Teor de umidade, cinzas e densidade aparente de cascas de *C. intermedium*

Nº amostra	U%	Cinzas%	Densidade Aparente
1	3,387	0,468	0,2477
2	3,449	0,477	0,2902
3	3,228	0,474	0,2610
4	3,110	0,443	0,2632
5	3,387	0,454	0,2814
6	3,259	0,479	0,2828
média	3,303±0,13	0,466±0,01	0,2710±0,016

5.1.2 Determinação do teor de sólidos das folhas e cascas

Assim como umidade, cinzas e densidade aparente, o teor de sólidos das folhas e cascas pode servir como parâmetro de controle de qualidade dos extratos. Não há padrão estabelecido para valores aceitáveis de teor de sólidos de extratos de *Cestrum intermedium*, pois também é uma determinação inédita para a espécie. A partir da metodologia descrita em 4.4.3, foram obtidos os seguintes resultados de Teor de Sólidos Totais para os extratos etanólicos e aquosos das folhas e cascas, apresentados na Tabela 3: 0,0080 g/mL para extrato etanólico de folhas, 0,0209 g/mL para o extrato aquoso de folhas, 0,0499 g/mL para extrato etanólico de cascas e 0,0133 g/mL para o extrato aquoso de cascas.

Tabela 3: Teor de sólidos do extrato etanólico bruto e aquoso de *C. intermedium*

Amostra	Teor de Sólidos (g/mL)	
	Ext. Etanólico	Ext. Aquoso
Folhas	0,0080±0,06	0,0209±0,05
Cascas	0,0499±0,13	0,0133±0,11

5.2 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO

O ensaio sistemático fitoquímico delinea o perfil químico dos extratos, direciona o estudo e auxilia a prever possíveis atividades, identificando grupos ou classes de metabólitos solúveis em etanol e solúveis em água que possam estar

presentes no material botânico. Portanto, para determinadas pesquisas de grupos, faz-se necessária a obtenção de extrato aquoso das folhas e cascas, sendo este o único momento em que serão utilizados. Os metabólitos solúveis em álcool (utilizando os extratos brutos etanólicos) investigados foram alcaloides, flavonoides, cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, esteroides e triterpenos. Nos extratos aquosos recém obtidos foi investigada a presença de heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogênicos e taninos.

Os resultados são informações qualitativas acerca dos principais grupos de metabólitos, utilizados como roteiro para o isolamento de substâncias, sendo eles: alcaloides, heterosídeos flavônicos, flavonóis, heterosídeos saponínicos (presentes em folhas e cascas), cumarinas, esteroides e triterpenos (presentes somente nas cascas), que evidenciam quais reagentes e reações foram escolhidas para realizar cada pesquisa, buscando metabólitos solúveis em etanol (Tabela 4) e em água (Tabela 5).

Tabela 4: Análise sistemática fitoquímica do extrato etanólico das folhas e cascas de *C. intermedium*

ANÁLISES		FOLHAS	CASCAS
Alcaloides	Meyer	+	+
	Dragendorff	+	+
	Bouchardat	+	+
	Bertrand	+	+
Flavonoides	Leucoantocianidinas	-	-
	Heterosídeos flavônicos	+	+
	Flavonóis	+	+
	Dihidroflavonóis	-	-
Cumarinas	-	-	+
Heterosídeos antraquinônicos	-	-	-
Esteroides/Triterpenos	R.de Liberman - Bouchard	-	-
	R. de Keller - Kelliani	-	+

Tabela 5: Análise sistemática fitoquímica do extrato aquoso das folhas e cascas de *C. intermedium*

ANÁLISES		FOLHAS	CASCAS
Heterosídeos Antociânicos	pH 4	-	-
	pH 7	-	-
	pH 10	-	-
	antocianidina	-	-
Heterosídeos saponínicos		+	+
Heterosídeos cianogênicos		-	-
Taninos	Cloreto férrico	-	-
	Sulfato amoniacal	-	-
	Cloridrato de emetina	-	-
	Ácido acético e acetato de chumbo	-	-
	Dicromato de potássio	-	-
	Hidrolisáveis	-	-
	condensados	-	-

5.3 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM *Artemia salina*

Como demonstrado em Petrobrás (1996), a CE_{50} do SDS está em torno de 13 $\mu\text{g/mL}$, o que foi verificado nos resultados obtidos: $CE_{50 \text{ SDS } 24\text{h}} = 13,88 \mu\text{g/mL}$ e $CE_{50 \text{ SDS } 48\text{h}} = 13,57 \mu\text{g/mL}$. Esta constatação demonstra que os náuplios estão com a sensibilidade padronizada, evitando resultados falsamente exacerbados ou atenuados. Os controles negativos (salina e DMSO 1% em salina) foram inseridos no método estatístico, compilando os dados tratados. Os resultados para toxicidade aguda em *Artemia salina* servem como parâmetro para a espécie, uma vez que ensaios ecotoxicológicos nunca haviam sido realizados para se estabelecer comparações.

Em Khatun et al. (2014), extratos de *Cestrum diurnum* foram avaliados em *Artemia salina*, apresentando $CE_{50} = 0,074 \mu\text{g/mL}$ em apenas duas horas de ensaio, sendo a toxicidade atribuída pelos autores aos alcaloides, esteroides e taninos presentes. Apesar de não reproduzir as condições (período de análise) do teste apresentado neste trabalho, os resultados de Khatun et al. (2014) mostraram-se mais significativos em relação aos obtidos com *Cestrum intermedium*, uma vez que em curto período de tempo apresentaram CE_{50} muito inferiores.

Em *Cestrum intermedium* a atividade tóxica ocorreu nas frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente das folhas e cascas, sendo que os resultados mais expressivos foram em acetato de etila cascas. Esta fração foi a mais tóxica para *Artemia salina*, com $CE_{50} = 68,38 \mu\text{g/mL}$ (em 48 horas de ensaio), cerca de cinco vezes menos tóxica que o controle positivo utilizado (SDS).

Baseando-se em Meyer et al. (1982), podemos considerar tóxicas amostras que demonstravam $CE_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Porém, em Amarante et al. (2011), foi estabelecida uma nova relação entre o grau de toxicidade e CE_{50} :

- baixa toxicidade: $CE_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$
- moderada toxicidade: $100 \mu\text{g/mL} < CE_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$
- alta toxicidade: $100 \mu\text{g/mL} > CE_{50}$

Portanto, os extratos brutos e as frações hexânicas de folhas e cascas são consideradas inativas, frações clorofórmicas e remanescentes das folhas e cascas são consideradas amostras de baixa toxicidade, a fração acetato de etila folhas é considerada de moderada toxicidade e a fração acetato de etila cascas é considerada de alta toxicidade. Os resultados do teste de toxicidade em *Artemia salina* estão na Tabela 6.

Há possibilidade de heterosídeos saponínicos, possivelmente presentes entre as frações acetato de etila e remanescente, serem os responsáveis pela atividade tóxica observada. Possivelmente, tratam-se de saponinas tóxicas, porém, há chances de as saponinas interferirem na solubilidade de oxigênio do meio e prejudicar o desenvolvimento dos náuplios por anoxia.

Tabela 6: Toxicidade dos extratos brutos e frações em *Artemia salina*

AMOSTRA	CE ₅₀ (µg/mL)		INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Ext. Bruto Folhas	> 1000	> 1000	-	-
Hexânica Folhas	> 1000	> 1000	-	-
Clorof. Folhas	801,07	715,32	715,32-897,09	676,26-756,64
Acet. Etila Folhas	508,05	355,76	440,26-586,27	291,32-434,44
Remanscente Folh.	> 1000	884,87	-	715,49-1094,33
Ext. Bruto Cascas	> 1000	> 1000	-	-
Hexânica Cascas	> 1000	> 1000	-	-

continua

continuação				
AMOSTRA	CE ₅₀ (µg/mL)		INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Clorof. Cascas	770,01	626,24	716,88-827,08	555,05-707,45
Acet. Etila Cascas	116,48	068,38	95,40-142,21	51,96-90,00
Remanescente Cas.	> 1000	818,20	-	696,95-960,54
SDS	13,88	13,57	-	-

5.4 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM *Aedes aegypti*

Em Jawale et al. (2010), foi avaliada a espécie *Cestrum nocturnum*, onde foram verificadas atividades interessantes, o que não se observa de maneira tão marcante com o ensaio realizado em *Cestrum intermedium*. Não houve nenhuma atividade expressiva nas concentrações testadas nestes organismos-teste, sendo os resultados representados na Tabela 8. A única fração que apresentou toxicidade foi a hexânica de cascas, com atividade tóxica moderada (CE₅₀= 521,23 µg/mL), possivelmente pela presença de triterpenos com potencial tóxico. Porém, em Jawale et al. (2010) a fração hexânica não apresentou toxicidade. Os resultados agregam informações ao perfil ecotoxicológico de *Cestrum intermedium*, demonstrando não repetir os resultados de *Artemia salina*, e denotam, de maneira geral, que os extratos da espécie não apresentam grande potencial para controle do vetor da dengue. Porém, seria de interesse isolar e identificar a substância presente na fração hexânica responsável pela baixa toxicidade demonstrada e avaliá-la em larvas de *Aedes aegypti* isoladamente.

Tabela 7: Toxicidade dos extratos brutos e frações em *Aedes aegypti*

AMOSTRA	CE ₅₀ (µg/mL)		INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
EBF	> 1000	> 1000	-	-
HF	> 1000	> 1000	-	-
CF	> 1000	> 1000	-	-
AEF	> 1000	> 1000	-	-
RF	> 1000	> 1000	-	-

continua

continuação				
AMOSTRA	CE ₅₀ (µg/mL)		INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	
	24 h	24 h	24 h	48h
EBC	> 1000	> 1000	-	-
HC	> 1000	521,23	-	225,67-1203,87
CC	> 1000	> 1000	-	-
AEC	> 1000	> 1000	-	-
RC	> 1000	> 1000	-	-
Temefós	30	30	-	-

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos com a realização inédita do Ensaio Sistemático Fitoquímico em *Cestrum intermedium*, foi possível delinear quais classes de metabólitos podem ser as responsáveis pelo quadro toxicológico em bovinos que ingerem folhas de *Cestrum intermedium*. Há possibilidade de que a ação tóxica ocorra pela presença de alcaloides e/ou heterosídeos saponínicos, ambas classes com exemplares conhecidamente tóxicos e presentes na família e no gênero, respectivamente. Os alcaloides podem ser encontrados nas frações clorofórmicas e remanescentes, além de encontrados no próprio extrato bruto. Os heterosídeos saponínicos, como foram determinados a partir do extrato aquoso, estariam presentes nas frações mais polares, como acetato de etila e remanescente e também no extrato bruto. Assim, os resultados expressos no bioensaio com *Artemia salina* podem ser explicados com esta premissa, uma vez que atividade tóxica foi detectada nas frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente.

Diferentemente dos resultados obtidos em Jawale et al. (2010), em que *Cestrum diurnum* obteve resultados larvicidas satisfatórios, porém sem atividade na fração hexânica (em que *Cestrum intermedium* foi positiva), os resultados em *Cestrum intermedium* não demonstram que haja grande potencial para utilizá-la como possível controle de *Aedes aegypti*, porém substâncias isoladas da fração hexânica podem oferecer toxicidade mais representativa.

Seria de interesse dar continuidade aos ensaios ecotoxicológicos preliminares e incluir novos métodos, tais como toxicidade aguda em zebrafish e outros mosquitos, vetores ou não, verificação do potencial alelopático, avaliando a necessidade em realizar ensaios ecotoxicológicos mais aprofundados. É aconselhado realizar isolamento e identificação de compostos, procedendo com fracionamento das frações dos extratos com auxílio de cromatografia, verificando compostos ou misturas isoladas e identificando em espectro de RMN ^1H (ressonância magnética nuclear de hidrogênio). Utilizar espectros de RMN ^{14}C (ressonância magnética nuclear de carbono) quando possível, uma vez que há probabilidade de a concentração do composto ser tão ínfima na alíquota selecionada que não haja a possibilidade de gerar um espectro avaliável. Uma vez identificadas

e isoladas substâncias de interesse, se em quantidade razoável, devem ser submetidos aos mesmos ensaios ecotoxicológicos aqui propostos.

Os resultados dos bioensaios estruturados oferecem informações úteis quanto aos extratos e possíveis substâncias a serem isoladas destes, podendo ser empregadas com atividade ambiental significativa, por serem tóxicas para determinadas espécies ou justamente por serem livres de toxicidade. O perfil ecotoxicológico preliminar de *Cestrum intermedium*, a partir deste trabalho, já tem suas bases fundamentadas.

REFERÊNCIAS

ANVISA, **FB 5 – Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. v. 1. Brasília, 2010.

AMARANTE, Cristine Bastos et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardialinifera*). **Acta Amazonica**, vol. 41(3): 431 – 434, 2011.

Arctos, Taxonomy results. Disponível em: <<http://arctos.database.museum/TaxonomyResults.cfm>>. Acesso em: 31/07/2013.

BANDARRA, Paulo M. et al. Intoxicação natural por *Cestrum intermedium* em bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. Vol 39, nº 1. Santa Maria, 2009.

BRASIL, **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 20/08/2014.

BRAZ FILHO, Raimundo. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química nova**. Vol 33, nº 1. 2010.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: University Press, 1981.

COUTINHO, Luiz Teles. et al. Intoxicação natural de bovinos leiteiros por *Cestrum laevigatum* (SOLANACEAE) no agreste de Pernambuco – Brasil. *Ciênc. anim. bras.*, Goiânia, v.14, n.3, p. 352-359, jul./set. 2013

FARIAS, Marení R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 12, Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2002.

FENICOLA, N. G. G. de, BOHRER-MOREL, M. B. C. e BAYNE, A. C. D. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. Capítulo 7. Editora RIMA, 1ª edição. São Carlos, 2004.

FURLAN, Fernando. H. et al. **Intoxicação por *Cestrum intermedium* (Solanaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina**. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(3): 281-284, 2008.

GALLEGO, D. C. ***Cestrum* de Colombia (Solanaceae): estudio taxonómico de las especies de tricomas simples**. 67f. (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Nacional da Colômbia. Bogotá, 2011.

GHISALBERTI, E. L. Detection and isolation of Bioactive Natural Products. In COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products. Determination, Isolation, and structural determination**. CRC Press, NW, 2 ed., 2008, p. 13-15.

GUARANTINI, T. **Fundamentos de Toxicologia**. Capítulo 2.1, Toxicologia Ambiental. Editora Atheneu, 3ª edição. São Paulo, 2004.

HEMINGWAY J. e RANSON H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review Entomology**. 45: 371-391, 2000.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A. e MORENO, P. R. H. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 29, Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. Editora UFSC e UFRGS, 4ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2002.

JAWALE, Chetan et al. Larvicidal activity of *Cestrum nocturnum* on *Aedes aegypti*. **Bangladesh J. Pharmacol**, 5:39-40, 2010.

JOLY, Aylthon B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. Companhia Editora Nacional, 7ª edição. São Paulo, 1985.

KHATUN, Amina et al. cytotoxic and thrombolytic activity of the aerial part of *Cestrum diurnum* L. (Solanaceae). **Pharmacologyonline**. Vol. 1. p. 109-113, 2014.

KINGSBURY, J. M. **Toxic plants**. Capítulo 1, The problem of poisonous plants. Columbia University press. New York, 1979.

KISSMANN, Kurt G. e GROTH, Doris. **Plantas infestantes e nocivas**. Editora BASF, 2ª edição. 2000.

KNIE, Joachim. L. W. e LOPES, Ester. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Editora FATMA, 1ª edição. Florianópolis, 2004.

KOZERA, Carina et al. **Composição florística da floresta ombrófila mista montana do parque municipal do Barigüi, Curitiba, PR**. Disponível em: <<http://www.florestaombrofilamista.com.br/sidol/downloads/16.pdf>>. Acesso em: 24/05/2013.

LORENZI, H. e MATOS, F. J. Abreu. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2ª edição. São Paulo, 2008.

LORENZI, Harri e SOUZA, Hermes M. de. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 4ª edição. São Paulo, 2008.

MEYER, B.N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica** 1982; 45:31-34.

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

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

PASTORE, Giseli. et al. Usos populares de espécies de *Lauraceae*, *Rosaceae*, *Curcubitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Chenopodiaceae*, *Malvaceae*, *Pedaliaceae*. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**. Vol 6, 2002.

PERSOONE, G. e WELLS, P. G. **Artemia in aquatic toxicology: a review**. Universa Press, Volume 1. Belgium, 1987.

PETROBRAS. Normas técnicas. Norma técnica N-2588. Determinação da toxicidade aguda de agentes tóxicos em relação à *Artemia sp.* 1996.

REFLORA, Lista de espécies da flora do Brasil. *Cestrum intermedium* Sendtn. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do>>. Acesso em: 23/06/2013.

RIET-CORREA, F., MÉNDEZ, M. D. C. e SCHILD, A. L. **Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos**. Editorial agropecuária hemisferio sur S.R.L. Montevideo, 1993.

SCHENKEL, E. P. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 35, Plantas tóxicas. Editora UFSC e UFRGS, 4ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2002.

SCHVATSMAN, S. **Fundamentos de Toxicologia**. Capítulo 2.3, Domissanitários e Plantas Ornamentais. Editora Atheneu, 3ª edição. São Paulo, 2004.

SILVA, H.H.G. et al. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil.(Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37(5): 396-399, 2004.

SILVA, K. N. e AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol 15, nº 4. 2005.

SIQUEIRA, João Máximo et al. Estudo fitoquímico de *unonopsis lindmanii* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *artemia salina* leach. **Química Nova**, 21(5), 1998

SOARES, Edson L. de C. et al. **O gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil.** 2007. Disponível em: <<http://www.anchietano.unisinos.br/publicacoes/botanica/botanica58/artigo10.pdf>>. Acesso em: 23/05/2013.

SOARES, Edson L. de C. **Estudos taxonômicos em Solanaceae lenhosas no Rio Grande do Sul, Brasil.** 230f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

SOUZA, Sérgio A. M. **Biotestes na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul.** Monografia (Universidade Federal de Pelotas). Pelotas, 2005.

STEHMANN, J.R.; Mentz, L.A.; Agra, M.F.; Vignoli-Silva, M.; Giacomini, L.; Rodrigues, I.M.C. Solanaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14644>>. Acesso em: 31 Jul. 2014

VAZ, Nelissa. P. **Alcaloides Esteroidais dos Frutos Maduros de *Solanum caavurana* Vell.** 101f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

VENDRUSCOLO, Giovana. V. **Diversidade e distribuição de Solanaceae em formações vegetais altomontanas no sul do Brasil.** 165f. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

WHO. 1981a. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.** Geneva.

WHO. 1981b. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides.** Geneva.

WOUTERS, Angélica T.B. et al. Intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos no Sudoeste do Estado do Paraná. **Pesq. Vet. Bras.** 33(1):47-51, 2013.

ZAGATTO, Pedro. A. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** Capítulo 1: ecotoxicologia. Editora Rima, 2^a edição. São Carlos, 2008.