

## Concentrações de oleandrina nas folhas de *Nerium oleander* de diferentes cores da floração

### Oleandrin concentrations in leaves of *Nerium oleander* of different colors of flowering

Heloisa de Paula Pedroza<sup>I</sup> Marina Guimarães Ferreira<sup>II</sup> Júlia Gomes de Carvalho<sup>I</sup>  
Karla Dias Antunes Melo<sup>I</sup> Kelly Moura Keller<sup>III</sup> Marília Martins Melo<sup>II</sup> Benito Soto-Blanco<sup>II\*</sup>

– NOTA –

#### RESUMO

*Nerium oleander* é uma planta ornamental responsável por intoxicações em animais e humanos. Todas as partes da planta contém glicosídeos cardiotoxicos, principalmente a oleandrina. Alguns autores apontam que a toxicidade da planta apresentaria variação em função da cor da flor. O objetivo deste trabalho foi determinar se existe variação na concentração de oleandrina nas folhas de *N. oleander* de exemplares da planta com diferentes cores de inflorescências. Foram coletadas 10 amostras de folhas para cada tipo de flor (branca, rosea e vermelha). Os níveis de oleandrina foram determinados por meio de HPLC-UV após extração com metanol, precipitação com acetato de chumbo e separação em cartucho de C18. A média da concentração obtida em todas as folhas analisadas foi de 4,89mg g<sup>-1</sup>, sendo 6,20±4,08mg g<sup>-1</sup> na variedade de flores brancas, 4,16±3,44mg g<sup>-1</sup> na de flores roseas e 4,31±1,99mg g<sup>-1</sup> na de flores vermelhas. As concentrações de oleandrina não apresentaram diferença estatisticamente significante entre as variedades de flores.

**Palavras-chave:** *Apocynaceae*, plantas tóxicas, cardiotoxicidade, glicosídeos cardíacos, cardenolídeos.

#### ABSTRACT

*Nerium oleander* is an ornamental plant responsible for poisoning in animals and humans. All parts of the plant contain cardiotoxic glycosides, mainly oleandrin. Some authors suggest that the toxicity of the plant would present a dependence on flower color. The objective of this study was to determine whether there is variation in the concentration of oleandrin in the leaves of *N. oleander* specimens of different colors of flowers. Ten samples of leaves from each variety of flower (white, pink and red) were collected. Oleandrin levels were determined by HPLC-UV after extraction with methanol, precipitation with lead acetate and separation with C18 cartridge. The average concentration

obtained in all analyzed leaves was 4.89mg g<sup>-1</sup>, being 6.20±4.08mg g<sup>-1</sup> in variety of white flowers, 4.16±3.44mg g<sup>-1</sup> in pink flowers, and 4.31±1.99mg g<sup>-1</sup> in red flowers. The concentrations of oleandrin did not show statistically significant difference between the varieties of flowers.

**Key words:** *Apocynaceae*, poisonous plants, cardiotoxicity, cardiac glycosides, cardenolides.

*Nerium oleander* é uma planta ornamental da família Apocynaceae, popularmente conhecida como “espírradeira”, sendo cultivada por apresentar flores nas cores: brancas, vermelhas e rosa. Intoxicações espontâneas por essa planta já foram descritas em bovinos (SOTO-BLANCO et al., 2006; PEDROSO et al., 2009), equinos (RENIER et al., 2013), asinino (GERALDO NETO et al., 2013), ovinos e caprinos, lhamas, alpaca (KOZIKOWSKI et al., 2009), cães, gatos (CALONI et al., 2012), gansos (ALFONSO et al., 1994), preguiças (MILLER, 1973, 1976), cobaia (EWRINGMANN et al., 1999) e urso (RATIGAN, 1921-2). A intoxicação também ocorre em humanos, tanto pela ingestão das folhas como de forma indireta, pelo consumo de carne assada em galhos usados como espetos (HUGUES et al., 2012) ou de escargots que ingeriram a planta (GECHTMAN et al., 2006).

Todas as partes da planta contém cardenolídeos ou glicosídeos cardiotoxicos, principalmente a oleandrina. Os cardenolídeos

<sup>I</sup>Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>II</sup>Laboratório de Toxicologia, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, UFMG, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, 31275-013, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: benito.blanco@pq.cnpq.br. \*Autor para correspondência.

<sup>III</sup>Laboratório de Micologia e Micotoxinas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

inibem a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase da membrana dos cardiomiócitos, promovendo depleção do potássio intracelular e aumento do sódio intracelular, o que leva a acúmulo de cálcio. Estes distúrbios eletrolíticos afetam a condutividade e contratilidade do coração (SOTO-BLANCO et al., 2006). Além da importância toxicológica, a oleandrina também tem importância farmacológica, pois possui atividade anti-neoplásica (KUMAR et al., 2013) e potencial anti-HIV (SINGH et al., 2013).

Foi estimado que a toxicidade da planta deve variar em função da cor da flor, sendo as variedades de flores vermelhas as mais tóxicas do que as de flores brancas (KARAWYA et al., 1973). No entanto, a determinação foi feita por meio de cromatografia em camada delgada, que é uma técnica sem muita precisão para quantificação de compostos (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

O objetivo deste trabalho foi determinar se existe variação na concentração de oleandrina nas folhas de *N. oleander* de exemplares da planta com diferentes cores de inflorescências.

Foram coletadas 10 amostras de folhas de cada variedade de flor (branca, rosa e vermelha), oriundas do município de Belo Horizonte, MG. A metodologia analítica foi adaptada de WIEGREBE & WICHTL (1993). As folhas foram secas em estufa a 40°C, por 48 horas, e em seguida trituradas. Foram misturados 50mg de cada amostra de planta com 12ml de solução de metanol a 70%, e a mistura foi colocada em banho sonificador por 10 minutos e em banho-maria a 70°C por mais 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 2ml de acetado de chumbo a 15% e 2ml de solução de fosfato monossódico a 4% e a mistura foi completada para 16ml com água destilada. Após centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, foram separados 10ml do sobrenadante para aplicação em cartucho de C18 (Spe-ed SPE Cartridges Octadecyl C18/18% 500mg 6ml<sup>-1</sup>, Applied Separations, Allentown, PA, EUA). Os cartuchos foram previamente condicionados (2x2ml de metanol e 2x2ml de água). Após a passagem do sobrenadante, os cartuchos foram lavados com 2ml de água, e a extração dos compostos retidos na resina foi realizada com metanol (2x1ml). A análise cromatográfica da oleandrina foi realizada em sistema HPLC-UV (LC-2000Plus, JASCO, Tóquio, Japão), utilizando acetonitrila:água (50:50) como fase móvel, fluxo de 0,9ml minutos<sup>-1</sup>, e coluna Supleco C18 (15cm x 4.6mm, 5µm). A detecção foi feita a 225nm. O tempo de retenção da oleandrina foi de 4,02 minutos, e não apresentou sobreposição com outros picos. A análise em HPLC utilizada

apresentou limite de detecção de 2,0µg ml<sup>-1</sup> e limite de quantificação de 5,0µg ml<sup>-1</sup>. A técnica apresentou linearidade ( $R^2=0,99$ ) na quantificação entre as concentrações de 5,0 a 250,0µg ml<sup>-1</sup>.

Amédia da concentração obtida em todas as folhas analisadas foi de 4,89mg g<sup>-1</sup>. As concentrações de oleandrina branca, rosa clara e vermelha foram 6,20±4,08mg g<sup>-1</sup>, 4,16±3,44mg g<sup>-1</sup> e 4,31±1,99mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Estas concentrações não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as variedades de diferentes cores.

Diversas metodologias analíticas foram desenvolvidas para a determinação das concentrações de cardenolídeos, incluindo cromatografia em camada delgada (CCD) (KARAWYA et al., 1973), cromatografia planar (TURKMEN et al., 2013), espectrofotometria (SOLICH et al., 1992), cromatografia capilar eletrocínica micelar (TSENG et al., 2003), HPLC com derivatização para detecção por fluorescência (BELSNER & BÜCHELE, 1996), HPLC com detector amperométrico (KELLY et al., 1995), radioensaio após separação por HPLC (PLUM & DALDRUP, 1986) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (NEWMAN et al., 2001). A metodologia empregada de preparo da amostra por separação em fase sólida para posterior determinação por HPLC-UV se mostrou bastante eficaz e sensível, podendo ser empregada em trabalhos futuros.

As concentrações observadas de oleandrina nas folhas (média de 4,89mg g<sup>-1</sup>) são similares às relatadas na literatura (SOTO-BLANCO et al., 2006), e nenhuma das plantas avaliadas pode ser considerada atóxica. Foi relatado anteriormente que as concentrações de cardenolídeos nas folhas de *N. oleander* devem variar em função da cor da flor (KARAWYA et al., 1973). No entanto, os dados do presente estudo revelaram que as concentrações de oleandrina nas folhas não apresentaram variação estatisticamente significativa em função da cor da flor. A diferença entre os resultados dos dois trabalhos deve estar no tipo de metodologia empregada. De fato, KARAWYA et al. (1973) utilizaram a CCD para determinação dos cardenolídeos, mas este tipo de técnica apresenta significativas limitações para a adequada quantificação de compostos (AQUINO NETO & NUNES, 2003). Por outro lado, as técnicas de HPLC oferecem boa resolução para a quantificação dos analitos presentes nas matrizes de interesse analítico (AQUINO NETO & NUNES, 2003). Dessa forma, a técnica analítica utilizada no presente trabalho (HPLC) está muito mais adequada a este tipo de estudo do que a CCD. Assim, não deve haver diferença entre estas variedades na toxicidade das folhas de *N. oleander*.

## REFERÊNCIAS

- ALFONSO, H.A. et al. Intoxication due to *Nerium oleander* in geese. **Veterinary and Human Toxicology**, v.36, p.47, 1994.
- AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.E.S. **Cromatografia - princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 188p.
- BELSNER, K.; BÜCHELE, B. Fluorescence detection of cardenolides in reversed-phase high-performance liquid chromatography after post-column derivatization. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.682, p.95-107, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434796000564>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1016/0378-4347(96)00056-4.
- CALONI, F. et al. Animal poisoning in Italy: 10 years of epidemiological data from the poison control centre of Milan. **Veterinary Record**, v.170, art.415, 2012. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/170/16/415>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1136/vr.100210.
- EWINGMANN, A. et al. Oleandervergiftung bei einem Meerschweinchen. **Kleintierpraxis**, v.44, p.535-541, 1999.
- GECHTMAN, C. et al. Unexpectedly dangerous escargot stew: oleandrin poisoning through the alimentary chain. **Journal of Analytical Toxicology**, v.30, p.683-686, 2006. Disponível em: <<http://jat.oxfordjournals.org/content/30/9/683>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1093/jat/30.9.683.
- GERALDO NETO, S.A. et al. Inquérito epidemiológico sobre plantas tóxicas das mesoregiões Central e Oeste do Rio Grande do Norte. **Ciência Rural**, v.43, p.1281-1287, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013000700022>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1590/S0103-84782013000700022.
- HUGUES, T. et al. Intoxication volontaire au laurier rose; cas clinique et revue de la littérature. **Annales de Cardiologie et d'Angiologie**, v.61, p.128-131, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003392811001132>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1016/j.ancard.2011.07.003.
- KARAWYA, M.S. et al. Estimation of cardenolides in *Nerium oleander*. **Planta Medica**, v.23, p.70-73, 1973. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1099414>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1055/s-0028-1099414.
- KELLY, K.L. et al. Quantitation of digitoxin, digoxin, and their metabolites by high-performance liquid chromatography using pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.711, p.289-295, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196739500525R>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1016/0021-9673(95)00525-R.
- KOZIKOWSKI, T.A. et al. Oleander intoxication in new world camelids: 12 cases (1995-2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.235, p.305-310, 2009. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.235.3.305>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.2460/javma.235.3.305.
- KUMAR, A. et al. Oleandrin: a cardiac glycosides with potent cytotoxicity. **Pharmacognosy Reviews**, v.7, p.131-139, 2013. Disponível em: <<http://www.phcogrev.com/text.asp?2013/7/14/131/120512>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.4103/0973-7847.120512.
- MILLER, R. Oleander poisoning in a two-toed sloth. **Journal of Zoo Animal Medicine**, v.42, n.2, p.14, 1973. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/20094182>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.2307/20094182.
- MILLER, R.M. Oleander poisoning in a sloth. **Journal of Zoo Animal Medicine**, v.74, n.4, p.11, 1976. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/20094381>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.2307/20094381.
- NEWMAN, R.A. et al. Composition and preliminary pharmacology studies with anvirzel™: an extract of *Nerium oleander*. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v.1, p.1-16, 2001. Disponível em: <[http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/J157v01n03\\_01](http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/J157v01n03_01)>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1300/J157v01n03\_01.
- PEDROSO, P.M.O. et al. Intoxicação natural e experimental por *Nerium oleander* (*Apocynaceae*) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.404-408, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000500008>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2009000500008.
- PLUM, J.; DALDRUP, T. Detection of digoxin, digitoxin, their cardioactive metabolites and derivatives by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography-radioimmunoassay. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.377, p.221-231, 1986. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843470080777X>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1016/S0378-4347(00)80777-X.
- RATIGAN, W.J. Oleander poisoning in a bear. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.60, p.96-98, 1921-2.
- RENIER, A.C. et al. Oleander toxicosis in equids: 30 cases (1995-2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.242, p.540-549, 2013. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.242.4.540>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.2460/javma.242.4.540.
- SINGH, S. et al. *Nerium oleander* derived cardiac glycoside oleandrin is a novel inhibitor of HIV infectivity. **Fitoterapia**, v.84, p.32-39, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X12002936>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1016/j.fitote.2012.10.017.
- SOLICH, P. et al. Spectrophotometric determination of cardiac glycosides by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.269, p.199-203, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000326709285403S>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1016/0003-2670(92)85403-S.
- SOTO-BLANCO, B. et al. Acute cattle intoxication from *Nerium oleander* pods. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, p.451-454, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11250-006-4400-x>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1007/s11250-006-4400-x.
- TSENG, H. et al. Simultaneous determination of digoxin and digitoxin by micellar electrokinetic chromatography and application to drug formulations. **Journal of Separation Science**, v.26, p.1693-1697, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.200301573/abstract>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1002/jssc.200301573.
- TURKMEN, Z. et al. An HPTLC method for the determination of oleandrin in *Nerium* plant extracts and its application to forensic toxicology. **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, v.26, p.279-283, 2013. Disponível em: <<http://www.akademai.com/content/xn65826650141589/?genre=article&id=doi%3a10.1556%2fJPC.26.2013.3.13>>. Acesso em: 5 jun. 2014. doi: 10.1556/JPC.26.2013.3.13.
- WIEGREBE, H.; WICHTL, M. High-performance liquid chromatographic determination of cardenolides in Digitalis leaves after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography**, v.630, p.402-407, 1993.