

MARA FONSECA CHIARELLI LEGASPE

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA
INTOXICAÇÃO, ANALGESIA E DA
POTENCIALIZAÇÃO
DO SONO BARBITÚRICO DA PLANTA,
H. transalpinum, EM RATOS E
CAMUNDONGOS MACHOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do grau de Doutor
em Ciências, área de concentração,
Farmacologia.

Piracicaba
1996

L523c

29244/BC

MARA FONSECA CHIARELLI LEGASPE

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA
INTOXICAÇÃO, ANALGESIA E DA
POTENCIALIZAÇÃO
DO SONO BARBITÚRICO DA PLANTA,
H. transalpinum, EM RATOS E
CAMUNDONGOS MACHOS**

Este exemplar foi devidamente
examinado conforme requisitos

C.C.A.S. — 036/83

Piracicaba, 10 de outubro/86



Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do grau de Doutor em
Ciências, área de concentração
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. JOÃO
LEONEL JOSÉ

Piracicaba
1996

0605

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	L 523c
V.	Ex.
TEMPO	82/ 29.2.94
PROG.	667196
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/12/96
N.º CPD	

CM-0009403-7

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

L523c Legaspe, Mara Fonseca Chiarelli
 Contribuição para o estudo da intoxicação, analgesia e da
 potencialização do sono barbitúrico da planta, *H. transalpinum*,
 em ratos e camundongos machos. / Mara Fonseca Chiarelli
 Legaspe. - Piracicaba : [s.d.], 1996.
 83f. : il.
 Orientador: João Leonel José
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
 Faculdade de odontologia de Piracicaba.
 1. Plantas medicinais. 2. Sono 3. Analgesia. I. José João
 Leonel. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Odontologia de Piracicaba. III. Título.

19.CDD -581.634

612.821

615.783

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Plantas medicinais
2. Sono
3. Analgesia



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 30/08/96, considerou a candidata aprovada.

1. João Leonel José

2. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga

3. Eduardo Dias de Andrade

4. Carlos Eduardo Pinheiro

5. Antonio Renzi

A meu Pai (*in memoriam*)

Por mais bem sucedida que seja esta tarefa, mesmo tendo encontrado as mais lindas e perfeitas palavras, tenho certeza de que não conseguirei expressar os sentimentos de gratidão e ternura a meu pai e professor de Ciências, Cid Chiarelli, por seus ensinamentos, conselhos e pelo exemplo de vida que tento seguir, mas não consigo ser fiel a sua honrosa trilha.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Doutor JOSÉ MARTINS FILHO, Digníssimo Reitor da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, pelo incentivo à pesquisa desta Universidade;
- Ao Professor Doutor JOSÉ RANALI, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo apoio recebido;
- Ao Professor Doutor JOÃO ERNESTO DE CARVALHO, Coordenador da Área de Ensaaios Biológicos do C.P.Q.B.A. - UNICAMP, pela colaboração e orientação nas técnicas utilizadas no presente trabalho;
- Ao Professor Doutor JOÃO LEONEL JOSÉ, Professor Livre Docente, da Área de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela orientação, estímulo e amizade;

- Ao Professor Doutor FRAB NORBERTO BOSCOLO, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo incentivo dado à pesquisa desta Faculdade;
- Ao Professor Doutor THALES R. MATTOS FILHO, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Farmacologia, pelos ensinamentos recebidos e orientação durante o curso de pós-graduação;
- Aos Professores da Área de Farmacologia, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP: Doutor EDUARDO DIAS DE ANDRADE, Doutor PEDRO LUIZ ROSALEN, Doutora MARIA CRISTINA VOLPATO e Doutor FRANCISCO CARLOS GROPPPO, por seus ensinamentos;
- Ao Professor Doutor ANTÔNIO RENZI, do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, pela colaboração recebida;

- Ao Professor Doutor NIKOLAI SHARAPIN, pelo auxílio nas técnicas para os ensaios fitoquímicos;
- À Bióloga ANA POSSENTI, do C.P.Q.B.A.- UNICAMP, pela amizade e auxílio nas técnicas utilizadas;
- Ao Professor MILTON FRANCO DE FARIA, pela correção ortográfica;
- Ao Técnico de Laboratório CARLOS ALBERTO APARECIDO FELICIANO, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela colaboração;
- Aos Funcionários do C.P.Q.B.A.- UNICAMP, pela colaboração e amizade;
- À Bibliotecária Luiza Fátima Silva, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela colaboração.
- À Sandra Márcia de Oliveira, pelo auxílio na digitação.

SUMÁRIO

	páginas
Lista de Tabelas.....	01
Lista de Figuras e Gráficos.....	05
Resumo.....	06
1. Introdução.....	08
2. Proposição.....	14
3. Revisão da Literatura.....	16
4. Materiais e Métodos.....	28
5. Resultados.....	44
6. Discussão dos Resultados.....	61
7. Conclusões.....	70
Summary.....	72
Referências Bibliográficas.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise qualitativa dos constituintes vegetais de *Heliotropium transalpinum* no screening fitoquímico.

46

Tabela 2: Tempo de indução (TI) e tempo de sono (TS), em minutos, nos grupos controle (Sol. NaCl 0,9%) e tratado (*Heliotropium transalpinum*, 1g/kg de peso) com 30mg/kg de peso de pentobarbital.

47

Tabela 3: Tempo de indução (TI) e tempo de sono (TS), em minutos, nos grupos controle (Sol. NaCl 0,9%) e tratado (*Heliotropium transalpinum*, 1g/kg de peso) com 40mg/kg de peso de pentobarbital.

48

Tabela 4: Tempo de permanência (em segundos) dos camundongos na placa quente, aos 30, 60, 90 e 120 minutos, após a injeção de 1g/kg de peso de *H. transalpinum*, nos grupos tratado e controle (sol. de NaCl a 0,9%) do experimento nº 1 (E1).

49

Tabela 5: Tempo de permanência (em segundos) dos camundongos na placa quente, aos 30, 60, 90 e 120 minutos, após a injeção de 1g/kg de peso de *H. transalpinum*, nos grupos tratado e controle (sol. de NaCl a 0,9%) do experimento nº 2 (E2).

50

Tabela 6: Tempo (em segundos) de permanência dos comundongos na placa quente, nos experimentos E1 e E2, com 1g/kg de peso de extrato de *Helitropium transalpinum*, após 30, 60, 90 e 120 minutos testados.

51

Tabela 7: Análise de variância do tempo de permanência de camundongos, em placa quente, após administração de 1g/kg de peso de *Heliotropium transalpinum*.

52

Tabela 8: Médias de tempo (em segundos) de permanência de camundongos em placa quente, segundo os grupos controle (Sol. NaCl 0,9%) e tratado (1g/kg de peso de *H. transalpinum*).

53

Tabela 9: Médias de tempo (em segundos) de permanência de camundongos em placa quente, nos grupos tratado, controle e média geral, segundo o tempo (em minutos) decorrido após a administração de 1g/kg de peso de *H. transalpinum*.

53

Tabela 10: Tempo de permanência (em segundos) dos camundongos na placa quente, para os grupos controle (Sol. de NaCl 0,9%) e tratado, com 2 g/kg de peso de extrato de *Heliotropium transalpinum* no experimento nº 3 (E3), após 30, 60, 90 e 120 minutos testados.

55

Tabela 11: Tempo (em segundos) de permanência dos camundongos na placa quente, para os grupos controle (Sol. NaCl 0,9%) e tratado com 2 g/kg de peso de extrato de *Heliotropium transalpinum* no experimento nº 4 (E4), após 30, 60, 90 e 120 minutos testados.

56

Tabela 12: Tempo (em segundos) de permanência dos camundongos na placa quente, dos experimentos E3 e E4 para 2 g/kg de peso de extrato de *Heliotropium transalpinum*, após 30, 60, 90 e 120 minutos testados.

57

Tabela 13: Análise de variância do tempo de permanência de camundongos, em placa quente, após administração de 2g/kg de peso de *Heliotropium transalpinum*.

58

Tabela 14: Médias de tempo (em segundos) de permanência de camundongos em placa quente, segundo os grupos tratado (2g/kg de peso de *H. transalpinum*) e controle (Sol. NaCl 0,9%).

59

Tabela 15: Médias de tempo (em segundos) de permanência de camundongos em placa quente, nos grupos tratado, controle e média geral, segundo o tempo (em minutos) decorrido após a administração de 2g/kg de peso de *H. transalpinum*.

59

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Exemplar de <i>Heliotropium transalpinum</i> .	11
Figura 2: Screening Fitoquímico, extração dos constituintes do <i>H. transalpinum</i> com éter etílico.	32
Figura 3: Screening Fitoquímico, extração dos constituintes do <i>H. transalpinum</i> com etanol.	33
Figura 4: Screening Fitoquímico, extração dos constituintes do <i>H. transalpinum</i> com água destilada.	34
Figura 5: Placa Quente.	41
Gráfico 1: Tempo de permanência dos camundongos na placa quente, para os grupos controle e tratado com 1g/kg de peso de <i>H. transalpinum</i> .	54
Gráfico 2: Tempo de permanência dos camundongos na placa quente, para os grupos controle e tratado com 2g/kg de peso de <i>H. transalpinum</i> .	60

RESUMO

A espécie vegetal, *Heliotropium transalpinum*, pertence à família das *Boraginaceae*, é popularmente conhecida como “bico de corvo”.

É um arbusto de flores brancas, encontra-se distribuído geograficamente na Bolívia, Argentina, Paraguai e Brasil (de Bahia até o Rio Grande do Sul).

Foi feito um estudo das propriedades analgésicas do extrato hidroalcoólico (E. H.), bem como dos constituintes qualitativos do *H. transalpinum*.

O E. H. mostrou um efeito potencializador da ação hipnótica do pentobarbital, em teste específico, na dose de 1g/kg de peso.

No teste de verificação de analgesia, a placa quente, os resultados obtidos demonstraram que o E. H., nas doses de 1g/kg de peso e 2g/kg de peso, aumentou o tempo de latência no referido teste.

A analgesia foi mais efetiva, decorridos 120 minutos após a administração de 1g/kg de peso de E.H.. Para a dose de 2g/kg de peso do E.H., o efeito analgésico máximo obtido foi aos 30 minutos, após a administração.

Analisando-se as médias de tempo de permanência dos comundongos na placa quente, para as doses de 1g/k de peso e 2g/kg de peso de E.H., conclui-se que o efeito analgésico do E.H. de *Heliotropium transalpinum* é dependente das doses administradas e do tempo de administração das mesmas.

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O empirismo marcou o início da terapêutica e, quiçá, da medicina.

A terapêutica empírica não tem base científica, um escopo seguro, uma finalidade certa. Baseia-se, exclusivamente, na prática. Nasce, geralmente, da observação de que um remédio determinado faz bem para um certo mal, sem conclusão sobre o modo pelo qual age, faz bem porque faz bem CUNHA¹⁴ (1955).

Os antigos egípcios, que se desenvolveram na arte de embalsamar cadáveres para guardá-los da deterioração, experimentaram muitas plantas cujo poder curativo descobriram ou confirmaram.

Nascia, assim, a fitoterapia.

Naqueles velhos tempos, as plantas eram muitas vezes escolhidas por seu cheiro, pois se cria que certos aromas afugentavam os espíritos das enfermidades. Essa crença continuou até a idade média.

Relativamente bem adiantados também na arte de curar, os mesmos usavam, além das plantas aromáticas, muitas outras cujos efeitos

bem conheciam, como a papoula (sonífera), a cila(cardíaca), a babosa e o óleo de rícino (catárticos), etc.

O papiro descoberto por Ebers, em 1873, está repleto de receitas médicas em que estavam plantas em mistura com outras substâncias **BALBACH¹ (1969)**.

O poder curativo das plantas medicinais pode ser utilizado de vários modos.

Podemos servir-nos da planta fresca, da seca, das confeções em compressas, da tintura e da pomada, do banho de vapor, etc. **HUIBERS²⁰ (1970)**.

Segundo **SMITH³⁷ (1970)**, as *Boraginaceae* apresentam cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente em regiões tropicais.

De acordo com **SOARES³⁸ (1973)**, o *Heliotropium transalpinum* pertence a família das *Boraginaceae*, sub-família *Heliotropoideae*; é uma erva de caule ereto, cilíndrico, piloso, de folhas alternadas, longipecioladas, sem estípulas, penínervias, lanceoladas, acuminadas, cuneadas, atenuadas de margens onduladas e pilosas. Inflorescências de cima escorpióides, multiflora, flores de cor branca, sésseis, pentâmeras, levemente zigomorfas, hermafroditas, isostêmones.

Corola regular, internamente glabra, externamente pilosa. Tubo corolínico longo, sulcado. Cálice gamossépalo de sépalas quase livres, condescidas apenas na base, piloso.

Androceu dialistêmone de 5 estames sésseis, inclusos, inseridos no fundo do tubo corolínico, alternantes, anteras ditécas, introrsas de deiscência longitudinal. Gineceu pluricarpelar sincarpo, com anel nectarífero; estilete terminal, incluso, capitado; estigma piloso. Fruto: drupa.



Figura 1 - Exemplar de *Heliotropium transalpinum*

O *Heliotropium transalpinum* encontra-se distribuído geograficamente na Bolívia, Argentina, Paraguai e Brasil (Bahia até o Rio Grande do Sul).

Segundo **WHO**⁴⁷ (1988), na natureza existem cerca de 350 espécies vegetais pertencentes às famílias *Apocynaceae*, *Asteraceae* (*Compositae*), *Boraginaceae*, *Celestraceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Graminae*, *Orchidaceae*, *Ranunculaceae*, *Sapotaceae* e *Scrofilariaceae*, portadoras de alcalóides pirrolizidínicos (Pas).

Muitas espécies pertencentes a estas famílias são empregadas na medicina popular **WESTENDORF**⁴⁴ (1992).

Relatos, publicados pela Organização Mundial de Saúde, sobre intoxicação humana provocada por espécies vegetais produtoras de alcalóides pirrolizidínicos, iniciaram-se na década de 30, quando milhares de pessoas alimentaram-se de cereais contaminados por sementes de espécies que produziam P.As. **WHO**⁴⁷ (1988).

Para compreender a existência de intoxicações por plantas medicinais, é necessário ter-se em conta que, em doses convenientes, as substâncias medicamentosas podem exercer efeitos salutaros, mas que podem, pelo contrário, provocar ações nocivas quando as doses administradas são demasiadamente elevadas, já que, por vezes, a margem

entre as doses terapêuticas e as doses tóxicas é muito pequena. A planta *Heliotropium transalpinum*, apesar de ser amplamente disponível, não dispõem de nenhum trabalho enfocando seus princípios ativos e sua ação analgésica, abrindo-se, por isso, condição de estudo.

CAPÍTULO II

PROPOSIÇÃO

CAPÍTULO II

PROPOSIÇÃO

Podemos observar posteriormente, nas referências bibliográficas, que a planta *H. transalpinum* tem seus efeitos farmacológicos pouco explorados; em decorrência disso, propusemo-nos a realizar esse trabalho com os seguintes objetivos:

1. Analisar a composição química qualitativa da planta *Heliotropium transalpinum*.
2. Analisar o efeito da planta *Heliotropium transalpinum* em camundongos, sobre o teste específico de analgesia central: Placa Quente.
3. Analisar a interação da planta *H. transalpinum* quando associada ao pentobarbital, na potencialização do sono em camundongos.

CAPÍTULO III

REVISÃO DA LITERATURA

CAPÍTULO III

REVISÃO DA LITERATURA

Com o nome de alcalóides, se englobam certo número de substâncias ternárias e quaternárias, dotadas geralmente de caráter básico e de propriedades tóxicas.

Existem em quase todo o reino vegetal e fazem parte integrante da composição das plantas, constituindo os princípios ativos, sendo que estes conferem a estas suas propriedades e justificam seu uso terapêutico **BUZZO⁶ (1945)**.

Segundo **LAROZE & SILVA²² (1947)**, desconhece-se a finalidade dos alcalóides nas plantas, não se ultrapassa o âmbito das hipóteses, pois obtiveram-se ainda só resultados experimentais precários e difíceis de interpretar.

Inicialmente, atribuíram-lhes o papel de proteção que resultava da toxicidade elevada que emprestavam às plantas, mas verificou-se que há diversos herbívoras que as comem e numerosos insetos e fungos que as parasitam.

Outra hipótese seria baseada nos fatos observados de os alcalóides serem eliminados pelas raízes e depois facilmente absorvidos pelos minerais argilosos do solo; admite-se que desempenham o papel de trocadores iônicos, deslocando os cátions da parte coloidal argilo- húmica da terra que, depois, já podem ser introduzidos na economia das plantas, através dos pêlos radiculares; simultaneamente, provocam uma mudança nas propriedades físico- químicas das substâncias argilosas, que pode ser benéfica para as plantas.

SYKULSKA & JERZMANOWSKA⁴⁰ (1964), estudando a planta *Cynoglossum officinale* (Cinoglossa), das *Boraginaceae*, distribuída em terrenos secos e incultos da Europa, Ásia e América do Norte, relataram que a casca das raízes desta era usada na medicina popular como analgésico e associada ao ópio no tratamento da insônia.

SULLMAN & ZUCKERMAN³⁹ (1969), pesquisando os efeitos da heliotrina, um alcalóide pirrolizidínico, comumente encontrado nas espécies de plantas do gênero *Heliotropium*, relataram a sua ação hepatotóxica no homem e em animais domésticos; sendo que esta se baseia na inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas. O mecanismo de ação da heliotrina pode ser similar ao de certos antibióticos.

Uma afecção crônica do fígado foi induzida em cães alimentados ininterruptamente com sementes de *Heliotropium lasiocarpum*, em baixas dosagens, por um período de 38 meses. Desordens nas estruturas das células hepáticas foram notadas além de alterações à nível de hematopoese, coagulação sanguínea e proteínas plasmáticas SHAN-TIN-ZHAN³⁶ (1971).

Entre as *Boraginaceae*, o *Heliotropium indicum*, demonstrou conter princípios ativos anti-neoplásicos, entretanto, devido aos seus efeitos citotóxicos teve seu uso desaconselhado na terapêutica LIN²³ (1972), WHO⁴⁷ (1988), RISK & KAMEL³² (1990).

A atividade neoplásica dos alcalóides pirrolizidínicos foi observada após tratamento crônico de ratos com produtos naturais, contendo derivados de *Heliotropium supinum* que acarretaram o aparecimento de tumores renais SCHOENTAL et al.³⁵ (1971).

SCHOENTAL & CAVENAGH³⁴ (1972), relataram a ocorrência de tumores no cérebro e na medula espinhal de ratas tratadas com frações de extrato de *Heliotropium ramosissimum* adicionadas à dieta , durante o período de gestação e lactação.Os autores atentam ao fato de que muitas neoplasias, de ocorrência “natural”, podem estar

associadas à exposição de animais e do homem, durante o período da gestação, a estas substâncias.

CLARK¹⁰ (1937), foi o primeiro a classificar as drogas hipnóticas em dois grandes grupos : barbitúricos e não barbitúricos.

Segundo o autor, os hipnóticos são substâncias depressoras do sistema nervoso central que provocam sono do tipo fisiológico, usadas em casos de insônia.

CARLINI⁷ (1973), relatou que, além da lipossolubilidade, outra característica importante dos barbituratos em relação a sua ação hipnótica ou anestésica é o seu grau de ionização.

É fato conhecido que substâncias, para atravessar a barreira meningeana, geralmente necessitam estar sob a forma molecular ou não ionizada. Isso porque uma droga sob a forma iônica, portanto carregada eletricamente, seria repelida da superfície de uma membrana por cargas elétricas de sinal igual ou atraída e fixada por carga de sinal contrário nessa mesma membrana, portanto, sem atravessá-la. Além do mais, quando ionizadas as substâncias são menos lipossolúveis.

Várias substâncias são capazes de atuar sobre o fígado, inibindo a função deste órgão de metabolizar os barbituratos **EDDY & LEIMBACH¹⁵ (1953)**, **EDDY & TOUCHBERRY¹⁶ (1950)**, **JANSSEN**

& JAGENEAU²¹ (1957), CLOUET & TATNER¹¹ (1970).

Provavelmente esta seria uma das razões, entre outras, pelas quais a clorpromazina pode potencializar o efeito hipnótico dos barbituratos **EDDY & LEIMBACH¹⁵ (1953).**

Os efeitos depressores dos barbitúricos são potencializados pelos fenotiazínicos (clorpromazina); butirofenônicos (haloperidol), reserpina e álcool etílico. O uso simultâneo de barbitúricos e inibidores da monoamino oxidase (IMAO) leva à taquicardia e hiperreflexia. Como os barbitúricos são indutores enzimáticos ao nível dos microsomas hepáticos, muitos medicamentos aplicados simultaneamente com os barbitúricos têm seu metabolismo acelerado; são exemplos a fenilbutazona, difenilidantoína, dicumarínicos etc **PRADO et al.³¹ (1973).**

O pentobarbital (nembutal) é considerado um barbitúrico de ação rápida e curta, utilizado por via venosa ou intramuscular. Seus efeitos se iniciam rapidamente (10 à 15 minutos) e se mantêm até 3 horas depois; sendo empregado para uma hipnose rápida, como no caso de pacientes que apresentam excitação psicomotora ou sofreram trauma de qualquer natureza. No homem a dose habitual terapêutica varia de 0,05 à 0,1 g **EHRNEBO¹⁷ (1974).**

Os hipnóticos são substâncias que determinam graus variados de depressão do sistema nervoso central (S.N.C.). As drogas hipnóticas podem ser classificadas em dois grandes grupos: barbitúricos e não barbitúricos **ZANINI & SEIZI**⁴⁸ (1985).

Em relação ao estudo fitoquímico, realizado com o gênero e/ou espécie envolvido neste trabalho, verificou-se que, das folhas e caule de *Heliotropium bacciferum* e *Heliotropium ovalifolium*, isolaram-se ácidos graxos, identificados como linoleico, palmítico e oléico, além de esteróis, ou seja beta sitosterol **MIRALLES et al.**²⁸ (1989). Através de estudos com cromatografia gasosa em *Boraginaceae*, foi detectada a presença de ácidos alfa linolênicos, como característica da família, com exceção da subfamília *Heliotropoideae* **TETENYI**⁴² (1974).

O alcalóide pirrolizidínico monoéster, heliotrina, (C₁₆H₂₇O₅N) demonstrou ter estrutura cristalina e densidade de 1.208 g/cm³, **WODAK**⁴⁵ (1975).

Na Amazônia brasileira, existe grande número de vegetais corriqueiramente usados com finalidades terapêuticas, tornando-se, às vezes, no interior, a única fonte de medicamentos, principalmente nos locais mais isolados e distantes.

Toda essa cultura, herdada dos indígenas e misturada à tradição européia, introduzida e adaptada pelo colonizador, constitui uma rica farmacopéia amazônica, que tem despertado não só o interesse nacional como o internacional, pela sua grande potencialidade terapêutica e econômica **BERGG² (1982)**.

O uso medicinal do confrei, no final dos anos 70 e no início dos 80, foi amplamente estimulado no Brasil, prometia esta planta uma verdadeira revolução na terapêutica contra os males: asma, bronquite, enfizema pulmonar, cefaléias, fraturas, hemorragias, gota, úlcera estomacal e até o câncer.

Consumia-se confrei na forma de infusões, saladas, sucos, cápsulas, comprimidos, pomadas, emplastos e shampoos.

A terapêutica com o confrei era defendida por muitos professores de importantes instituições brasileiras, entretanto, alguns outros, discordavam da eficácia do mesmo, **CONFREI¹² (1983)**.

Trabalhos científicos, publicados em revistas especializadas, demonstravam, na mesma época, os efeitos tóxicos dos alcalóides pirrolizidínicos, presentes em diferentes espécies vegetais, incluindo as pertencentes ao gênero (*Symphytum*) do confrei **MCLEAN²⁷ (1970)**, **ROITMAN³³ (1981)**.

Garrafada é um termo da linguagem popular que significa mistura de plantas medicinais. Muitas das idéias surgiram em programas comunitários de saúde, incentivados comumente por Organizações Não Governamentais (ONGs) e Ações comunitárias ligadas à Igreja Católica **GARRAFADA¹⁸ (1985)**

Relatos de intoxicações humanas provocadas por espécies vegetais produtoras de alcalóides pirrolizidínicos em diversos países: Índia, Egito, URSS, Reino Unido, EUA, Afeganistão e Venezuela, através do consumo de cereais contaminados, principalmente farinha de trigo, hábitos de comer plantas (crianças), infusões de Chás (Maté Paraguay tea, *Symphitum sp*, *Senecio longilobus*, *Heliotropium lasiocarpum*, etc) foram causa de inúmeras desordens fisiológicas, em diferentes natureza e graus de lesões, de cirrose, até mortes **WHO⁴⁷ (1988)**.

Alguns Alcalóides pirrolizidínicos, no sistema cardiovascular, produzem diminuição da força e frequência cardíaca e queda da pressão arterial, provavelmente por ações antagônicas às produzidas pelas catecolaminas; outros produzem relaxamento da musculatura lisa uterina e do trato gastro intestinal. Relaxamento da musculatura estriada por bloqueio da junção neuromuscular também foi observado por **RISK & KAMEL³² (1990)**.

O seqüestro de substâncias, oriundas de plantas por insetos hospedeiros, é um fenômeno biológico já bem conhecido na literatura especializada, sendo os alcalóides pirrolizidínicos um bom exemplo de substâncias constituintes de inseto proveniente da planta hospedeira **BOPPRE⁴ (1990).**

Ensaíos biológicos, realizados com espécies de aranha *Nephila clavipis* e a lagarta, *H. syma*, hospedeira de planta, da espécie de *Heliotropium transalpinum*, sugerem que os alcalóides pirrolizidínicos presentes na lagarta constituem um sistema de defesa química contra o seu predador, *Nephila clavips* **TRIGO et al.⁴³ (1992).**

Após análise química dos alcalóides pirrolizidínicos (Pas) constituintes do *Heliotropium transalpinum*, os autores acima relataram a presença de 1% de supinina, 2% de intermedina, 3% de lycopsamina, 7% de rinderina, 17% de 3'acetilintermedina, 68% de 3'acetilrinderina; sendo que 2% dos alcalóides totais não puderam ser identificados.

Segundo **WESTENDORF⁴⁴ (1992)**, a metabolização dos alcalóides pirrolizidínicos, após o processo de absorção, pode dar-se por três mecanismos: 1 - Hidrólise em diversos tecidos, dando origem à um aminoalcool, a base neícina, desprovida de toxicidade.

2-N-oxidação hepática, dando origem à derivados N-óxidos, bastante solúveis, daí serem facilmente excretados por via renal.

3-Desidrogenação hepática do núcleo pirrolizidínico, pelas oxidases, dando origem aos dihidroalcalóides ou derivados pirrólicos.

CATALFAMO et al.⁸ (1983) e BIREKA et al.³ (1983), pesquisando a presença de aminoalcool de alcalóides pirrolizidínicos (neicinas), relataram a presença de supinidina, retroneicina, lindelofidina e a heliotrina, em espécies de plantas do gênero *Heliotropium* do México e EUA.

Os derivados pirrólicos dos alcalóides são fortemente eletrolíticos, reagindo com compostos nucleofílicos das células, daí serem formadas as ligações covalentes com proteínas, RNA e DNA, ocasionando alterações fisiológicas até morte celular. Devido à sua reatividade, os derivados pirrólicos ligam-se rapidamente a macromoléculas no local de sua formação, justificando a atividade predominantemente hepatotóxica **RISK & KAMEL³² (1990), WESTENDORF⁴⁴ (1992).**

Muitos produtos extraídos de plantas medicinais possuem eficácia clínica comprovada, alguns exemplos são a vincristina e a vimblastina, agentes antitumorais derivados da *Catharanthus roseus* e o

valpotriato, um agente ansiolítico extraído da *Valeriana officinalis* HOUGHTON¹⁹ (1988). O taxol, obtido do *Taxus brevifolia*, é uma droga que foi recentemente incorporada ao arsenal terapêutico do câncer CRAGG et al.¹³ (1993) e a artemisina, uma substância antimalária, obtida da *Artemisia annua* PHILLIPSON et al.³⁰ (1993).

A norcubitacina, extraída da *Wilbrandia verticillata* TEIXEIRA⁴¹ (1994) e a yamgambina, obtida da *Ocotea duckei* PEREIRA²⁹ (1995), ambas com ações anti-inflamatórias, são exemplos de substâncias, originárias das plantas brasileiras, com potenciais terapêuticos.

CAPÍTULO IV

MATERIAL E MÉTODO

CAPÍTULO IV

MATERIAL E MÉTODO

A. ANIMAIS

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP e mantidos em câmaras, com temperatura controlada e ciclos claro e escuro de 12 horas, com água e ração (Novilab) ad libitum. Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos, adultos, com peso aproximado de 30g, sendo agrupados ao acaso para os experimentos.

B. MATERIAL VEGETAL

Parte aérea de *Heliotropium transalpinum*, proveniente dos canteiros do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas da UNICAMP (CPQBA).

C. SOLUÇÕES UTILIZADAS.

1. Solução de cloreto de sódio 0,9% em água destilada.
2. Solução de Pentobarbital sódico (Nembutal, Abbott).

A dose utilizada foi de 30 mg/kg e 40 mg/kg de peso preparada com solução de cloreto de sódio.

O pentobarbital, em pó, foi diluído em 5ml de solução de cloreto de sódio (0,89%).

Pentobarbital -----15 mg.

solução de NaCl -----q.s.p.5 ml.

D. PREPARAÇÃO DO EXTRATO PARA OS TESTES FARMACOLÓGICOS

Foram coletados 700g de planta fresca, sendo utilizadas as partes aéreas do caule, folhas e flôres. Após a secagem em estufa, obtiveram-se 175g.

A planta seca pulverizada foi colocada em um vidro âmbar, 500 ml de álcool etílico à 70% foram adicionados. Após 1 hora e meia sob agitação, o conteúdo do vidro foi filtrado e ao resíduo foram acrescentados mais 500 ml, num total de 3 extrações consecutivas.

O filtrado foi evaporado em aparelho rotavapor, obtendo-se após esse processo 22,7g de extrato hidroalcoólico mole de *Heliotropium transalpinum*.

E. SCREENING FITOQUÍMICO

Baseia-se na análise química qualitativa das substâncias vegetais; conforme mostram as figuras 2, 3 e 4, método descrito por CIULEI⁹ (1982).

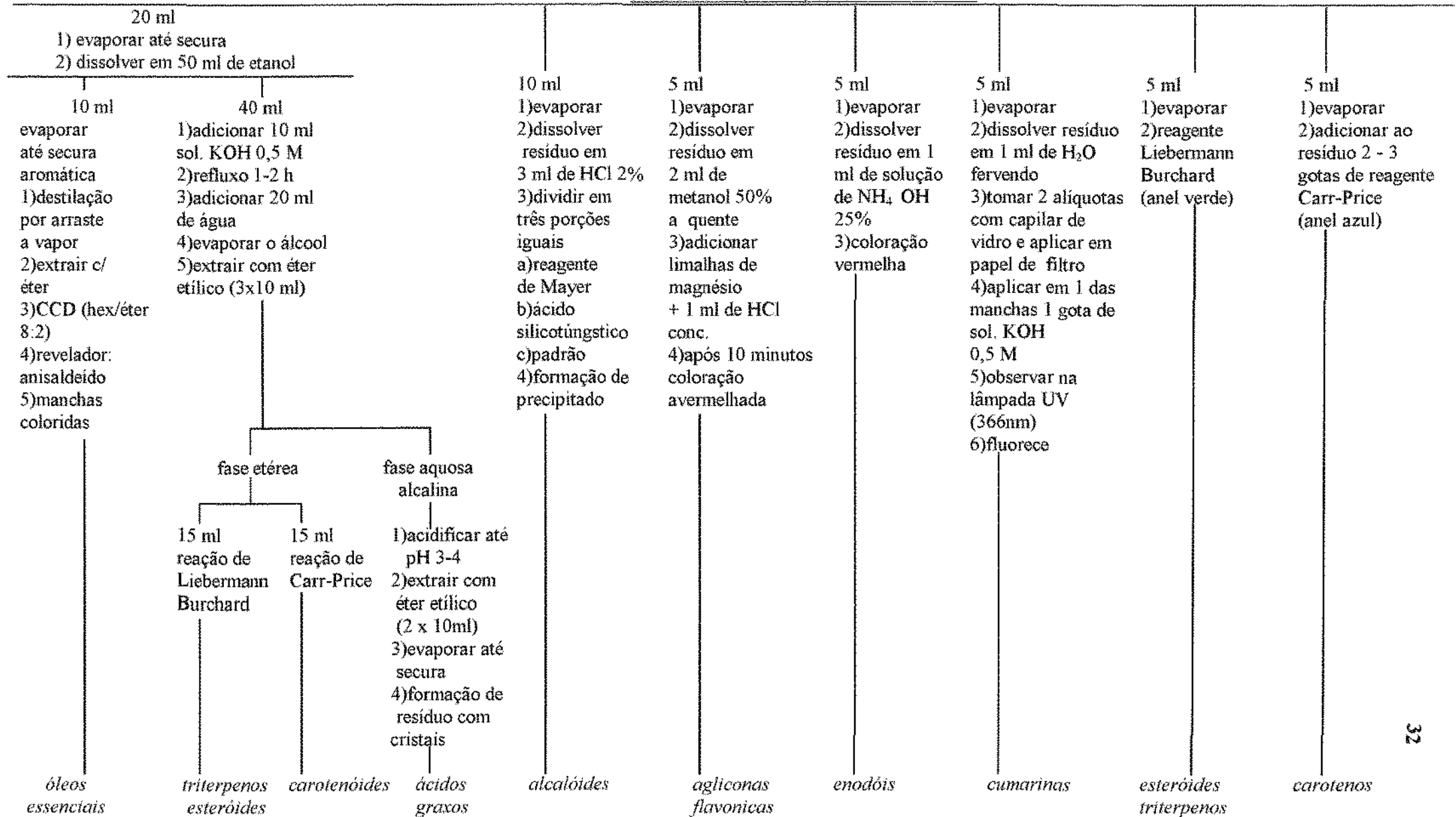
De acordo com esse método, foram feitas 3 extrações dos componentes químicos da planta, *Heliotropium transalpinum*, provenientes do caule e das folhas; utilizando-se, como solventes, éter etílico, etanol e água destilada.

SCREENING FITOQUÍMICO

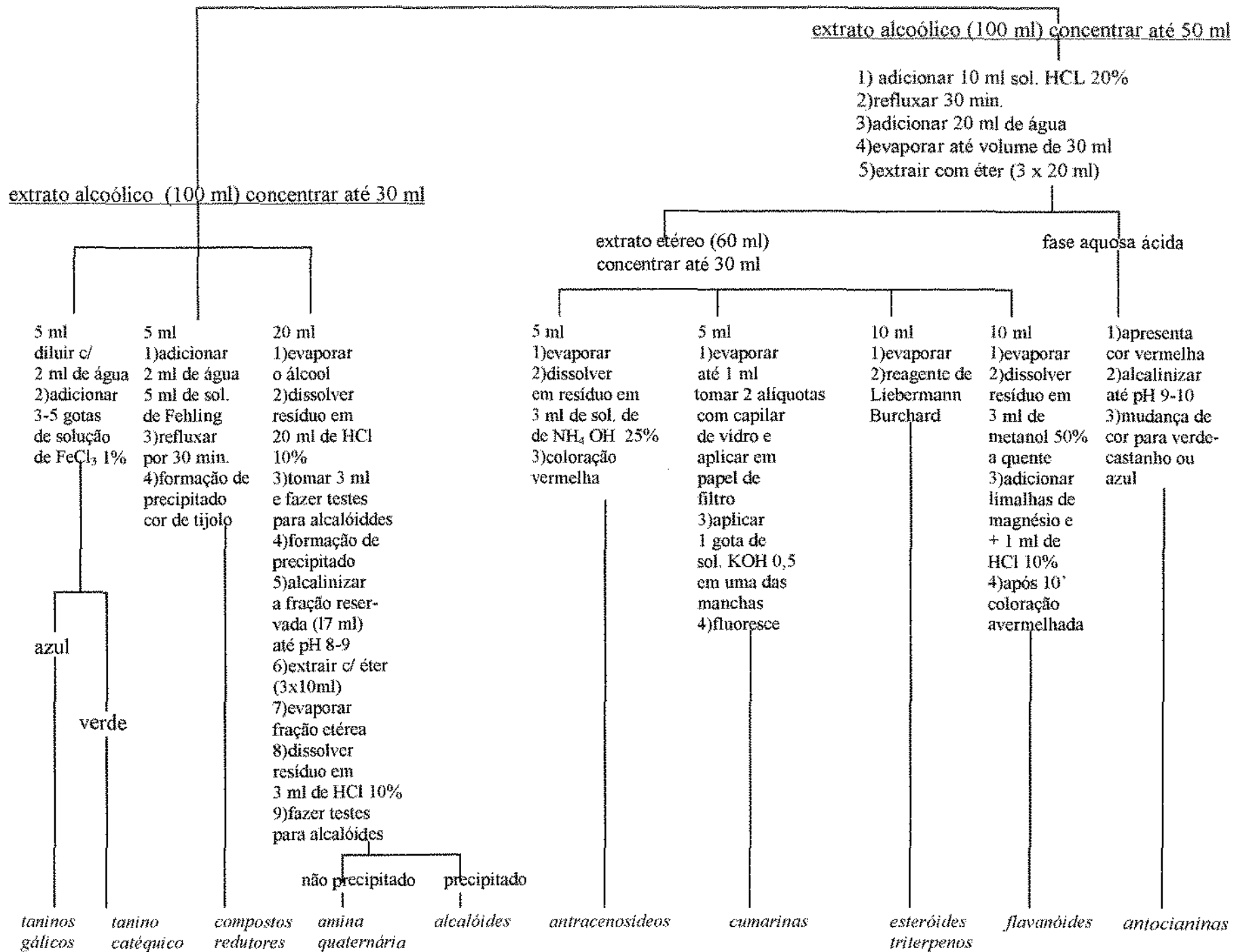
25g da planta seca e pulverizada em aparelho soxhlet

extração exaustiva com éter etílico (200ml)

extrato etéreo (180 ml) concentrar até 50 ml

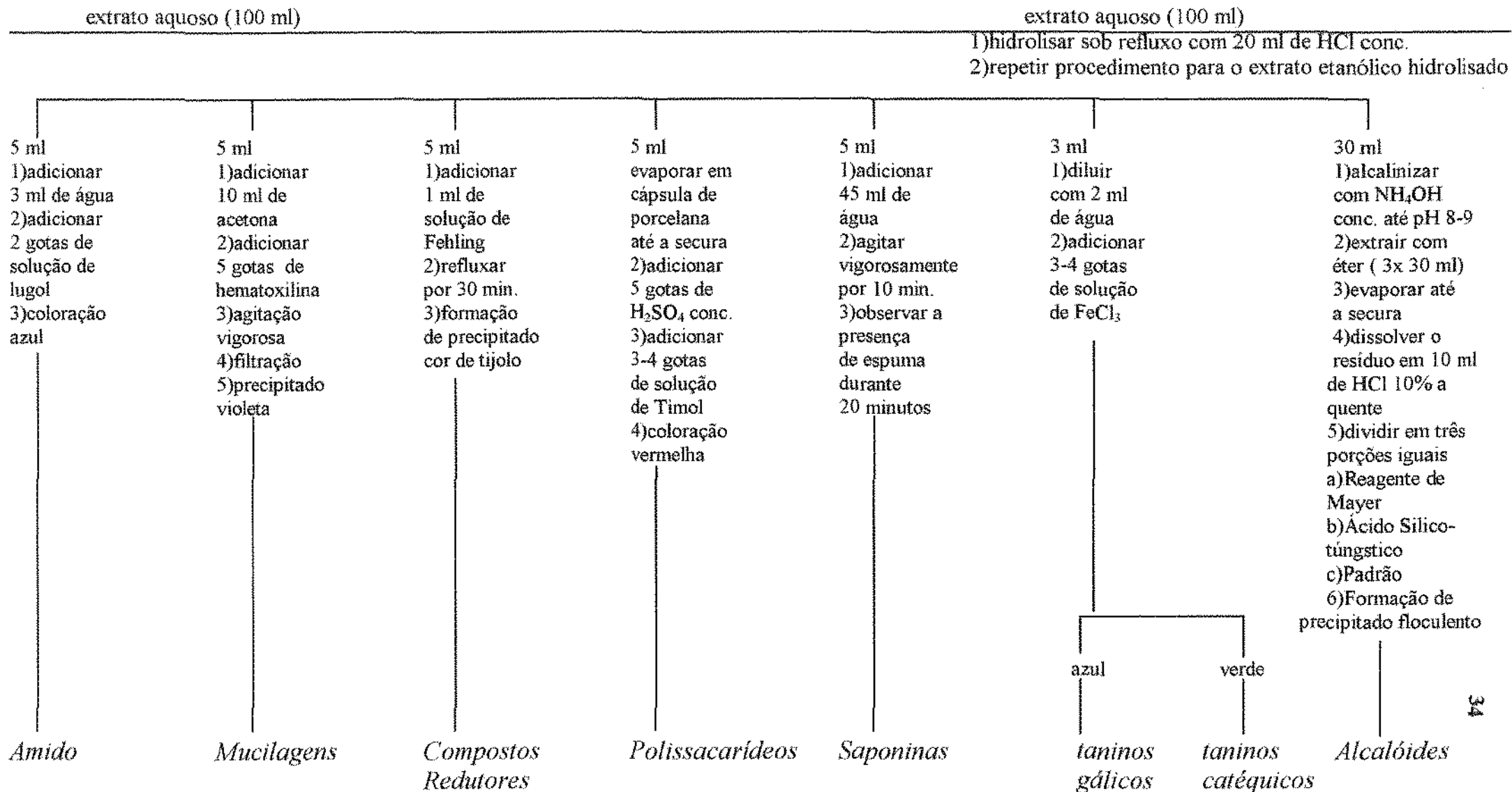


EXTRAÇÃO EXAUSTIVA COM ETANOL (200 ml)



DROGA EXTRAÍDA COM ALCOOL (EM SOXHLET)

- 1) transferir para um balão de fundo redondo de 500 ml
- 2) adicionar 200 ml de água destilada
- 3) refluxar durante 2 horas
- 4) filtrar através de funil de büchner e recolher o filtrado



Na primeira etapa, 25 gramas da planta seca e pulverizada foram extraídas exaustivamente com 200 ml de éter etílico; durante esse processo, 10 ensaios foram efetuados para verificar a presença ou ausência das seguintes substâncias: carotenóides, óleos essenciais, triterpenos, esteróides, ácidos graxos, alcalóides, agliconas flavônicas, enodóis, cumarinas, esteróides triterpenos e carotenos.

Ao resíduo da extração anterior (com éter etílico), foram adicionados 200 ml de Etanol (96%) para nova extração em aparelho Soxlet.

Oito provas bioquímicas foram efetuadas com o extrato alcoólico para se verificar a presença ou ausência de:

- a) taninos gálicos
- b) taninos catéquicos
- c) compostos redutores
- d) aminas quaternárias
- e) alcalóides
- f) antracenosídeos
- g) cumarinas

h) esteróides triterpenos

i) flavonóides

j) antocianinas

Na terceira extração, a droga extraída anteriormente com álcool foi transferida para um balão de fundo redondo e 200 ml de água destilada foram adicionadas e, após 2 horas de refluxo, foram efetuadas provas bioquímicas para se verificar nesse filtrado a existência de:

a) amido

b) mucílagens

c) compostos redutores

d) polissacarídeos

e) saponinas

f) taninos gálicos

g) taninos catéquicos

h) alcalóides

F. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

1. EFEITO DO *H. transalpinum* NO TEMPO DE SONO BARBITÚRICO

Animais

Neste experimento, foram utilizados 22 camundongos machos.

Duas categorias de provas foram efetuadas com a planta *H. transalpinum*, utilizando-se dois grupos experimentais.

GRUPO A - Tratamento com 1g/kg de peso de *H. transalpinum* associado a 30 mg/kg de peso de pentobarbital.

GRUPO B - Tratamento com 1g/kg de peso de *H. transalpinum* associado a 40 mg/kg de peso de pentobarbital.

Distribuição dos grupos experimentais

GRUPO A

Doze camundongos foram pesados e divididos em grupo, controle e tratado: seis animais do grupo tratado receberam pela via intraperitoneal 1g/kg de peso de extrato de *Heliotropium transalpinum* diluído em salina.

Os animais do grupo controle receberam uma solução de NaCl 0,9%, pela via intraperitoneal, sendo esta equivalente ao maior volume injetado nos animais do grupo tratado.

Após 30 minutos de intervalo, do primeiro tratamento, ambos grupos receberam, por via intraperitoneal, uma injeção de pentobarbital na concentração de 30 mg/kg de peso, diluído em salina.

Foram anotados os tempos que cada camundongo levou do momento da injeção do pentobarbital até o sono (tempo de indução) e o tempo decorrido entre o sono e o acordar (tempo de sono).

Os Animais deste Grupo A foram submetidos a essa prova durante 21 dias, sendo o intervalo de 7 dias para o tratamento.

GRUPO B

Neste grupo foram utilizados 10 camundongos e o mesmo procedimento do Grupo A, modificando-se a concentração da solução de pentobarbital que foi de 40 mg/kg de peso e o tempo de duração da prova que foi de 30 dias.

2. TESTE DE ANALGESIA CENTRAL: PLACA QUENTE - (WOLFF, 1944)

A ação analgésica de um determinado composto é avaliada pela reação que um dado animal apresenta a um determinado estímulo; em última análise, mede-se o limiar à dor do animal, antes e após administrar-se o composto CARLINI⁷ (1973).

O método utilizado na presente experiência, a placa quente, foi proposto em 1944 por WOLFF⁴⁶. Consiste em colocar camundongos sobre uma placa de cobre aquecida à temperatura constante (em torno de 55°C) e verificar quantos segundos decorrem antes que o animal apresente resposta característica ao estímulo térmico.

Esta resposta consiste em o animal bater as patas posteriores sobre a placa aquecida e, logo em seguida, lamben as patas anteriores.

Nesta prova foram utilizados 36 camundongos.

Distribuição dos animais para as provas experimentais.

Foram realizados 4 experimentos:- No primeiro (E1) e no segundo (E2) foi utilizado 1g/kg de peso, de extrato de *Heliotropium transalpinum*, para o grupo tratado. Nos experimentos seguintes, E3 e E4,

o mesmo procedimento foi observado, só variando a concentração do extrato de *Heliotropium transalpinum* que foi de 2g/kg de peso.

Os animais, após pesagem, foram separados aleatoriamente em grupos controle e tratado.

Procedimento Experimental:

Foi utilizada basicamente a técnica desenvolvida por WOLFF⁴⁶ (1944) para determinação da resposta antinociceptiva, que é fornecida nos tempos pré determinados. Antes de efetuar o tratamento, o aparelho foi ligado e ajustado para uma temperatura de 55° C, o vidro transparente foi adaptado à bandeja (fig.5). Para se determinar o tempo de reação (em segundos) dos animais, os mesmos foram submetidos a uma seleção prévia, ou seja, foram colocados, um por vez, na placa quente e cobertos imediatamente com um funil, o tempo que o animal levou para lambear as patas anteriores foi anotado e foram selecionados 36 camundongos que responderam ao estímulo em até 10 segundos (tempo 0).



Figura 5 - Placa Quente

Oito camundongos que formam o grupo tratado (E1 e E2) receberam pela via intraperitoneal 1 g/kg de peso, de extrato de *H. transalpinum*, resuspenso em salina; 10 camundongos, que formam o grupo tratado (E3 e E4), receberam, pela via intraperitoneal, 2 g/kg de peso de extrato da planta *H. transalpinum* resuspenso em salina.

Os animais do grupo controle receberam, em salina, o equivalente ao maior volume do extrato utilizado no tratado.

Após 30 minutos, os camundongos foram submetidos novamente à placa e os tempos de reação foram anotados de 30 em 30 minutos, até se completarem 120 minutos após as injeções.

Os dados, coletados de toda a classe, tiveram a média dos tempos de reação calculados para cada medida de tempo (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) e 2 gráficos foram construídos com o tempo de reação (em segundos), na ordenada e o tempo, após a injeção (em minutos), na abcissa.

G. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram obtidos médias, desvios padrões e coeficientes de variação para tempo de indução de sono (TI) e tempo de sono (TS), em cada experimento. Para analisar o tempo de permanência dos camundongos na placa quente, foi feita uma análise de variância (Teste F) com dois critérios de classificação, isto é, grupos e tempos.

Utilizou-se o Teste de Tukey para comparar médias, duas a duas.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

CAPÍTULO V

RESULTADOS

1. SCREENING FITOQUÍMICO

As partes seca e pulverizada provenientes do caule e das folhas do *Heliotropium transalpinum* foram submetidas separadamente a uma análise química qualitativa, segundo o método de **CIULEP⁹ (1982)**.

Os dados obtidos nesse processo de análise, ou seja, as substâncias ativas identificadas através do processo de extração com os solventes: éter, álcool e água destilada, contidas nos respectivos extratos estão mostrados na Tabela 1.

As substâncias provenientes da folha e do caule estão alinhadas em suas respectivas colunas.

Através dos resultados obtidos, observou-se que os constituintes vegetais do *H. transalpinum*, nos extratos etéreo, alcoólico e aquoso, aparecem quase, concomitantemente, na folha e no caule.

Tabela 1: Análise qualitativa dos constituintes vegetais do *Heliotropium transalpinum*, no screening fitoquímico.

	Folha	Caule
Extrato Etéreo		
Oleos Essenciais	-	-
Esteróis	-	-
Carotenos	-	-
Ácidos Graxos	+	+
Enodois	-	-
Alcalóides	-	-
Cumarinas	+	+
Flavonóis	-	-
Extrato Alcoólico		
Taninos	+	+
Compostos Redutores	+	+
Alcalóides	-	-
Antracenosídeos	-	-
Esteróis ou Triterpenos	-	-
Cumarinas	+	+
Flavonóis	-	-
Antocianosídeos	-	-
Aminas Quaternárias	+	+
Extrato Aquoso		
Amido	-	-
Mucilagens	+	-
Polioses	-	-
Compostos Redutores	+	+
Taninos	-	-
Alcalóides	+	+
Saponinas	+	+

Sinal (-) = ausente ; Sinal (+) = presente

2. EFEITO DO *H. transalpinum* NO TEMPO DE SONO BARBITÚRICO

Os dados de TI (tempo de indução) e TS (tempo de sono) para os camundongos do grupo controle e tratado com 30 mg/Kg de peso de pentobarbital estão mostrados na tabela 2. Também são mostrados nesta tabela os valores da média (x), do desvio padrão (s) e do coeficiente de variação.

Tabela 2 - Tempo de indução (TI) e tempo de sono (TS), em minutos, nos grupos controle (Sol. NaCl 0,9%) e tratado (*H. transalpinum*, 1g/kg de peso) com 30 mg/kg de peso de pentobarbital

Controle (Salina - 30 mg/kg pentobarbital)						
N	1ª SEMANA		2ª SEMANA		3ª SEMANA	
	TI	TS	TI	TS	TI	TS
1	-	0	-	0	-	0
2	14	27	-	0	-	0
3	-	0	-	0	-	0
4	-	0	-	0	-	0
5	19	3	-	0	-	0
6	11	4	-	0	-	0
x	14,67	5,67	-	0	-	0
s	4,04	10,59	-	0	-	0
cv	27,55	186,98	-	0	-	0

Tratado (<i>H. transalpinum</i> - 30 mg/kg de peso de pentobarbital)						
N	1ª SEMANA		2ª SEMANA		3ª SEMANA	
	TI	TS	TI	TS	TI	TS
1	3	24	5	29	17	35
2	3	17	4	30	7	45
3	9	15	6	12	7	10
4	7	25	6	18	9	32
5	6	31	6	75	7	37
6	7	59	-	-	-	-
x	5.83	28.50	5.4	32.8	9.4	31.8
s	2.40	16.02	0.89	24.77	4.34	13.10
cv	41.17	56.22	16.53	75.53	46.13	41.21

N = número de animais

Os dados de TI e TS, para os grupos controle e tratado com 40 mg/Kg peso de pentobarbital, estão na tabela 3, com os valores de média, variância e coeficiente de variação.

Tabela 3: Tempo de indução (TI) e tempo de sono (TS), em minutos, nos grupos controle (Sol. NaCl 0,9%) e tratado (*H. transalpinum*, 1g/kg de peso) com 40 mg/kg de peso de pentobarbital

Controle (Salina - 40 mg/kg de pentobarbital)								
N	1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana	
	TI	TS	TI	TS	TI	TS	TI	TS
1	-	0	-	0	-	0	-	0
2	11	2	-	0	7	5	5	20
3	6	8	-	0	7	3	-	0
4	7	4	3	9	-	0	7	5
5	-	0	-	0	11	5	-	0
$\bar{x}$	8	2.8	3	9	8.3	2.6	6	5
s	2.64	3.35			2.31	2.51	1.41	8.66
cv	33.07	119.52			27.71	96.54	23.57	173.20

Tratado (<i>H.transalpinum</i> - 40 mg/kg de pentobarbital)								
N	1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana	
	TI	TS	TI	TS	TI	TS	TI	TS
1	6	28	14	55	5	40	2	34
2	4	47	11	41	5	20	2	39
3	5	58	20	9	5	57	3	53
4	4	37	6	24	6	3	1	44
5	5	28	10	35	4	57	2	33
$\bar{x}$	4.8	39.6	12.2	32.8	5	35.4	2	40.6
s	0.84	12.93	5.22	17.38	0.71	23.67	0.71	0.20
cv	17.43	32.66	42.75	53.00	14.14	66.87	35.35	20.21

N = número de animais.

3. TESTE DE ANALGESIA CENTRAL: PLACA QUENTE - (WOLFF, 1944)

Os tempos de permanência dos camundongos na placa quente, para os grupo controle e tratado, com 1 g/kg de peso de *Heliotropium transalpinum*, em dois experimentos consecutivos (E1 e E2), estão mostrados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Tempo de permanência (em segundos) dos camundongos na Placa Quente, aos 30, 60, 90 e 120 minutos, após a injeção de 1g/kg de peso de *Heliotropium transalpinum*, nos grupos tratado e controle (sol. de NaCl a 0,9%) do experimento número 1 (E 1)

Experimento Nº 1.						
Grupos	Camundongos	Tempo				
		0	30*	60*	90*	120*
Tratado	1	5.2	6.1	14.2	7.4	11.9
	2	4.0	12.0	10.7	19.5	16.6
	3	8.4	31.2	22.8	28.1	30.0
Controle	1	6.0	7.1	3.2	9.0	10.0
	2	9.5	7.5	5.6	5.9	10.2
	3	3.7	6.7	3.7	4.0	2.6

* = minutos.

Tabela 5 - Tempo de permanência (em segundos) dos camundongos na Placa Quente, aos 30, 60, 90 e 120 minutos, após a injeção de 1g/kg de peso de *Heliotropium transalpinum*, nos grupos tratado e controle (sol. de NaCl a 0,9%) do experimento número 2 (E2)

Experimento número 2 (E2)						
Grupos	camundongos	Tempo				
		0	30*	60*	90*	120*
Tratado	1	9.1	14.0	13.8	8.8	11.9
	2	7.0	9.0	8.1	12.0	6.3
	3	8.3	11.0	28.0	30.0	30.0
	4	6.7	12.2	10.3	6.4	18.0
	5	8.9	6.4	5.7	9.2	16.0
Controle	1	8.8	5.3	17.2	23.0	21.0
	2	4.9	5.9	9.7	8.0	8.0
	3	9.4	7.6	15.8	16.0	10.0
	4	9.4	8.7	3.6	5.7	9.0
	5	6.4	5.8	8.8	10.0	9.4

* = minutos.

As médias, os desvios padrões e os coeficientes de variação para o tempo de permanência dos camundongos na placa quente estão mostrados na tabela 6.

Tabela 6 - Tempo (em segundos) de permanência dos camundongos na Placa Quente, nos experimentos E1 e E2 com 1g/kg de peso de extrato de *H. transalpinum*, após 30, 60, 90 e 120 minutos testados.

	Grupo	Estatística	Tempo				
			0	30*	60*	90*	120*
E1	Tratado (1g/Kg)	$\bar{x}$	5.87	16.43	15.90	18.33	19.5
		s	2.27	13.12	6.23	10.40	9.39
		cv	38.7	79.86	39.16	56.72	48.16
	Controle	$\bar{x}$	6.4	7.10	4.17	6.3	7.6
		s	2.92	0.40	1.27	2.52	4.33
		cv	45.63	5.63	30.39	40.06	56.99
E2	Tratado (1g/Kg)	$\bar{x}$	8.0	10.52	13.18	13.28	16.44
		s	1.09	2.93	8.80	9.56	8.80
		cv	13.69	27.90	66.80	71.96	53.54
	Controle	$\bar{x}$	7.78	6.67	11.02	12.54	11.48
		s	2.03	1.43	5.54	6.98	5.37
		cv	26.10	21.51	50.27	55.71	46.79

*= minutos

Para melhor se avaliarem os tempos de permanência dos camundongos na placa quente e, considerando que entre os experimentos E1 e E2 (com dose de 1 g/kg de peso, de extrato de *H. transalpinum*) não havia outra diferença senão o fato de terem sido conduzidos em momentos

diferentes, reuniram-se os dados de E1 e E2, para comparação de médias de grupos. Essa comparação foi feita através de Análise de Variância.

Os resultados da análise, para os experimentos E1 e E2 em conjunto, estão mostrados na tabela 7.

Tabela 7: Análise de variância do tempo de permanência de camundongos em placa quente, após administração de 1g/kg de <i>H. transalpinum</i> .		
Causas de variação	GL	F
Grupos (G)	1	12.78 **
Tempos (T)	4	2.77 *
G x T	4	0.91
Resíduo	70	
Total	79	

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Os valores F, apresentados na tabela acima, mostram que existe diferença entre os grupos e entre os tempos.

Para se compararem as médias, duas a duas, foi aplicado o Teste de Tukey, ao nível de 5%.

As médias de tempo de permanência de camundongos em placa quente, segundo os grupos e o tempo decorrido após a administração de 1g/kg de peso, de *H. transalpinum*, estão nas tabelas 8 e 9, respectivamente. O gráfico nº 1 representa essas médias.

Tabela 8: Médias de tempo (em segundos) de permanência de camundongos em placa quente, nos grupos controle (sol. NaCl 0,9%) e tratado (1g/kg de peso de *H. transalpinum*).

Grupo	Média	Comparação
Tratado	13.53	a
Controle	8.55	b

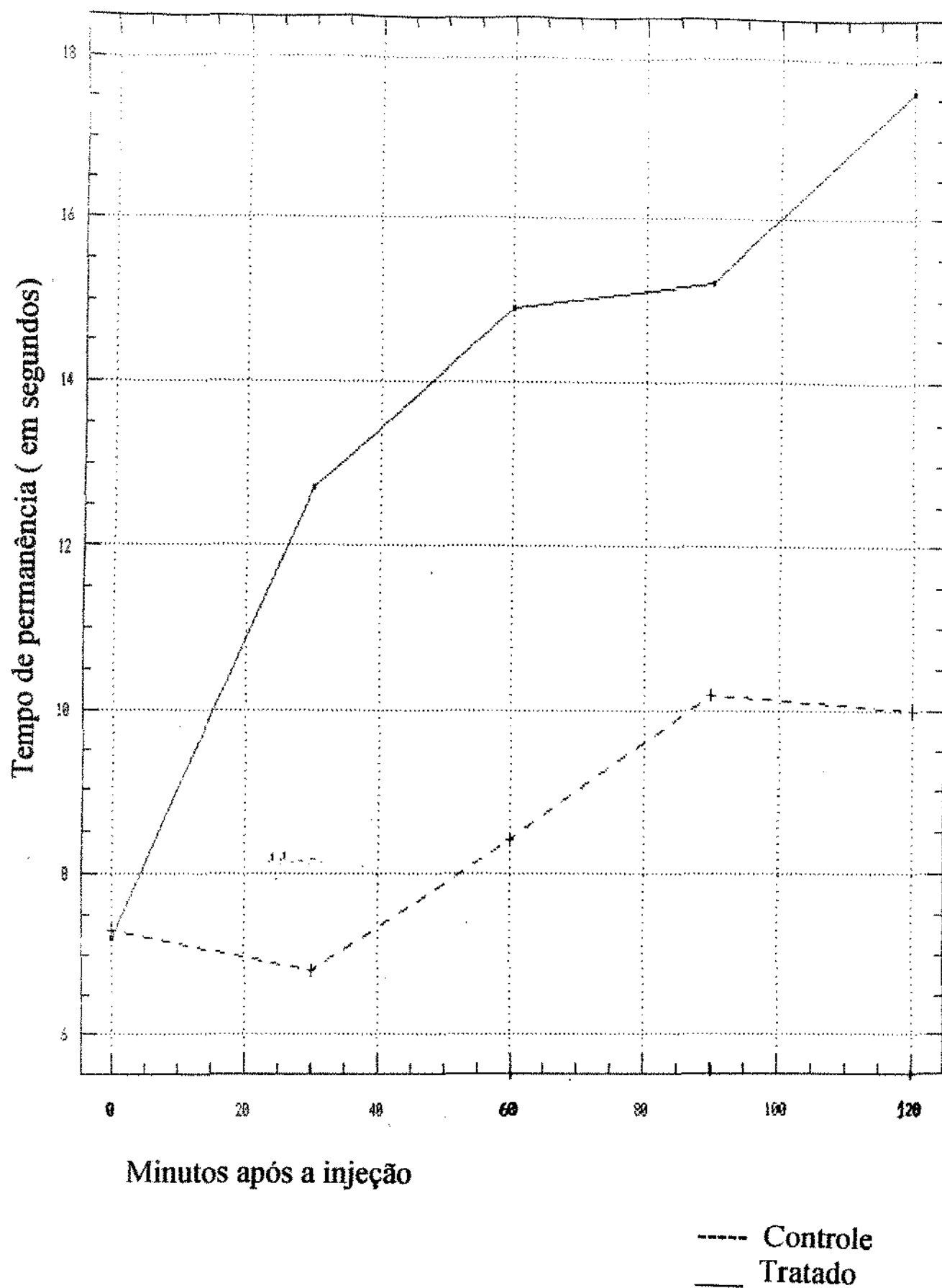
Letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias.

Tabela 9: Médias de tempo (em segundos) de permanência dos camundongos em placa quente, nos grupos tratado, controle e média geral, segundo o tempo (em minutos) decorrido após a administração de 1g/kg de peso de *H. transalpinum*.

Tempo(minutos)	Média (Tratado)	Média (Controle)	Média (Geral)	Comparação
0	7.20	7.26	7.23	a
30	12.74	6.83	9.78	ab
60	14.20	8.45	11.70	ab
90	15.17	10.20	12.69	ab
120	17.59	10.03	13.81	b

Letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias.

Gráfico 1: Tempo de permanência dos camundongos na placa quente, para os grupos controle e tratado com 1g/kg de peso de extrato de *Heliotropium transalpinum*.



O tempo de permanência dos camundongos na placa quente, para os grupos controle e tratado, com a dose de 2g/kg de peso, de *H. transalpinum*, nos experimentos (E3 e E4), estão nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Tempo de permanência (em segundos) dos camundongos na Placa Quente, para os grupos controle (sol. NaCl 0,9%) e tratado com 2 g/kg de peso de extrato de *H. transalpinum* no experimento n° 3 (E3), após 30, 60, 90 e 120 minutos testados.

Experimento N°3 (E 3)						
Grupos	camundongos	Tempo				
		0	30*	60*	90*	120*
Tratado	1	7.8	30.0	13.5	18.0	24.0
	2	5.6	30.0	15.3	9.9	12.9
	3	7.0	30.0	22.0	16.9	13.4
	4	8.0	11.0	11.9	11.3	17.0
	5	7.3	16.0	6.7	3.9	8.6
Controle	1	5.4	13.0	10.0	8.4	9.0
	2	6.4	10.0	5.8	10.0	7.3
	3	4.4	8.0	5.2	10.0	6.4
	4	8.6	12.0	7.8	5.0	7.5
	5	8.8	10.0	12.0	14.0	7.4

* minutos

Tabela 11 - Tempo de permanência (em segundos) dos camundongos na Placa Quente, para os grupos controle (sol. NaCl 0,9%) e tratado com 2 g/kg de peso de extrato de *H. transalpinum* no experimento nº 4 (E4), após 30, 60, 90 e 120 minutos testados.

Experimento Nº 4						
Grupos	Camundongos	Tempo				
		0	30*	60*	90*	120*
Tratado	1	5.1	5.1	5.0	6.8	6.7
	2	3.4	6.8	6.9	11.8	6.8
	3	6.0	8.3	15.3	12.6	9.0
	4	4.5	15.9	8.1	9.4	9.6
	5	5.6	5.3	2.6	6.0	7.0
Controle	1	5.1	7.9	11.4	9.4	5.7
	2	5.7	3.9	5.6	7.6	4.9
	3	6.6	14.5	8.6	7.7	8.0
	4	4.4	6.4	8.3	6.4	5.2
	5	6.1	12.0	7.8	6.9	7.0

* minutos

Os valores das médias, dos desvios padrões (s) e dos coeficientes de variação (cv), estão mostrados na tabela 12.

Tabela 12 - Tempo (em segundos), de permanência dos camundongos na Placa Quente, dos experimentos E3 e E4 para 2 g/kg de peso de extrato de *H. transalpinum*, após 30, 60, 90 e 120 minutos testados.

			Tempo				
	Grupo	Estat.	0	30*	60*	90*	120*
E 3	tratado	$\bar{x}$	7.14	23.4	13.9	12.0	15.2
		s	0.95	9.21	5.56	5.71	5.76
		cv	13.27	39.35	40.04	47.60	37.90
	controle	$\bar{x}$	6.7	10.6	8.7	9.5	7.5
		s	1.94	1,95	2,85	3.25	0.94
		cv	20.90	18.39	34.98	34.26	12.45
	tratado	$\bar{x}$	4.9	8.3	7.6	4.9	7.8
		s	10.1	4.45	4.79	1.02	4.45
		cv	20.70	53.76	63.20	20.70	53.76
E 4	controle	$\bar{x}$	5.58	8.94	8.34	7.60	6.16
		s	0.85	4.29	2.07	1.14	1.30
		cv	15.38	47.85	24.89	14.97	21.18

* minutos

Como os experimentos E3 e E4 são metodologicamente idênticos, diferenciando-se somente no momento em que foram conduzidos, seus dados foram também reunidos para comparação de média de grupos.

Os resultados da análise de variância, para os dados dos experimentos E3 e E4 em conjunto, estão mostrados na tabela 13.

Tabela 13: Análise de variância do tempo de permanência de camundongos em placa quente, após administração de 2g/kg de peso de extrato de *H. transalpinum*.

Causas de variação	GL	F
Grupos (G)	1	10.30**
Tempos (T)	4	5.04**
G x T	4	1.28
Resíduo	90	
Total	99	

** $P < 0.01$.

Os valores F, apresentados na tabela acima, mostram que existe diferença entre os grupos e entre os tempos. Aplicou-se, então, o teste de Tukey para comparação das médias. Os resultados estão nas tabelas 14 e 15 e também estão mostrados no gráfico nº 2.

Tabela 14: Médias de tempo (em segundos) de permanência de camundongos em placa quente, segundo os grupos tratado (2 g/kg de peso de *H. transalpinum*) e controle (sol. NaCl 0,9%).

Grupo	Média (em segundos)	Comparação
Tratado	10.95	a
Controle	7.91	b

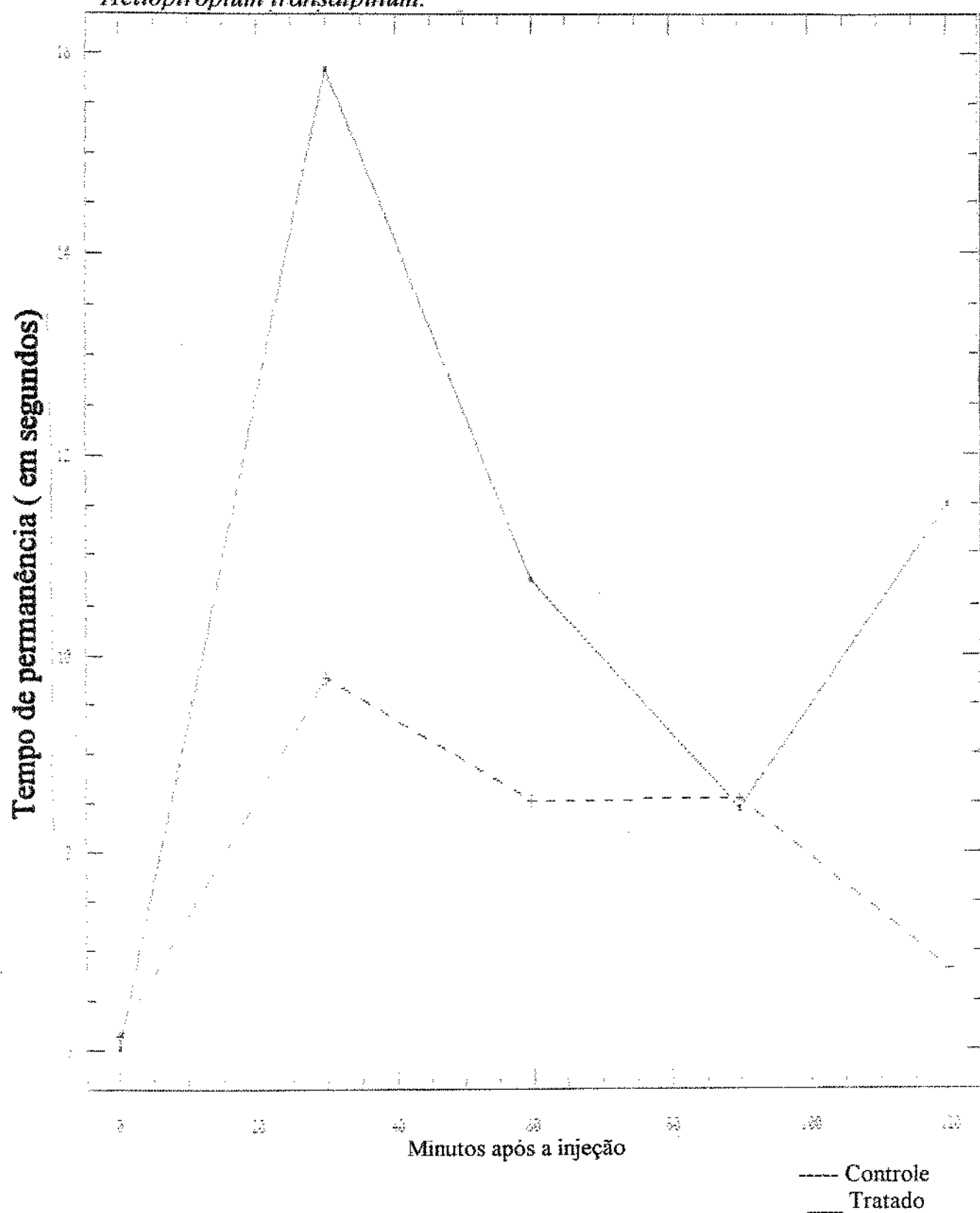
Letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias.

Tabela 15: Médias de tempo (em segundos) de permanência dos camundongos em placa quente, nos grupos tratado, controle e média geral, segundo o tempo (em minutos) decorrido após a administração de 2g/kg de peso de *H. transalpinum*.

Tempo (minutos)	Média (Tratado)	Média (Controle)	Média (geral)	Comparação
0	6.02	6.14	6.09	a
30	15.83	9.77	12.80	b
60	10.75	8.52	9.49	ab
90	8.45	8.55	9.60	ab
120	11.50	6.83	9.17	ab

Letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias.

Gráfico 2: Tempo de permanência dos camundongos na placa quente, para os grupos controle e tratado com 2g/kg de peso de extrato de *Heliotropium transalpinum*.



CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO

CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO

1. SCREENING FITOQUÍMICO

Observando-se a tabela 1, que apresenta os constituintes vegetais do *H. transalpinum*, notamos que as substâncias evidenciadas nos extratos etéreo, alcoólico e aquoso, aparecem quase que, concomitantemente, na folha e no caule.

No extrato etéreo, nota-se a presença de ácidos graxos e cumarinas. **MIRALLES et al²⁸ (1989)**, isolaram das folhas e caule de *Heliotropium bacciferum* e *Heliotropium ovalifolium* ácidos graxos identificados como linoleico, palmítico e oléico.

No extrato alcoólico foram evidenciados os taninos, compostos redutores, cumarinas e aminas quaternárias.

Compostos redutores, alcalóides e saponinas e mucilagens foram os constituintes químicos resultantes dos testes químicos realizados com o extrato aquoso da planta *H. transalpinum*.

BULHÕES et al.⁵ (1976), em uma abordagem fitoquímica de plantas nativas do nordeste brasileiro, selecionaram vinte amostras, dentre elas o *Heliotropium* sp., conhecido popularmente como “fedegoso”, relatando neste estudo a presença dos constituintes alcalóides e triterpenos no extrato alcoólico e taninos no extrato aquoso.

2. EFEITO DO EXTRATO DE *Heliotropium transalpinum* NO TEMPO DE SONO BARBITÚRICO

Analizando-se a tabela 2, que apresenta os dados de TI (tempo de indução) e TS (tempo de sono), com suas respectivas médias, desvio padrão e coeficiente de variação, é importante assinalar que, dos seis camundongos do grupo controle, apenas três (50%) dormiram na primeira semana do teste e nenhum dormiu nas outras semanas de observação. Como os camundongos não dormem, o valor de TS é igual a zero e o valor do TI não se define.

O tempo de sono dos três camundongos na primeira semana, para este grupo controle, foi em média pequeno ($\bar{x} = 5,7$) e muito variável ($s = 10,59$).

No grupo tratado, com 1g/kg de peso de extrato de *H. transalpinum*, o tempo de sono foi, em média, maior e praticamente não variou nas três semanas de observação. Observando-se estes fatos, fica óbvio que existe diferença entre os grupos controle e tratado e que o *H. transalpinum* aumenta o tempo de sono, quando associado à 30 mg/kg de peso de pentobarbital.

Observando-se a tabela 3, para os grupos controle e tratado, utilizando-se 40 mg/kg de peso de pentobarbital, nota-se que no grupo controle nem todos os tempos de sono (TS) são iguais a zero, mas são em média menores do que os valores do grupo tratado. Então podemos notar que o *H. transalpinum* aumentou o tempo de sono dos animais.

O tempo de indução de sono (TI) nem sempre pode ser obtido no grupo controle, pois alguns animais não dormiram, então, torna-se razoável não comparar os valores de TI entre os grupos.

Como os coeficiente de variação são altos, o teste estatístico não capta bem a diferença entre as médias. Esta variabilidade pode ser inerente ao tipo de teste, o sono, que, em si, é uma característica individual entre as espécies.

3. TESTE DE ANALGESIA CENTRAL: PLACA QUENTE - (WOLFF, 1944)

A dor é, sem dúvida, o sintoma mais comum na prática médica. Pode-se dizer que, praticamente, todas as estruturas do organismo são sensíveis à dor. Algumas entretanto, são evidentemente mais sensíveis que outras. Esta tem sido definida como uma sensação localizada de vários graus de severidade, resultante de um estímulo de uma terminação nervosa especializada, conseqüente, de uma lesão, doença ou desordem emocional. A analgesia tem sido definida de modo mais simples como o alívio da dor sem perda da consciência, e um analgésico como uma droga que realiza a analgesia.

Este quadro é complicado pelo fato de que a experiência dolorosa inclui não somente sensações de desconforto mas também as reações a estas sensações.

Segundo McCAIN²⁶ (1987), em uma revisão sobre a dor induzida experimentalmente, a pesquisa racional de uma droga potencialmente vantajosa ou tratamento antinociceptivo requer a compreensão da complexa resposta comportamental e fisiológica de um indivíduo a um estímulo doloroso, tão bem como as limitações particulares do método utilizado para quantificar esta resposta.

Embora técnicas bioquímicas e *in vitro* sejam adequadas para uma seleção prévia de supostas drogas analgésicas, as últimas determinações de eficácia requerem a demonstração do alívio da dor em modelos experimentais com animais.

A avaliação da eficácia destas drogas, como analgésicos, requer que o animal experimental tenha uma dor patológica pré-existente ou que o pesquisador induza experimentalmente uma resposta dolorosa.

Vários componentes da resposta da dor podem ser usados na avaliação dos efeitos de uma droga potencialmente analgésica. Frequentemente, o componente mensurado é de fato ditado pela escolha do teste de analgesia utilizado. Indiferente do estímulo empregado ou da resposta mensurada, o pesquisador pode ser capaz de quantificar o seguinte:

1. **Limiar à dor:** é o ponto em que a dor é primeiramente sentida em experiência com estímulos de magnitude ascendente, ou na qual a dor desaparece em experiências com estímulos de magnitude descendente.
2. **Tolerância à dor:** é o ponto no qual o indivíduo sente que se deve retirar o estímulo nocivo. Ele é representado pelo limite de tolerância

máxima do paciente à dor. Este é também o limite superior da dor que pode ser eticamente utilizado em laboratório.

3. **Intensidade da dor:** resposta verbal ou gráfica da unidade experimental, caracterizada pela magnitude do estímulo adverso. Esta descrição pode ser absoluta, como uma escala numérica, ou descritiva, ou comparações com outros estímulos dolorosos ou não.

Historicamente, o estímulo térmico tem sido o mais freqüentemente usado que outros na indução de sensações dolorosas para quantificar o efeito analgésico de drogas ou tratamentos. Este estímulo de ocorrência natural pode ser rapidamente quantificado e facilmente aplicado. A estimulação térmica pode ser também aplicada com relativa freqüência sem o desenvolvimento de um grau proibitivo da adaptação comportamental ou dano fisiológico.

Nesta presente pesquisa, foi utilizado o teste da placa quente para se verificar a ação analgésica da planta *Heliotropium transalpinum*, onde encontramos na literatura somente o trabalho de SYKULSKA & JERPZMANOWSKA⁴⁰ (1964), que, estudando a planta *Cynoglossum officinale* da família Boraginaceae, obteve respostas analgésicas na referida planta, o que possivelmente pode vir reforçar os nossos achados.

Em nossa pesquisa, os resultados encontrados no teste da placa quente indicam que a dose testada de *Heliotropium transalpinum* de 1 g/kg de peso, foi efetiva na resposta analgésica, conforme mostra a tabela 7, os resultados da análise de variância (Teste F) demonstram que existe diferença na resposta analgésica, entre os grupos (controle e tratado) e entre os tempos do experimento.

É fácil ver, examinando as tabelas 8 e 9, que o grupo tratado permaneceu, em média, significativamente mais tempo na placa quente do que o grupo controle e que, decorridos 120 minutos após a administração de 1 g/kg de peso de *Heliotropium transalpinum*, os camundongos permanecem em média, mais tempo na placa quente do que no tempo zero, conforme mostra o gráfico nº 1.

Na análise de variância do tempo de permanência dos camundongos em placa quente, após administração de 2 g/kg de peso de *Heliotropium transalpinum*, os valores de F, mostram que existe diferença estatística entre os grupos tratado e controle e entre os tempos do experimento (tabela 13). A ação analgésica fica evidente, comparando-se as médias de tempo de permanência dos camundongos em placa quente dos grupos tratado e controle (tabela 14). É fácil ver, examinando as tabelas 14 e 15 que o grupo tratado permaneceu significativamente mais

tempo na placa quente do que o grupo controle e que, decorridos 30 minutos, após a administração do extrato de *H. transalpinum*, os camundongos permaneceram mais tempo na placa do que no tempo zero, o gráfico nº 2 evidencia bem estas afirmativas.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÃO

CAPÍTULO VII

CONCLUSÃO

Em vista dos resultados obtidos e dentro das condições em que foi realizada a presente pesquisa, pode-se concluir que:

1. A planta *Heliotropium transalpinum* apresenta a seguinte constituição química: ácidos graxos, cumarinas, taninos, compostos redutores (carboidratos), mucilagens, aminas quaternárias, alcalóides e saponinas
2. O EH de *H. transalpinum* potencializou a ação hipnótica do pentobarbital em camundongos.
3. O extrato hidroalcoólico de *H. transalpinum* aumentou o tempo de latência no teste específico de analgesia central, a placa quente, sendo este efeito dependente do tempo de administração do extrato e das doses utilizadas.

SUMMARY

SUMMARY

Heliotropium transalpinum is a vegetable species, which belongs to the Boraginaceae family and it is popularly known as 'bico de corvo' (crow's beak). It is a bush with white flowers and is found in Bolivia, Argentina, Paraguay and Brazil (from Bahia to Rio Grande do Sul).

A study was made of the analgesic properties of the hydroalcoholic extract (H.E.), as well as of the qualitative compositions of the *H. transalpinum*.

In specific tests, the H.E. has shown that in the dosage of 1 gram per kilogram, it has had an effect which increases the hypnotic action of the pentobarbital.

In the analgesia test (the hot plate), the results have shown that the H.E. has increased the latent period when the dosage of 1 gram per kilogram and 2 grams per kilogram were administered.

The analgesia was more effective 120 minutes after administration of 1 gram per kilogram of the H.E. In the test for the

dosage of 2 grams per kilogram, the analgesic effect was obtained 30 minutes after it had been administered.

On analysing the average time in which the mice stayed on the hot plate, when the dosages of 1 gram per kilogram and 2 grams per kilogram of H.E. were administered, we can conclude that the analgesic effect of the H.E. of the *Heliotropium transalpinum* depends on the dosages and the period of administration.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. BALBACH, A. *A flora Nacional na medicina doméstica*. 3.ed. São Paulo: A Edificação do lar, 1974. v.2, p.597-599
2. BERG, M.E.VAN DEN. *Plantas medicinais na Amazônia. contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Belém: CNPQ/PTU, 1982 p. 203-204.
3. BIREKA, H., FROHLICH, M. W., GLICKMAN, L.M. Aminoalcohol of pyrrolizidine alkaloids in *Heliotropium species*. Part 4. Free and*sterified necines in *Heliotropium species* from Mexico and Texas. *Phytochem.*, New York, v.22, n.5, p.1167-71, 1983.
4. BOPPRE, M. Lepdoptera and pyrrolizidine alkaloids. Exemplification of complexity in chemical ecology. *J.Chem. Ecol.*, New York, v.16, p.165-185, 1990.
5. BULHÕES, G. de C.C. *et al.* Abordagem fitoquímica de plantas nativas do Nordeste Brasileiro. Parte II. *An. Dep. Farm. Centro Ci. Saúde. Univ. Fed. Pernambuco*, Recife, v.15, p. 39-44, 1976.

* De acôrdo com a NBR-6023, de agosto de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos de conformidade com o "World List of Scientific Periodicals".

6. BUZZO, A. *Toxicologia: perícia toxicologica*. 3.ed. Buenos Aires: Aniceto Lopes, 1945 v.1, p. 257-263

7. CARLINI, E.A.. *Farmacologia prática sem aparelhagem*. São Paulo: Sarvier, 1973. 200p.

8. CATALFAMO, J. et al. Aminoalcohols of pyrrolizidine alkaloids in *Heliotropium species*. part 3. *Phytochem.*, New York, v.21, n.11, p.2677-82,

9. CIULEI, I. *Methodologie D"Analyse Des Produits Vegetaux*. Faculdade de Farmácia. Bucareste, 1982.

10. CLARK, A.J. *General pharmacology*. Vierter Band. Handbuck der experimentellen pharmakologie. Heffter, Berlim : Verlag & Springer, 1937.

11. CLOUET, D.H., TATNER, M. Catecholamine biosynthesis in brain rats treated with morphine. *Science*, v.168, p. 854-855, 1970. *Apud* CARLINI, E.A., *Op. cit.* Ref. 7

12. CONFREI a planta fantástica. *Rev. Planeta*, São Paulo, v.129C, jun., 1983.

13. CRAGG , G. M. *et al.* The taxol supply crisis : new NCI policies for handing the large- scale production of novel natural product anti cancer and anti- HIV agents. *J. nat. Prod.*, Pittsburgh, v.56, p.1657-1668, 1993.
14. CUNHA, S.E. *Terapêutica: apontamentos para cirurgiões dentistas e estudantes de odontologia.* 4.ed. Rio de Janeiro: Científica, 1955. p. 26-29.
15. EDDY, N. B. and LEIMBACH, D. Synthetic analgesics II. *J. Pharmac. exp. Ther.*, Baltimore, 107: 335 - 353, 1953. *Apud* CARLINI E.A. *Op. cit.* Ref. 7
16. _____, TOUCHBENY, C. F., LIBERMAN. I. E. Analgesics properties of methadose isomers and derivatives. *J. Pharmac. exp. Ther.*, Baltimore, v.98, p.121 - 137, 1950. *Apud* CARLINI E.A. *Op. Cit.* Ref. 7
17. EHRNEBO, M. Pharmacokinetics and distribution properties of pentobarbital in humans following oral and intravenous administration. *J. pharm. Sci.*, Washington, v.63, p.1114-18, 1974.
18. **GARRAFADA**; as plantas medicinais em projetos comunitários. São Paulo: Edições Paulinas, 1985. 46p.

19. HOUGHTON, P.J. The biological activity of valerian and related plants. *J. ethnopharmacol.*, Limerick, v.22, p.121 - 142, 1988.
20. HUIBERS, J. *O livro de ouro da Saúde: plantas medicinais*. São Paulo: Hemus, 1970. p. 21.
21. JANSSEN, P.A., JAGENEUX, A.H. A new series of potente analgesics. Part. I. Chemical structure and pharmacological activity. *J. phatm. Pharmac.*, v. 9, p.381-400, 1957. *Apud* CARLINI, E.A., *Op. cit.* Ref. 7
22. LAROZE, A., SILVA, J.A. da. Uma hipótese sobre o papel fisiológico dos alcalóides nas plantas. *Anais da Faculdade de Farmácia do Porto*, Portugal, v.7, p.???, 1947.
23. LIN, Y. C. et al. Search for biologically active substances in taiwan medicinal Plants. *Chin. J. Microbiol.*, Taiwan, v.5, n.1/2, p.76-81.,1972.
24. LOOMIS, T.A. *Fundamentos de toxicologia*. Zaragoza : Acriba, 19??, p.35
25. MALONE , M.H., ROBICHAUD, R.C. A hipocratic screening for pure or crude drug materials. *Lloydia*, Pittsburgh, v.25, p.320-332, 1962.

26. MC CAIN, H.W. Quantitating antinociception with experimentally induced pain. *Dent. Clin. N. Am.*, v. 31, n.4, p. 563-578, 1987.

27. MCLEAN, E. K.- The toxic actions of pirrolizidine (Senecio) alkaloids. *Pharmac. Rev.*, Baltimore, v. 22, n.4, p. 429- 483, 1970.

28. MIRALLES, J. , NOBA, K., BASSINE, E. Chemotaxonomy of the *Boraginaceae*, acid and sterol composition of leaves of some species of *Cordia* and *Heliotropium*. *Herb a Hung.*, Budakalasz, v.28, n.1/2, p. 7-11, 1989.

29. PEREIRA, A.P.B. *et al.* Efeito da yangambina na contração do jejuno isolado de rato: influencia na resposta anafilática. *In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 9, 1994, Caxambu. Anais.* Minas Gerais: FESBE, 1994. p.193

30. PHILIPSON, J.D. *et al.* Tropical plants as sources of antiprotozoal agents. *In: DOWNUM, K.R., ROMEO, J.T., STAFFORD, H.A., eds. (titulo?). New York: Plenum, 1993. p.1-40*

31. PRADO, F., RAMOS, J.A., VALLE, J.R. *Atualização terapêutica.* 9.ed. São Paulo : Artes Médicas, 1973 p. 969-1010

32. RISK, A. M., KAMEL, A. Toxicity, carcinogenicity, pharmacology, and other biological activities of pyrrolizidine alkaloids. *In: _____* ed. *Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids*. Boca Raton: CRC Press, 1990.
33. ROITMAN, J.N. Confrei and liver damage. *Lancet*, London, v.1, p. 944, 1981.
34. SCHOENTAL, R., CAVANAGH, J. B. Brain and spinal cord tumors in rats treated with pyrrolizidine alkaloids. *J. natn. Cancer Inst.*, Washington, v.49, n.3, p. 665-671, 1973.
35. _____, HARD, C.C., GIBBARD, S. Histopathology of renal lipomatous tumors in rats treated with the natural products, pyrrolizidine alkaloids and unsaturated aldehydes. *J.natn. Cancer Inst.*, Washington, v.47, n.5, p.1037-1044, 1971.
36. SHAN-TIN-ZAN, G. L. Reproduction of chronic affections of the liver in dogs fed with seeds of *Heliotropium*. *Patol Fisiol. eksp. Terap.*, Moskva, v. 14, n.16, p. 41- 45 1971.
37. SMITH, L. - *Boraginaceas* - Flora Ilustrada Catarinense, 1 parte, fasc.Bora, 1970. *Apud* SOARES, Z.F., *Op. cit.* Ref. 41.

38. SOARES, Z.F. Nota sobre as boraginaceas da região de Porto Alegre e arredores. *Iheringia Botânica*, Porto Alegre, n.17, p. 28-33, julho, 1973.
39. SULLMANN, S.F., ZUCKERMAN, A.J. The effect of heliotrine, a pyrrolizidine alkalóide, on human liver cells in culture. *Br. J. exp. Path.*, London, v.50, n.4, p. 361-370. Aug. 1969.
40. SYKULSKA, Z., JERZMANOWSKA, Z. The alkaloids of *Cinoglossum officinale* L. Part I e II. *Pharm. Abstr.* (cidade), 1964 (abstract 1207 e 1389)
41. TEIXEIRA, L.G.M. et al. Efeitos da fração purificada da *Wilbrandia verticillata* na lesão granulomatosa induzida pelo óleo de cróton em ratos. *In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTA*, 9, Caxambu, 1994. Minas Gerais: FSBE, 1994. p.193
42. TETENYI, P. Chemotaxonomic data on Boraginaceae. *Acta bot. Acad. Sci.*, v.20, n. 1/2, p. 159-167, 1974.
43. TRIGO, J.R. et al. Pyrrolizidine Alkaloids in the arctiid moth. *Journal of chemical ecology*, v. 19, n.4, p.669-679, 1993.

44. WESTENDORF, J. Pyrrolizidine alkalóids: General discussion. *In*: De SMET, P.A.G.M. *et al* eds. - *Adverse effects of herbal drugs I*. Berlin: Springer- Verlag, 1992.
45. WODAK, S. J. The cristal structure of heliotrine. *Acta crystallogr. Sect B*, Cambridge, v.31, n.2, p.569-573, 1975.
46. WOLFF, G., MCDONALD, A.D. The evaluation of analgesic effect of phetidine hydrochloride. *J. Pharm.*, v. 80, p.300, 1944.
47. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Pyrrolizidine alkalóids*. Geneva: WHO, 1988. 348p. (Enviromental Health Critéria, 80).
48. ZANINI, A. C., OGA, S. *Farmacologia aplicada*. 3.ed. São Paulo : Atheneu, 1985. p.274-280.