

SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE SIMILAR À VITAMINA D₃ EM QUATRO PLANTAS CALCINOGENICAS¹

JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO² e GERHARD HABERMEHL³

ABSTRACT.- Mello J.R.B. & Habermehl G. 1995. [Vitamin D₃-like activity in four calcinogenic plants.] Substâncias com atividade similar à vitamina D₃ em quatro plantas calcinogênicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 15(2/3):73-78. Depto Farmacologia, Instituto de Bociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

The presence of elements with vitamin D-like activity in the calcinogenic plants *Solanum malacoxylon* (Solanaceae), *Cestrum diurnum* (Solanaceae), *Trisetum flavescens* (Gramineae) and *Nierembergia veitchii* (Solanaceae) were evaluated by testing different extracts of these plants by oral administration to rachitic chicks fed with a diet free of vitamin D. After administration of the extracts the blood serum was analysed to determine the levels of calcium, phosphorus and alkaline phosphatase. The experimental results clearly demonstrated the presence of substances with vitamin D-like activity in the four plants. *S. malacoxylon* and *C. diurnum* contained hydrosoluble substances with high vitamin D-like activity indicated by significant high levels of calcium and phosphorus combined with reduced activity of the alkaline phosphatase. The experiments also showed that there might be a further substance with liposoluble characteristics in both plants. *N. veitchii* and *T. flavescens* contained only minor concentrations of lipo and hydrosoluble substances with vitamin D-like activity.

INDEX TERMS: Calcinogenic plants, enzootic calcinosis, plant poisoning.

SINOPSE.- Este trabalho avalia a presença de substâncias com atividade similar à vitamina D nas plantas calcinogênicas *Solanum malacoxylon*, *Cestrum diurnum*, *Trisetum flavescens* e *Nierembergia veitchii*. Diferentes extratos das plantas foram administrados por via oral a pintos raquíticos alimentados com ração livre de vitamina D. Após a administração oral dos extratos, o soro sanguíneo foi analisado para determinar os níveis de cálcio, fósforo e de fosfatase alcalina. Foram constatadas substâncias com atividade vitamina D nas quatro plantas. Pela administração de *S. malacoxylon* e *C. diurnum* mostraram-se a presença de substância hidrossolúvel, com potente atividade, indicada pelos aumentos significativos de cálcio e fósforo, e pela redução da atividade da fosfatase alcalina. Os experimentos indicaram também que substâncias lipossolúveis estão presentes em ambas as plantas. Pequenas concentrações de substâncias com atividade semelhante à vitamina D com características lipo e hidrossolúveis foram constatadas em *N. veitchii* e *T. flavescens*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas calcinogênicas, calcinose enzoótica, intoxicações por plantas.

INTRODUÇÃO

A calcinose enzoótica é uma doença observada em diversos lugares do mundo, atingindo diferentes espécies animais. Na Austria, Alemanha e Suíça *Trisetum flavescens* (Gramineae) tem sido apontado como causador da doença em bovinos (Dirksen et al. 1973a, Libiseller et al. 1976). Nos Estados Unidos *Cestrum diurnum* (Solanaceae) é responsável pela calcinose enzoótica em equinos e bovinos (Krook et al. 1975a,b). Na Argentina e Brasil *Solanum malacoxylon* (Solanaceae) provoca o quadro tóxico em bovinos e ovinos (Worker & Carrillo 1967, Döbereiner et al. 1971). Observações mais recentes indicam *Nierembergia veitchii* (Solanaceae) como calcinogênica para ovinos no Rio Grande do Sul (Riet-Correa et al. 1981).

Os principais sinais clínicos da doença caracterizam-se por emagrecimento progressivo, dificuldade de locomoção, decúbito prolongado, cifose e engrossamento de articulações. Como achados anátomo-patológicos observa-se deposição de cálcio na parede de vasos, tendões e outros tecidos moles, semelhante à observada na hipervitaminose D. As concentrações de Ca e P no sangue sofrem marcadas alterações (Libiseller & Gunhold 1968, Dirksen et al. 1970, 1971a, Döbereiner et al. 1971, Tokarnia & Döbereiner 1974, Dämmrich et al. 1975).

Solanum malacoxylon, *Cestrum diurnum*, *Trisetum flavescens* e *Nierembergia veitchii* desencadeiam a doença quando administrados experimentalmente a ratos, coelhos,

¹Aceito para publicação em 21 de março de 1995.

Este trabalho é parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, aprovada pela Tierärztliche Hochschule Hannover, Alemanha.

²Departamento de Farmacologia, Instituto de Bociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS 90050-170; bolsista do CNPq (350507/94-5).

³Chemisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-3000 Hannover, Alemanha.

pintos, ovinos, caprinos, bovinos e outras espécies animais (Barros et al. 1970, Dirksen et al. 1970, 1971b, Sanson et al. 1971, Dämmrich et al. 1975, Wasserman 1978, Riet-Correa et al. 1981).

A vitamina D₃ e seus metabólitos tem sido isolados das plantas calcinogênicas. Os estudos efetuados até o momento tem avaliado as plantas individualmente, muitas vezes com modelos experimentais e parâmetros diferentes (Corradino & Wasserman 1974, Wasserman 1974, Riet-Correa et al. 1981, Rambeck et al. 1984b, Tröger 1984). Os resultados mostram concentrações variáveis, e muitas vezes conflitantes, de vitamina D₃ e seus metabólitos para as plantas estudadas (Wasserman 1974, Riet-Correa et al. 1981, Zucker & Rambeck 1981, Rambeck et al. 1984b).

Utilizando-se como modelo experimental o pinto raquítico, e avaliando-se as concentrações séricas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, o presente trabalho teve como objetivos: 1) comparar os efeitos de diferentes extratos das quatro plantas, preparados da mesma forma; 2) comparar as atividades dos extratos com as da vitamina D₃ e 3) avaliar qualitativamente a presença de substância com atividade similar à vitamina D₃ nas quatro plantas estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram utilizados pintos machos Leghorn, de um dia, marcados individualmente com anel, pesados e divididos aleatoriamente em grupos de 5 animais por gaiola. As gaiolas eram mantidas em sala climatizada, com temperatura inicial de 36°C, obedecendo uma redução de 2°C por semana.

Alimentação

Em relação à alimentação foram utilizados dois tipos de protocolo:

a) alimentação livre de vitamina D - os animais eram mantidos por 30 dias com ração inicial em forma de farinha, livre de vitamina D (ração A) (Firma SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemanha);

b) alimentação controle - os animais eram mantidos por 30 dias com a ração inicial para pintos em forma de farinha (ração B) (Firma SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemanha). Água ad libitum.

Os animais mantidos com a ração A recebiam os extratos das plantas pesquisadas e a vitamina D₃ por sonda gástrica no 28º e 29º dias do experimento, após 12 horas de jejum prévio. Doze horas após cada administração de extratos e substância padrão, sangue era coletado da veia braquial para determinação de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina.

Coleta das amostras de sangue e determinações séricas

Para análise sérica foram coletados de 2 a 3 ml de sangue em tubos de ensaio, que então era centrifugado (15 min a 3000 rpm), e o soro sanguíneo analisado fotometricamente quanto ao cálcio, fósforo e fosfatase alcalina.

Para a determinação do cálcio foi utilizado o Teste Combinação "Calcium (Nr. 204382), Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica".

Para a determinação do fósforo foi utilizado o Teste Enzimático "Farb-Test PHOS (Nr. 850775), Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica".

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada por meio do teste "Monotests-Alkalische Phosphatase opt. (Nr. 158138), Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica".

Fonte das plantas utilizadas

Solanum malacoxylon foi colhido na região de Pelotas (RS) durante o verão 1988/89.

Nierembergia veitchii foi colhida nos municípios de Santa Maria, São Sepé, Piratini e Pinheiro Machado (RS) durante a primavera-verão de 1988.

Cestrum diurnum foi colhido na Flórida (USA) em 1979.

Trisetum flavescens foi colhido na região de Regensburg (Alemanha) durante a primavera de 1989.

Extratos

O extrato aquoso das quatro plantas foi obtido a partir de 30 g de planta seca e moída, misturadas a 400 ml de água destilada e mantidas por 12 horas sob agitação. Durante este período a mistura era mantida resfriada e protegida da luz. Este processo era repetido 3 a 4 vezes até a perda da coloração do material vegetal. Os extratos eram então filtrados e liofilizados. Os extratos liofilizados eram pesados e armazenados sob refrigeração até o momento de sua utilização, quando eram novamente misturados em água destilada e administrados por sonda gástrica aos animais.

O extrato etéreo foi obtido a partir de 30 g de planta seca e moída, misturadas mediante agitador a 400 ml de éter destilado de petróleo por 12 horas, protegidas da luz e resfriadas. Este procedimento foi repetido 3 a 4 vezes até a perda da coloração do material vegetal. Os extratos eram filtrados e evaporados em rotavapor. Após a evaporação do éter, os extratos eram pesados e armazenados sob refrigeração até o momento de sua utilização, quando eram misturados em veículo oleoso (Miglioli®), e administrados por sonda gástrica aos animais.

Após o processo de extração com água e éter, o material vegetal seco a temperatura ambiente, sob proteção da luz, era considerado como sobrenadante do extrato e administrado na forma de alimento a grupos experimentais. Desta forma, grupos de cinco animais recebiam o material seco das 30 g de planta extraídas com água ou éter como fonte única de alimentação no 28º e 29º dias de experimento, após 12 horas de jejum prévio.

Substância padrão testada

Para a realização de análise qualitativo-quantitativa, foi testada a vitamina D₃ da Firma Hoffmann-La Roche, Basel, (Suíça). Esta substância foi testada no modelo de pintos raquíticos alimentados com ração livre de vitamina D nas doses de 0,1, 0,2 e 0,4 µg/animal/dia.

Além destes, foram constituídos dois grupos: um controle "saudável", que recebia ração inicial para pintos sob forma de farinha durante todo seu desenvolvimento e, um controle "raquítico" que recebia alimentação livre de vitamina D.

Análise estatística

Os resultados são apresentados por médias (x) e seus respectivos desvios padrão(s), com n = 5 para cada um dos grupos. A análise estatística foi realizada por intermédio do teste de análise de variância segundo Snedecor & Cochran (1967).

Para as representações gráficas foram realizadas análises de regressão a reta (r).

Os resultados de cálcio e fósforo de cada um dos grupos pesquisados foram representados pela média entre o 1º e 2º dias de coleta de sangue. Para a atividade da fosfatase alcalina, foi avaliada a variação entre o 1º e o 2º dias de coleta de sangue, considerando-se o 1º dia como 100%.

RESULTADOS

Solanum malacoxylon. Os extratos de *S. malacoxylon* não alteraram a concentração sérica de fósforo, mas reduziram significativamente a atividade da fosfatase alcalina. A concentração de cálcio só foi alterada pelo extrato aquoso. Os animais mantidos com ração livre de vitamina D não mostraram diferenças nos parâmetros avaliados dos pintos alimentados com ração normal. (Quadro 1)

Cestrum diurnum. Os quatro extratos de *C. diurnum* aumentaram significativamente os níveis de cálcio, quando comparados com os grupos controle “saúdável” e controle “raquitico”. O maior aumento foi obtido com o extrato aquoso, seguido do etéreo, sobrenadante do etéreo e sobrenadante do aquoso. Somente o extrato aquoso de *C. diurnum* proporcionou aumento de fósforo e redução da fosfatase alcalina de forma significativa, quando comparados com o controle “raquitico”. Com os demais extratos não houve diferença significativa em relação ao controle “raquitico” nem controle “saúdável”. (Quadro 1)

Trisetum flavescens. A concentração de cálcio só foi alterada pelo sobrenadante do extrato aquoso de *T. flavescens*. O extrato aquoso foi o único que reduziu significativamente a atividade da fosfatase alcalina. Todos os extratos elevaram significativamente os níveis de fósforo, quando comparados com o controle “raquitico”. (Quadro 1)

Nierembergia veitchii. Os extratos de *N. veitchii* não alteraram a atividade da fosfatase alcalina, enquanto que somente o sobrenadante do extrato etéreo elevou significativamente o fósforo sérico. Todos os extratos elevaram significativamente os níveis de cálcio, quando comparados com a controle “raquitico”. (Quadro 1)

Os resultados obtidos com doses crescentes de vitamina D₃ (0,1, 0,2 e 0,4 µg/kg/dia) sobre o cálcio, fósforo e fosfatase alcalina estão representados no Quadro 2. Houve aumento de Ca e P e redução da atividade da fosfatase alcalina, mas somente os valores obtidos com o cálcio mostraram significância na análise de regressão à reta (r = 0,6786), obedecendo uma relação dose-efeito.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Parâmetros pesquisados

Dos três parâmetros estudados, o cálcio sérico foi o que se mostrou o melhor para avaliar a presença de substâncias com atividade similar à vitamina D nas plantas calcinogênicas, utilizando o modelo de pintos raquiticos alimentados com ração livre de vitamina D. Esta mesma conclusão já havia sido feita por alguns autores pesqui-

Quadro 1. Concentrações séricas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina em pintos raquiticos tratados com extratos de cada uma das quatro plantas calcinogênicas no 28º e 29º dias por via oral e seus respectivos controles

Tratamento	Cálcio (mg/dl)	Fósforo (mg/dl)	Fosfatase alcalina (%)
<i>Solanum malacoxylon</i> Extrato aquoso	13,47 ^b ± 0,32 ⁺	8,28 ^a ± 1,00	29,15 ^b ± 9,13
Sobrenadante aquoso	10,80 ^a ± 0,30	8,02 ^a ± 0,32	43,16 ^b ± 17,07
Extrato etéreo	10,76 ^a ± 0,70	7,13 ^a ± 0,28	36,13 ^b ± 12,52
Sobrenadante etéreo	11,05 ^a ± 0,45	7,84 ^a ± 0,63	31,80 ^b ± 7,59
Controle “saúdável”	10,14 ^a ± 0,24	7,26 ^a ± 0,52	99,30 ^a ± 7,35
Controle “raquitico”	9,77 ^a ± 0,23	6,48 ^a ± 0,63	108,42 ^a ± 11,67
<i>Cestrum diurnum</i> Extrato aquoso	13,30 ^a ± 0,92 ⁺	8,74 ^b ± 0,99	77,86 ^{ac} ± 6,53
Sobrenadante aquoso	11,75 ^b ± 0,55	7,89 ^{ab} ± 0,66	76,05 ^{ac} ± 12,92
Extrato etéreo	12,06 ^{ab} ± 0,63	7,70 ^{ab} ± 0,79	86,04 ^{bc} ± 10,31
Sobrenadante etéreo	11,91 ^b ± 0,65	8,16 ^{ab} ± 0,99	88,06 ^{bc} ± 14,87
Controle “saúdável”	10,14 ^c ± 0,24	7,26 ^{ab} ± 0,52	99,30 ^{ab} ± 7,35
Controle “raquitico”	9,77 ^c ± 0,23	6,48 ^a ± 0,63	108,42 ^b ± 11,67
<i>Trisetum flavescens</i> Extrato aquoso	10,96 ^{ab} ± 0,35 ⁺	8,92 ^b ± 1,07	74,80 ^b ± 15,95
Sobrenadante aquoso	11,30 ^b ± 0,78	8,92 ^b ± 0,55	109,74 ^a ± 7,32
Extrato etéreo	10,73 ^{ab} ± 0,75	9,09 ^b ± 0,32	93,72 ^a ± 17,86
Sobrenadante etéreo	10,86 ^{ab} ± 1,04	8,82 ^b ± 0,20	100,74 ^a ± 5,28
Controle “saúdável”	10,14 ^{ab} ± 0,24	7,26 ^{ab} ± 0,52	99,30 ^{ab} ± 7,35
Controle “raquitico”	9,77 ^a ± 0,23	6,48 ^a ± 0,63	108,42 ^a ± 11,67
<i>Nierembergia veitchii</i> Extrato aquoso	12,27 ^a ± 0,43 ⁺	8,36 ^{ab} ± 1,29	88,83 ^a ± 10,13
Sobrenadante aquoso	11,74 ^a ± 0,38	7,63 ^{ab} ± 1,12	84,54 ^a ± 10,01
Extrato etéreo	11,53 ^a ± 0,89	7,82 ^{ab} ± 0,83	98,96 ^a ± 9,81
Sobrenadante etéreo	11,33 ^{ab} ± 0,29	8,70 ^b ± 1,13	87,21 ^a ± 22,08
Controle “saúdável”	10,14 ^{bc} ± 0,24	7,26 ^{ab} ± 0,52	99,30 ^a ± 7,35
Controle “raquitico”	9,77 ^c ± 0,23	6,48 ^a ± 0,63	108,42 ^a ± 11,67

* Médias ± desvio padrão de 5 animais por grupo. Médias com diferentes letras dentro da mesma coluna diferem significativamente (p<0,05).

sando plantas calcinogênicas, mas avaliando a produção de proteína transportadora de cálcio (CaBP) na mucosa intestinal de pintos (Corradino & Wasserman 1974, Rambeck & Zucker 1977, Wasserman 1978, Rambeck et al. 1986). Sabe-se que a absorção intestinal de cálcio é dependente de vitamina D (Bar & Wasserman 1974).

Quadro 2. Concentrações séricas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina em pintos raquíticos alimentados com ração livre de vitamina D, após a administração por via oral de três dosagens de vitamina D no 28º e 29º dias

Parâmetro	Vitamina D ₃ µg/kg/dia		0,1		0,2		0,4	
	x	s	x	s	x	s	x	s
Cálcio (mg/dl)	10,13 ± 1,32 ⁺		10,50 ± 0,18		10,79 ± 0,80			
Fósforo (mg/dl)	4,66 ± 0,60		5,28 ± 0,88		5,09 ± 1,00			
Fosfatase alcalina (%) ⁺⁺	98,51 ± 10,32		99,03 ± 13,60		88,04 ± 11,42			

⁺ Médias ± desvio padrão de 5 animais por grupo.

⁺⁺ Para o cálculo da fosfatase alcalina foi considerada a variação percentual de sua atividade entre 1º e 2º dias de coleta de sangue, considerando o 1º igual a 100%. Para os demais parâmetros, o valor obtido representa a média das duas coletas.

Além de aumentar a absorção intestinal de cálcio, a vitamina D aumenta a reabsorção óssea, com o objetivo de regular a concentração sanguínea deste íon (Bar & Wasserman 1974). Portanto os aumentos da concentração sanguínea de cálcio com os extratos testados ocorreram em virtude deste duplo efeito das substâncias com ação similar à vitamina D existentes nas plantas.

A existência de uma relação tipo dose-efeito para as três doses de vitamina D₃ sobre a calcemia possibilita uma avaliação qualitativa e quantitativa da presença desta substância ativa nas plantas calcinogênicas.

Embora tenha sido observado um aumento do fósforo sanguíneo com a vitamina D₃ e com os extratos testados, não houve uma relação dose-efeito. Deve-se salientar que os níveis de fósforo sanguíneo, além de regulação direta via parathormônio e CaBP, são também regulados de forma indireta pelas modificações primárias de cálcio (De Luca 1979). A complexidade do controle fisiológico da hipofosfatemia pode ser a causa dos resultados obtidos. Os resultados do fósforo devem ser considerados como complementares aos obtidos com o cálcio. Eles permitem somente uma avaliação qualitativa de substâncias com atividade similar à vitamina D nas plantas calcinogênicas.

Houve uma tendência de redução da atividade de fosfatase alcalina com a utilização de doses de vitamina D₃ no modelo de pintos raquíticos. Estes efeitos já tinham sido registrados anteriormente (Santos et al. 1976, Unshelm & Flock 1967). Estes autores registram que a redução da atividade da enzima em pintos raquíticos é um indicativo de que a dosagem da vitamina D₃ ou seus metabólitos está apropriada. Não houve o estabelecimento de resposta do tipo dose-efeito com a avaliação de atividade da fosfatase alcalina. Como já havia ocorrido com o fósforo, os valores obtidos com a fosfatase alcalina permitem somente uma avaliação qualitativa da presença de substâncias com atividade similar à vitamina D.

Substância com atividade similar à vitamina D

A análise dos resultados no modelo de pintos raquíticos alimentados com ração livre de vitamina D mostrou sensibilidade suficiente para a constatação de substância com atividade similar à vitamina D nas quatro plantas calcinogênicas estudadas. O modelo não discrimina uma substância especificamente, e sim o grupo como um todo (vitamina D₃, 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃ ou outro dos metabólitos da vitamina D). O mesmo foi possível com a própria vitamina D₃.

Além disso possibilitou a identificação da característica química do princípio ativo das plantas calcinogênicas (hidrossolúvel e/ou lipossolúvel).

S. malacoxylon e *C. diurnum* mostraram a presença de substâncias com características hidrossolúveis, que aumentaram significativamente o Ca e P séricos, e reduziram a atividade da fosfatase alcalina. Resultados semelhantes foram observados por vários autores, utilizando diferentes modelos biológicos, que indicaram a presença do metabólito 1,25(OH)₂D₃ ligado a um glicosídeo nas duas plantas (Wasserman 1974, 1975, Krook et al. 1975b, Boland et al. 1876, Boland 1986). Além da presença de substância com atividade vitamina D, com característica hidrossolúvel nestas duas plantas (extrato aquoso e sobrenadante do extrato etéreo positivos), houve também aumento de Ca e P, com redução da atividade da fosfatase alcalina com o extrato etéreo de *C. diurnum*, e com o sobrenadante do extrato aquoso de *S. malacoxylon*. Estes resultados sugerem a presença de substância lipossolúvel com atividade similar à vitamina D nas plantas.

Todos os extratos de *T. flavescens* e *N. veitchii* testados nos pintos alimentados com ração livre de vitamina D produziram aumento do nível sanguíneo de Ca e P, e reduziram a atividade da fosfatase alcalina. As elevações séricas de Ca e P, e as reduções da atividade da fosfatase alcalina, entretanto, foram muito inferiores aos obtidos

com *S. malacoxylon* e com *C. diurnum*. Desta forma, a toxicidade de *T. flavescens* e *N. veitchii* só pode ser explicada pela presença de substâncias com diferentes características de solubilidade (hidro e lipossolúvel). Além disso, pelos resultados obtidos pode-se inferir que, embora presentes, as substâncias com atividade similar à vitamina D são bastante reduzidas nas duas plantas. Estudos de Dirksen et al. (1972, 1973a,b, 1974), Zucker & Rambeck (1981), Rambeck & Zucker (1982 a,b, 1986), Rambeck et al. (1984 a,b) confirmam a presença de vitamina D (lipossolúvel) e 1,25 (OH)₂D₃ + glicosídeo (hidrossolúvel) em *T. flavescens*. Em *N. veitchii*, Riet-Correa et al. (1987) registraram a presença de pequenas concentrações de 1,25 (OH)₂D₃ + glicosídeo, sem todavia mencionar a presença de substância lipossolúvel.

Mello (1991) testando os extratos aquosos e etéreos das quatro plantas calcinogênicas em coelhos mostrou que, tanto o extrato aquoso de *S. malacoxylon* quanto o de *C. diurnum*, produziram marcada calcificação de tecidos moles (vasos sanguíneos, rins, paredes gástricas, coração). Estes resultados confirmam a presença de substância com atividade vitamina D e característica hidrossolúvel em ambas as plantas.

Com a dose utilizada (30 mg/kg, 4 vezes por semana, durante duas semanas) os extratos de *T. flavescens* e de *N. veitchii* não produziram alteração alguma (Mello 1991). É possível que dosagens maiores e/ou por períodos mais prolongados produzam sintomas de calcinose enzoótica nos coelhos. Dirksen et al. (1973b) conseguiram reproduzir a doença em coelhos com doses de 300 a 400 g de *T. flavescens* por dia, durante 3 a 4 semanas de tratamento. Com *N. veitchii* foi necessário uma dieta contendo 50% da planta para produzir sintomas de calcinose em coelhos (Riet-Correa et al. 1981).

Outra possibilidade para justificar os efeitos tóxicos de *T. flavescens* e *N. veitchii*, é que eles sejam produzidos pela ação conjunta de princípio ativo hidro e lipossolúvel, uma vez que uma pequena concentração de ambos parece estar presente nas duas plantas. Tröger (1984) e Rambeck & Zucker (1985) mostraram um efeito sinérgico de 24,25 (OH)₂D₃ e 1,25(OH)₂D₃ no aumento da produção de CaBP na mucosa intestinal de pintos raquíticos. O efeito conjunto foi maior do que a soma dos efeitos individualmente. Este tipo de sinergismo pode estar presente em *T. flavescens* e em *N. veitchii*.

O modelo de pintos raquíticos produzidos pela alimentação contínua (30 dias) de ração livre de vitamina D proporciona um modelo biológico útil para a constatação da presença de substâncias com atividade calcinogênica em extratos de plantas.

Neste modelo, as elevações séricas de Ca e P, e a redução da atividade da fosfatase alcalina mostraram-se sensíveis à presença de substâncias com atividade vitamina D nos extratos, mas os valores de cálcio foram os mais precisos, possibilitando a realização de curva tipo dose-efeito.

O limitante do método reside no fato de que ele não propicia a discriminação específica das substâncias com

atividade vitamina D nas plantas. É possível obter resultado positivo (elevação de Ca e P, e redução da atividade da fosfatase alcalina) com qualquer substância do grupo (vitamina D₃; 25(OH)D₃; 1,25(OH)₂D₃; 24,25(OH)₂D₃).

Agradecimentos. - Os autores agradecem o suporte financeiro às agências DAAD, CNPq, FAPERGS e PROPESP/UFRGS. Agradecimento especial aos senhores Wilhelm Edler, Stefan Meyer e ao Prof. Dr. Augusto Langeloh, cuja colaboração foi fundamental na execução deste trabalho. Os autores agradecem ainda os Professores: Dr. Severo de Barros (UFSM) pelo auxílio na coleta de *S. malacoxylon* e *N. veitchii*, Dr. Robert Wasserman (Cornell University, USA) pelo envio de *C. diurnum*, Dr. M. Schmieder (Saatzucht Steinach GmbH, Alemanha) pelo envio de *T. flavescens*, Dr. Keiser e Dr. Fischer (Firma Hoffmann-La Roche, Suíça) pelo fornecimento de vitamina D.

REFERÊNCIAS

- Bar A. & Wasserman R.H. 1974. Duodenal calcium binding protein in chick: A new bioassay for Vitamin D. J. Nutr. 104:1202-1207.
- Barros S.S., Pohlenz J. & Santiago C. 1970. Zur Kalzinose beim Schaf. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77:346-349.
- Boland R.L. 1986. Plants as a source of Vitamin D₃ metabolites. Nutr. Rev. 44:1-8.
- Boland A.R., Skliar M.I., Boland R.L., Carrillo B.J. & Ruksan B.A. 1976. A method for the isolation of the active principle of *Solanum malacoxylon*. Anal. Biochem. 75:308-313.
- Corradino R.A. & Wasserman R. 1974. 1,25-dihydroxycholecalciferol-like activity of *Solanum malacoxylon* extract on calcium transport. Nature 252:716-718.
- Dämmrich K., Döbereiner J., Done S.H. & Tokarnia C.H. 1975. Skeletveränderungen nach Vergiftungen mit *Solanum malacoxylon* bei Rindern. Zentralbl. Veterinärmed. A 22:313-329.
- De Luca H.F. 1979. The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. Nutr. Rev. 37:161-193.
- Dirksen G., Plank P., Spiess A., Hänichen T. & Dämmrich K. 1970. Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind. 1. Klinische Beobachtungen und Untersuchungen. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77:321-338.
- Dirksen G., Plank P., Dämmrich K. & Hänichen T. 1971a. Das klinische und pathologisch-anatomische Bild einer enzootischen Kalzinose beim Rind. Vet. Med. Nachr. (Bayer):199-214.
- Dirksen G., Plank P., Dämmrich K., Hänichen T. & Spiess A. 1971b. Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind. 4. Untersuchungen an Schafen mit selektiver Verfütterung von Klee, Gräsern oder Kräutern. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 78:9-12.
- Dirksen G., Plank P., Hänichen T. & Spiess A. 1972. Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind. 5. Experimentelle Untersuchungen an Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knollgras (*Dactylis glomerata*), Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und einem Gräsergemisch. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79:77-79.
- Dirksen G., Plank P., Hänichen T. & Spiess A. 1973a. Die enzootische Kalzinose - eine neue Weidekrankheit des Rindes. Tierzüchter 25:150-152.
- Dirksen G., Plank P., Hänichen T. & Spiess A. 1973b. Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind. 6. Experimentelle Kalzinose beim Kaninchen durch selektive Verfütterung von Goldhafer (*Trisetum flavescens*). Dtsch. Tierärztl. Wschr. 80:148-152.
- Dirksen G., Plank P., Simon U., Hänichen T., Daniel P. & Spiess A. 1974. Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind. 7. Nachweis der kalzinogenen Wirkung von Goldhafer (*Trisetum flavescens*) beim Wiederkäuer. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 81:1-5.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Costa C.B.D., Campos J.L.E. & Dayrell M.S. 1971. "Espichamento", intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon* no Pantanal do Mato Grosso. Pesq. Agropec. Bras., Ser. Vet. 6:91-117.

- Krook L., Wasserman R.H., McEntree K., Brokken T.D. & Teigland M.D. 1975a. *Cestrum diurnum* poisoning in Florida cattle. *Cornell Vet.* 65:557-575.
- Krook L., Wasserman R.H., Shiverly J.N., Tashjian A.H., Brokken T.D. & Morton J.F. 1975b. Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: Implication of the shrub *Cestrum diurnum*, as the causative agent. *Cornell Vet.* 65:26-56.
- Libiseller R. & Gunhold P. 1968. Calcinosen bei Kühen. *Naturwissenschaften* 56:39.
- Libiseller R., Glawischnig E., Köhler H. & Swoboda R. 1976. Zur Kalzinose der Rinder in österreich. III. Experimentelle Auslösung einer Kalzinose bei Schafen und Kaninchen durch grünen Goldhafer (*Trisetum flavescens*) aus dem pannonischen Klimagebiet. *Zentralbl. Veterinärmed. A* 23:1-30.
- Mello J.R.B. 1991. Untersuchungen der Auswirkungen von kalzinogenen Pflanzen auf die Elemente Ca, P und alkalische Phosphatase bei Hühnerküken. Diss., Tierärztl. Hochschule Hannover.
- Rambeck W.A. & Zucker H. 1977. Isolierung eines Vitamin D-ähnlichen Steroids mit Hilfe der HPLC, p. 126-134. In: Königsteiner, Chromatographie-Tage, Königstein.
- Rambeck W.A. & Zucker H. 1982a. Isolation and characterization of a Vitamin D₃ compound from a plant by liquid chromatography. *Chromatogr. Sci.* 20:319-326.
- Rambeck W.A. & Zucker H. 1982b. Vitamin D-artige Aktivitäten in kalzinogenen Pflanzen. *Zentralbl. Veterinärmed. A* 29:289-296.
- Rambeck W.A. & Zucker H. 1985. Synergistic effects of 1,25(OH)₂D₃ and 24,25 (OH)₂D₃ on duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight in Japanese quails. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 126:799-804.
- Rambeck W.A. & Zucker H. 1986. Vitamin D-Metabolite als Ursache der durch Goldhafer ausgelösten Rinder-Kalzinose. *Übers. Tierernährung* 14:179-198.
- Rambeck W.A., Weiser H. & Zucker H. 1984a. Biological activity of glycosides of Vitamin D₃ and 1a-Hydroxyvitamin D₃. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 54:25-34.
- Rambeck W.A., Weiser H. & Zucker H. 1984b. Biological activity of 1a-25-Dihydroxyergocalciferol in rachitic chicks and in rats. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 54:135-139.
- Rambeck W.A., Weiser H. & Zucker H. 1986. Antirachitische Aktivität von Glukosiden des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und des 1a-Hydroxyvitamin D₃ beim Hühnerküken. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 73:169-171.
- Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L., Santos E.C. & Scarsi R.M. 1981. Experimentos em coelhos sugerem *Nierembergia veitchii* como causa de calcinose enzoótica em ovinos do Rio Grande do Sul. *Pesq. Agropec. Bras.* 16:727-732.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Wasserman R. & Krook L. 1987. Enzootic calcinosis in sheep caused by ingestion of *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). *Pesq. Vet. Bras.* 7:85-95.
- Sanson B.F., Vagg M.J. & Döbereiner J. 1971. The effects of *Solanum malacoxylon* on calcium metabolism in cattle. *Res. Vet. Sci.* 12:604-605.
- Santos M.N. Nunes V.A., Nunes I.J., Barros S.S., Wasserman R.H. & Krook L. 1976. *Solanum malacoxylon* toxicity: Inhibition of bone resorption. *Cornell Vet.* 66:565-589.
- Snedecor G.W. & Cochran W.G. 196. *Statistical Methods*. 6th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1974. "Espichamento", intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon*, no Pantanal do Mato Grosso. II. Estudos complementares. *Pesq. Agropec. Bras.* 9:53-62.
- Tröger C. 1984. Wirkungsvergleich von *Solanum malacoxylon*, *Trisetum flavescens*, 1,25-Dihydroxycholecalciferol, 1,25-Dihydroxy-ergocalciferol und 24,25-Dihydroxycholecalciferol am rachitischen Hühnerküken. Diss., Tierärztl. Fak., München.
- Unshelm J. & Flock D. 1967. Die Konzentration des anorganischen Phosphor und die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Blutplasma von Rindern in Abhängigkeit vom Alter und anderen Einflussfaktoren. *Zentralbl. Veterinärmed. A* 14:528-547.
- Wasserman R.H. 1974. Calcium absorption and Calcium-Binding Protein synthesis; *Solanum malacoxylon* reverses Strontium inhibition. *Science* 183:1092-1094.
- Wasserman R.H. 1975. Active Vitamine D-like substances in *Solanum malacoxylon* and other calcinogenic plants. *Nutr. Rev.* 33:1-5.
- Wasserman R.H. 1978. The nature and mechanism of action of the calcinogenic principle of *Solanum malacoxylon* and *Cestrum diurnum*. and a comment on *Trisetum flavescens*, p. 545-553. In: Keller R.F., Kampen K.R. & James L.F. (ed.) *Effects of Poisonous Plants on Livestock*. Academic Press, New York.
- Worker N.A. & Carrillo B.J. 1967. "Enteque seco", calcification and wasting in grazing animals in Argentine. *Nature* 215:72-74.
- Zucker H. & Rambeck W.A. 1981. Vitamin D₃- und Vitamin D₃-Metaboliten-Aktivität in *Trisetum flavescens*. *Zentralbl. Veterinärmed. A* 28:436-441.