

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PADRONIZAÇÃO PARA COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE
AMOSTRAS DE BRAQUIÁRIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE
SAPONINA E TOXIDADE SUBCRÔNICA DA DIOSGENINA EM *Cavia*
*porcellus***

Daniel Silva Goulart

Orientador: Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIÂNIA

2017



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1 **1. Identificação do material bibliográfico:** ☐ Dissertação ☒ Tese

1 **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

2

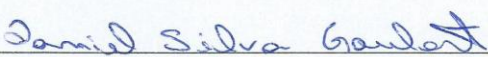
Nome completo do autor: Daniel Silva Goulart

Título do trabalho: Padronização para colheita e conservação de amostras de braquiária para quantificação de saponina e toxidade subcrônica da diosgenina em *Cavia porcellus*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 11/07/2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

DANIEL SILVA GOULART

**PADRONIZAÇÃO PARA COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE
AMOSTRAS DE BRAQUIÁRIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE
SAPONINA E TOXIDADE SUBCRÔNICA DA DIOSGENINA EM *Cavia*
*porcellus***

Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária e
Zootecnia da Universidade Federal
de Goiás

Área de concentração:

Patologia, clínica e cirurgia animal

Orientador:

Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti – EVZ/UFG

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Franklin Riet-Correa – UFCG

Prof. Dr. Emmanuel Arnhold – EVZ/UFG

GOIÂNIA

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Goulart, Daniel Silva

Padronização para colheita e conservação de amostras de
braquiária para quantificação de saponina e toxicidade subcrônica da
diosgenina em *Cavia porcellus* [manuscrito] / Daniel Silva Goulart. -
2017.

94 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti; co
orientador Dr. Franklin Riet-Correa; co-orientador Dr. Emmanuel
Amhold .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

1. *Brachiaria brizantha*. 2. modelo experimental. 3.
fotossensibilização. 4. protodiocina. 5. capim. I. Fioravanti, Maria
Clorinda Soares, orient. II. Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



1 ATA NÚMERO **242** DE DEFESA DE TESE DE **DOUTORADO** DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Daniel da Silva Goulart**. Às
4 **08h30min** do dia **02/03/2017**, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em
5 Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus II
6 Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao
7 julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) **Daniel da**
8 **Silva Goulart**, intitulada "**Padronização para colheita e conservação de amostras de braquiária**
9 **e toxidade subcrônica da diosgenina em Cavia porcellus**", apresentada para obtenção do **Título**
10 **de Doutor em Ciência Animal**, junto à Área de Concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia**
11 **animal** desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora **Profa. Dra. Maria Clorinda**
12 **Soares Fioravanti**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Daniel da Silva**
13 **Goulart** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente
14 concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a)
15 candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para
16 responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos
17 regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a)
18 candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a)**:

19 Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

20 Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges

21 Prof. Dr. Thiago Carvalho da Silva

22 Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha

23 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

24 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Daniel da Silva**
25 **Goulart**, **Habilitado** [(**Habilitado (a) ou não Habilitado (a)**)] pelo(s) motivo(s)
26 abaixo exposto(s):

27 _____
28 _____
29 _____
30 _____
31 _____
32 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



33

34

35

36

37

38 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

39 padronização para coleta e conservação de
40 amostras de braquiana para quantificação
41 de saponina e toxicidade subcrônica da
42 diosgenina em *Cavia porcellus*

43

44

45 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti**, lavrei a presente
46 ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

47 Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

48 Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges

49 Prof. Dr. Thiago Carvalho da Silva

50 Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha

51 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

M. Clorinda Soares Fioravanti
José Renato Junqueira Borges
Thiago C. Silva
Paulo H. J. Cunha
Eugênio Gonçalves de Araújo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por proporcionar saúde para que pudesse alcançar todos os objetivos almejados.

A minha família, meus pais José Maria Goulart e Maria Aparecida da Silva Goulart por me apoiar em todas as decisões tomadas e pelo incentivo dado em cada etapa. A meu irmão Thiago da Silva Goulart (*in memorian*) que mesmo não estando mais aqui se torna presente nos momentos difíceis.

A minha esposa Camila França, por todo apoio, auxílio e tempo gasto aos fins de semana no cuidado de animais e realização de experimentos. Pela compreensão na tomada de decisões e pelo companheirismo durante esses anos.

A minha sogra Daise Regina de Paula e meu cunhado Daylon de Paula Orlando pela compreensão e apoio.

A minha orientadora Profa. Maria Clorinda Soares Fioravanti pelo o convite para realização do doutorado com oportunidade do período sanduíche no exterior. Por todo o apoio durante o trabalho e toda a orientação para realização das etapas e confecção da tese.

A grande amiga Maria Ivete Moura que intercedeu junto com minha orientadora e foi responsável pelo convite para realização do doutorado. Por toda sua ajuda durante todo o período, até mesmo quando estava no exterior, pelas orientações e pelo apoio durante o período experimental. Ao também amigo Gustavo Lage Costa que sempre forneceu ajuda quando necessário.

Aos meus co-orientadores Prof. Emmanuel Arnhold, no auxílio durante a confecção do projeto, e Prof. Franklin Riet-Correa pelo auxílio no início do projeto.

A Profa. Liliana Borges de Menezes pela ajuda com a leitura das lâminas. Ao Prof. Paulo Henrique Jorge da Cunha e ao Dr. Apóstolo Ferreira Martins pelo apoio que deram por meio do Hospital Veterinário/EVZ/UFG. Ao Prof. Leandro Guimarães Franco que orientou e prestou apoio nos procedimentos anestésicos dos animais. A Profa. Flávia Gontijo de Lima pelo auxílio na confecção no projeto.

Agradeço ao Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas/UFG por ceder o espaço para a manutenção dos animais.

Ao técnico administrativo Helton Freires Oliveira e a bolsista de apoio técnico Rayanne Henrique Santana pelo auxílio nas análises hematológicas e bioquímicas.

A coordenação da Pós-graduação em Ciência Animal por todo apoio administrativo e auxílio necessário para realização doutorado e no período sanduíche.

A toda equipe da Profa. Maria Clorinda, estagiários, pós-graduandos e bolsistas de apoio técnico, em especial a Mariana Dall'Agnol, Camila Nunes Figas, Sandes Oliveira Spindola, Marynnis Santos, Paula Dasmasceno Gomes, Giovana Vieira Rocha, Manoella Sena Araújo, Carlos Manoel da Silva Borges, Paula Leticia Lehnen, Arthur Costa Duckur e Victor Araújo Arruda.

A toda a equipe do *Poisonous Plant Laboratory Research/USDA* pela disponibilidade e apoio durante o período do doutorado sanduíche. Gostaria de agradecer especialmente ao Dr. James Pfister, querido amigo Jim, que me acolheu como pesquisador e como parte de sua família, por todo o apoio durante a pesquisa, almoços de domingo e viagens realizadas.

Ao CNPq que pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa e a CAPES pela concessão da bolsa para o Doutorado Sanduíche no Exterior e concessão de bolsa no Brasil.

Por fim, a todos que colaboraram para a realização do trabalho, e que por ventura não tenham sido citados.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura	2
2.1. Fotossensibilização.....	2
2.2. O gênero <i>Brachiaria</i> spp.	2
2.3. Intoxicação por <i>Brachiaria</i>	4
2.3.1. Etiologia	4
2.3.2. Epidemiologia.....	5
2.3.3. Características clínicas, laboratoriais e anatomopatológicas.....	6
2.4. Saponinas.....	8
2.4.1. Classificação das saponinas.....	8
2.4.2. Produção das saponinas nas plantas	10
2.4.3. Ação das saponinas no rúmen	11
2.4.4. Toxidade das saponinas	12
3. Contextualização da linha de pesquisa	13
4. Justificativa e objetivos	22
Referências	22
CAPÍTULO 2 – PADRONIZAÇÃO PARA COLHEITA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE <i>Brachiaria brizantha</i> UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS.....	29
1. Introdução.....	30
2. Material e métodos	31
3. Resultados.....	34
4. Discussão.....	36
5. Conclusões.....	38
Referências	38
CAPÍTULO 3 – TOXICIDADE SUBCRÔNICA DE DIOSGENINA EM <i>Cavia porcellus</i> ...	42
1. Introdução.....	43
2. Material e métodos	44
3. Resultados e discussão	46
4. Conclusão	53
Referências	54
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – Bovinos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens* com sinais clínicos de fotossensibilização.....7

FIGURA 2 – Saponina monodesmosídica.....9

FIGURA 3 – Saponina bidesmosídica.....9

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – Organograma do processamento das amostras de braquiária colhidas para a quantificação de protodioscina e contagem de esporos.....33

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – Fotomicrografia de fígado de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina.....52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – Valores de protodioscina para diferentes partes da planta e método de processamento de amostras de <i>Brachiaria</i> sp., colhidas na Fazenda Tomé Pinto/UFG e Embrapa Arroz e Feijão	34
--	----

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – Hemograma e valores de referência de cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina	47
TABELA 2 – Valores dos parâmetros bioquímicos e de referência de cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina.....	48
TABELA 3 – Frequência de casos de vacuolização, segundo a intensidade e distribuição, em tecido hepático de cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina	51
TABELA 4 – Frequência de casos segundo a intensidade e distribuição de alteração inflamatória no espaço porta de cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BT	Bilirrubina total
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
EVZ	Escola de Veterinária e Zootecnia
GGT	Gama glutamiltransferase
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatograph</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IPEAN	Instituto de Pesquisas Experimentais Agropecuárias do Norte
PPRL	<i>Poisonous Plant Reseach Laboratory</i>
SAS	<i>Statistical Analysis Software</i>
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
UFG	Universidade Federal de Goiás
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VCM	Volume corpuscular médio

RESUMO

O gênero *Brachiaria* possui importantes espécies de forrageiras utilizadas em países localizados em regiões tropicais. No entanto, esse gênero de gramíneas está associado à fotossensibilização e intoxicações em animais de produção. Deste modo, objetivou-se com este estudo estabelecer o padrão para colheita, processamento e conservação de amostras de *Brachiaria brizantha* para quantificação de protodioscina e contagem de esporos de *Pithomyces chartarum* e a avaliação da *Cavia porcellus* (cobaia) como modelo experimental na intoxicação por diosgenina. Para a avaliação da *Brachiaria brizantha*, amostras foram colhidas de oito pastagens as quais foram subdivididas em folhas jovens, folhas maduras, folhas velhas e planta inteira e submetidas a nove diferentes métodos de processamento. Após separação e tratamento das amostras foi realizada a quantificação de saponinas e a contagem de esporos. Observou-se que na maioria dos tratamentos as folhas jovens apresentaram quantidades maiores de protodioscina que as folhas velhas e a planta inteira. Os tratamentos que mantiveram as maiores quantidades de protodioscina foram temperatura ambiente, estufa e estufa com ventilação forçada. Nas amostras das pastagens não foram encontrados esporos do fungo. Desta forma, conclui-se que a concentração de protodioscina é maior nas folhas jovens; a secagem em temperatura ambiente, em estufa ou em estufa de ventilação forçada são os melhores métodos para preservação de protodioscina e o congelamento de plantas para a quantificação de protodioscina não é recomendado. Para a avaliação das cobaias como modelos experimentais na intoxicação por diosgenina foram utilizadas 14 cobaias, divididas em dois grupos, o grupo tratado (GT) e o grupo controle (GC). O GT recebeu 480 mg/kg de diosgenina diluída em óleo vegetal e o GC recebeu somente o óleo vegetal, ambos por 30 dias. Para avaliação do hemograma e análises bioquímicas foram colhidas amostras sanguíneas no dia 0 (M0) e no dia 30 (M30). Na bioquímica plasmática foram realizadas análises para ALT, AST, GGT, ALP, ureia, creatinina, glicose, colesterol, HDL, triglicerídeos, lactato, colinesterase e cálcio. A hematologia e a bioquímica não apresentaram alterações relacionadas à doença hepática causada por saponinas. Na histologia apenas um animal apresentou hiperplasia de ductos biliares, as outras alterações observadas foram de forma geral inespecíficas. Conclui-se que, na dose utilizada, a administração da diosgenina a cobaias não produz lesões hepáticas expressivas nem alterações hematológicas e bioquímicas relacionadas a hepatopatia.

Palavras-chave: *Brachiaria brizantha*, diosgenina, fotossensibilização, modelo experimental, protodioscina.

ABSTRACT

Standardization for harvesting and conservation of *Brachiaria* samples for quantification of saponin and subchronic toxicity of diosgenin in *Cavia porcellus*

The genus *Brachiaria* has provided important forage species to the countries located in tropical regions. However, this genus of grass is associated with photosensitization and poisoning in animal production. Thus, the aim of this study was to establish the standard for collection, processing, and conservation of *Brachiaria brizantha* for protodioscin quantification and spore count from *Pithomyces chartarum* and the evaluation of guinea pig (*Cavia porcellus*) as an experimental model of poisoning by diosgenin. For *Brachiaria brizantha* evaluation, samples were collected from eight pastures, which were subdivided into young leaves, mature leaves, old leaves, and whole plant. After that, the samples were submitted to nine different drying and conservation treatments. After separation and treatment of the samples, saponins were quantified and spores were counted. In most of treatments, the young leaves presented larger amounts of protodioscin than the old leaves and the whole plant. The treatments that maintained the highest amounts of protodioscin were room temperature, oven, and oven with forced air circulation. No fungal spores were found in the pasture samples. Thus, we concluded that the concentration of protodioscin varies with the maturation stage of the leaves; drying at room temperature, in an oven, or in an oven with forced air circulation are the best methods, and freezing plants for preservation of protodioscin is not recommended. In the guinea pigs evaluation, 14 guinea pigs were divided into two groups, the treatment group (TG) and the control group (CG). The TG received 480 mg/kg of diosgenin and the CG received only vegetable oil. Both groups received the treatment for 30 days. Blood samples were collected on day 0 (M0) and day 30 (M30) for blood cell count and biochemical analyzes. In clinical biochemistry, the analyzes were performed for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma glutamyl transferase, alkaline phosphatase, urea, creatinine, glucose, cholesterol, HDL, triglycerides, lactate, cholinesterase, and calcium. Hematology and biochemistry did not present alterations, which could not be related to hepatic disease caused by saponins. In histology, only one animal had bile duct hyperplasia, the other alterations observed were generally nonspecific. Therefore, we concluded that the administration of 480 mg/kg of diosgenin to guinea pigs did not produce significant hepatic lesions or hematological and biochemical alterations related to liver disease.

Keywords: *Brachiaria brizantha*, diosgenin, experimental model, photosensitization, protodioscin.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução

A pecuária nacional tem usado predominantemente o manejo extensivo para criação de ruminantes, tendo as plantas do gênero *Brachiaria* como as mais predominantes nas pastagens. Essa gramínea contribuiu fortemente para o crescimento do mercado agropecuário tanto no âmbito nacional como internacional.

Apesar de todos os benefícios trazidos pela introdução das braquiárias, alguns problemas acompanharam a gramínea. Inicialmente houve os prejuízos com a cigarrinha que infestava as pastagens de *Brachiaria decumbens*, as quais foram substituídas por cultivares mais resistentes e por outras espécies do mesmo gênero. Posteriormente, foi atribuído a *B. decumbens* os casos de fotossensibilização observados nos ruminantes e equinos, mas que com o passar dos anos foram também observados nas pastagens de *B. brizantha*, *B. humidicula* e *B. ruizisienses*¹. Esses casos de fotossensibilização foram inicialmente atribuídos à esporidesmina, uma micotoxina produzida pelo fungo *Pithomyces chartarum*, os quais os esporos são constantemente encontrados nas pastagens².

Posteriormente, além dos casos clássicos de fotossensibilização relacionados ao eczema facial produzido pela esporidesmina, passou-se a observar outros sinais clínicos e achados histopatológicos. Os bovinos além de apresentarem a fotossensibilização, apresentavam quadros de emagrecimento progressivo, caracterizado como a forma subclínica da doença. Nos exames histológicos passou-se a observar cristais birrefringentes nos ductos biliares e hepatócitos dos animais. Foi observado que esses novos achados eram semelhantes a achados de intoxicações ocorridas por plantas que continham saponinas. Dessa forma, começou-se a investigar a presença de saponinas em gramíneas de *Brachiaria*, encontrando principalmente a protodioscina.

Paralelamente, foi observado que culturas de *Pithomyces chartarum*, encontradas no Brasil, na maioria das vezes não produziam a esporidesmina³ e em muitos estudos já não encontravam grande quantidade de esporos dos fungos e a presença de saponinas nas plantas foi associada à intoxicação⁴.

No entanto, apesar de muitos defenderem que a intoxicação por *Brachiaria* é causada por saponinas, há uma grande dificuldade de se reproduzir tal quadro, levando a que muitos pesquisadores ainda relutam em acreditar que as saponinas por si só acarretam na intoxicação, podendo haver outros fatores envolvidos.

2. Revisão de literatura

2.1. Fotossensibilização

A fotossensibilização caracteriza-se por uma sensibilidade exagerada do animal a certos comprimentos de onda da luz solar, a qual é determinada por agente fotossensibilizador presente no epitélio do animal⁴, que na maioria das vezes é um pigmento fluorescente⁵.

A fotossensibilização causada por plantas é dividida em dois tipos, a primária e a secundária ou hepatógena. Na fotossensibilização primária, o agente fotossensibilizador é ingerido, atravessa a barreira hepática e cai na circulação geral, alcançando a pele, induzindo as lesões devido a excessiva sensibilidade aos raios solares^{5,6}. Na fotossensibilização secundária, a planta possui substância tóxica que provoca alterações no parênquima hepático ou nos ductos biliares causando distúrbio no mecanismo de eliminação da filoteritina. A filoteritina é um pigmento fluorescente formado nos pré-estômagos dos ruminantes, a partir da clorofila, o qual é eliminado pelo fígado. Em casos de danos hepáticos a filoteritina acumula-se, passa para circulação sanguínea e alcança a pele. A forma clínica da doença caracteriza-se por lesões de pele, especialmente, nas partes menos pigmentadas ou menos protegidas por pelos⁵.

No Brasil, casos de fotossensibilizações hepatógenas estão relacionadas a inúmeras espécies de plantas como por exemplo: *Senecio* spp., *Myoporum* spp., *Lantana* spp. e *Brachiaria* spp.⁴. Em relação às braquiárias, os surtos são frequentemente relatados em ovinos e bovinos, e causam grande prejuízos ao produtor devido a morte de animais e a redução na produtividade⁷.

2.2. O gênero *Brachiaria* spp.

No Brasil, a principal fonte de alimento para a pecuária têm sido os pastos⁸, especialmente por ser um país de clima tropical e com grande extensão de terras cultiváveis⁹. Segundo censo agrícola do IBGE¹⁰ em 2006, havia no Brasil mais de 170 milhões de hectares de terras com pastagens, o que garante uma fonte de recursos nutricionais de menor custo para os animais⁹. Desta vasta área de pastagens no Brasil, estima-se que mais de 50% das áreas são de forrageiras cultivadas, sendo que as principais espécies de plantas utilizadas são as do gênero *Brachiaria*⁸.

A introdução de gramíneas cultivadas para a formação de pastagens teve o intuito de aumentar a disponibilidade de alimento para os animais, podendo assim, gerar ganhos quanto as taxas de lotação, o desempenho e a produtividade⁸. Além disso, muitas pastagens estão localizadas em regiões de solo ácido e baixa fertilidade, sendo necessária a busca por espécies que se adaptassem a este tipo de situação. Desta forma, a introdução de plantas do gênero *Brachiaria* no Brasil teve grande expansão a partir de 1970, com a introdução de gramíneas que se reproduziam por sementes e com boa adaptação ao clima e aos solos, principalmente os do Cerrado¹¹.

O gênero *Brachiaria* tem grande importância para regiões de clima tropical, tanto na África e Austrália, como na América do Sul. A larga utilização dessas plantas é decorrente da alta produção de matéria seca, fácil cultivo, adaptação a diferentes tipos de solos, bom crescimento ao longo do ano e baixo custo de manutenção^{1,11,12}.

As braquiárias são gramíneas perenes ou anuais, cespitosas ou decumbentes, normalmente apresentam enraizamento nos nós, quando entram em contato com o solo, dando a esta boa cobertura vegetal e protegendo-o contra erosões. São um gênero de plantas tropicais, principalmente de origem africana, abrangendo cerca de 80 espécies⁴⁶. No Brasil, apesar de haver inúmeras espécies de *Brachiarias* cultivadas quatro são predominantes: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruizizensis*^{1,8,11}.

A *B. decumbens* foi introduzida no Brasil em 1962 pelo Instituto de Pesquisas Experimentais Agropecuárias do Norte (IPEAN), por meio do cultivar *B. decumbens* cv. IPEAN. Mais tarde, a *B. decumbens* cv Basilisk foi trazida da Austrália, devido sua reprodução por sementes, o que propiciou rápida expansão do cultivar pelas regiões Centro-Oeste, Norte e Sul do Brasil^{1,12}. Nos tempos atuais, a *B. decumbens* vem sendo substituída pela *B. brizantha*, que foi introduzida nos anos 80, tendo como principal razão sua resistência as cigarrinhas-das-pastagens¹.

A *B. brizantha*, a mais utilizada nos solos de Cerrado, tem como cultivar mais utilizado a Marandú, que possui potencial produtivo superior a *B. decumbens*, podendo produzir 23 t/ha/ano de matéria seca^{8,11}.

No bioma Cerrado, localizado principalmente na região Centro-Oeste, que é a principal área de produção de carne bovina no país, estima-se que haja mais de 60 milhões de hectares de pastagens cultivadas, sendo que, o gênero *Brachiaria* responde por 85% da área^{8,13}. Neste contexto, 51 milhões de hectares são constituídos de *Brachiaria* sendo 30 milhões de *B. brizantha*, 15 milhões de *B. decumbens* e 6 milhões de *B. humidicola*¹⁴.

Apesar da vasta utilização, da boa produção de matéria seca e da adaptação ao clima e ao solo, diferentes espécies de braquiárias têm sido associadas a casos de intoxicação em distintas espécies de animais de produção^{1,15-17}.

2.3. Intoxicação por *Brachiaria*

2.3.1. Etiologia

Inicialmente os quadros de fotossensibilização observados em animais mantidos em pastagens de braquiárias eram atribuídos à toxina esporidesmina, produzida pelo fungo *Pithomyces chartarum*. Posteriormente, inúmeros pesquisadores têm associado esses quadros a intoxicação por saponinas contidas nas gramíneas¹.

Os esporos do fungo *Pithomyces chartarum* tem, recorrentemente, sido encontrado em amostras de braquiária e é fato que a esporidesmina, produzida por algumas de suas cepas, causa fotossensibilização em diferentes espécies⁶. No entanto, em estudo realizado com cepas do fungo encontradas no Brasil, Colômbia, Estados Unidos e Canadá, constatou-se que elas não eram produtoras da toxina. Os achados levaram os pesquisadores a sugerir que as cepas do *Pithomyces chartarum* encontradas nas Américas são diferentes das cepas isoladas na Austrália, Nova Zelândia e África do Sul. Assim, indicam que as cepas presentes no Brasil têm baixa capacidade ou mesmo, não tem a capacidade de produzir a esporidesmina e consequentemente, não têm relação com os casos de fotossensibilização e intoxicações por braquiárias³.

Deste modo, cada vez mais, têm se considerado a saponina como agente causal da intoxicação por braquiária. Adicionalmente, outras plantas que causam intoxicações associadas às saponinas, tem quadros clínicos semelhantes à intoxicação por braquiária¹. Segundo Graynon¹⁸, a colangiohepatite associada a cristais observada na intoxicação por *Brachiaria* é semelhante à que ocorre nas intoxicações por *Tribulus terrestris* e por *Panicum* spp. Além disso, em vários casos de intoxicação por braquiárias não foram encontrados esporos do *P. chartarum* ou esses se encontravam em quantidades muito baixas, enquanto as saponinas estavam presentes^{1,17,19-21}.

Provavelmente a diminuição na quantidade de esporos encontradas nas pastagens se dá devido o melhor manejo destas. Como forma de controle da quantidade de fungos recomenda-se que as pastagens sejam bem manejadas, de forma a evitar o acúmulo de matéria orgânica. Esse acúmulo favorece a condições propícias para a procriação dos fungos, os quais

desenvolvem-se saprofiticamente nas folhas mais velhas, em condições de temperatura (18 a 27°C) e umidade (96%) favoráveis²².

2.3.2. Epidemiologia

A intoxicação associada à braquiária afeta boa parte dos animais de produção, sendo observada em ovinos, caprinos, equinos, bovinos e bubalinos. Apesar de afetar inúmeras espécies as mais acometidas são os ovinos e bovinos, com destaque para os ovinos. Os ruminantes jovens são os mais predispostos e principalmente os que não tiveram contato prévio com a gramínea¹.

Existem evidências que animais expostos a primeira vez ao capim são mais susceptíveis do que animais já adaptados. Estudo com ovinos com e sem o contato prévio com pastagens de braquiária indicou que apenas 8,9% dos animais que já tinham contato com a gramínea adoeciam, enquanto que animais sem esse contato apresentaram 33,3% de morbidade²³. Em trabalho com ovinos que não tiveram contato prévio com a braquiária, foi observada morbidade próxima aos 80%, com mortalidade de 90%²⁴. Já em estudo epidemiológico, com 34 surtos de intoxicação por braquiária, em ovinos, na região central do Brasil (estados de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal), observou-se que 90% dos animais acometidos tinham menos de um ano de idade e em 45,5% dos casos os animais eram recém introduzidos na propriedade¹⁶.

Em relação à resistência, tem sido observado que ovinos filhos de pais que não apresentam sinais clínicos prévios de intoxicação, quando pastejando braquiária, apresentam menor suscetibilidade a intoxicação. Em um estudo no qual se utilizou filhos de pais resistentes, mantidos em pastagens de braquiária, tanto os pais como os filhos não apresentavam sinais de intoxicação. Já os filhos de pais susceptíveis, ou seja, com histórico de intoxicação por braquiária, também adoeceram (10 de 15 animais), quando colocados em pastos da gramínea, indicando que eram mais susceptíveis. Nenhum dos ovinos do grupo resistente apresentou sinais de intoxicação. Esses resultados sugerem a existência de resistência genética a intoxicação²⁵.

No que diz respeito à espécie de gramínea associada às intoxicações, a maioria dos casos ocorre em pastagens formadas com *B. decumbens*, seguida por casos em *B. brizantha* e com menor frequência em pastagens de *B. humidicola*^{1,26,27}. Segundo levantamentos de

Sant`ana²⁶ de 54 surtos observados 79% ocorreram com pastagens de *B. decumbens*, 17% em *B. brizantha* e 3% em *B. humidicola*.

A ocorrência mais elevada de casos de intoxicações que ocorreram em pastos de *B. decumbens* em relação à *B. brizantha* pode estar relacionada a um esteroisômero da protodioscina, a protoneodioscina. A protoneodioscina é encontrada em uma quantidade cinco vezes maior na *B. decumbens* (20 mg/kg) do que na *B. brizantha* (4mg/g). Dessa forma, é provável que a protodioscina tenha um menor efeito tóxico que a protoneodioscina²⁸.

2.3.3. Características clínicas, laboratoriais e anatomopatológicas

a) Ovinos e caprinos

Nos ovinos os sinais clínicos podem aparecer após 10 dias da exposição ao capim. A intoxicação pode ser classificada em hiperaguda, aguda, crônica e subclínica, à depender do início e dos sinais clínicos²⁹. É caracterizada clinicamente por hiperemia da mucosa ocular, icterícia, apatia, emagrecimento, queda de pelos, ulceração da pele, principalmente em animais com pelagens claras, prurido, inquietação, fotofobia, edemas em orelhas, pálpebras, base da calda e prepúcio, mucosas amareladas, secreção ocular e nasal^{17,24,29}. Na patologia clínica pode-se observar aumento da atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST)²⁴, gama glutamiltransferase (GGT) e aumento da concentração sérica de bilirrubina total, direta e indireta^{17,24,30}.

Na necropsia de ovinos doentes, é observado icterícia generalizada, hepatomegalia, distensão da vesícula biliar e fígado com padrão lobular acentuado. Na análise histológica, as alterações ocorrem principalmente no fígado, sendo descrita a presença de macrófagos espumosos, proliferação de ductos biliares, necrose de hepatócitos, colangite e presença de cristais birrefringentes em macrófagos e hepatócitos^{17,24,29}.

Os caprinos acometidos pela intoxicação apresentam eritema e edema na região dos olhos, focinho e orelhas, icterícia e formação de crostas nas regiões com lesões. Na necropsia observa-se o aumento do fígado, coloração amarelada e distensão da vesícula biliar. Na histologia, observa-se tumefação difusa de hepatócitos, fibrose periportal acompanhada por proliferação de células de ductos biliares, presença de cristais refringentes no interior dos ductos hepáticos. Na patologia clínica observar-se aumento da atividade sérica da GGT³¹.

b) Bovinos

Nas intoxicações por *Brachiaria* spp., bovinos de diferentes idades, podem apresentar sinais de fotossensibilização ou uma síndrome progressiva causando emagrecimento e a morte sem a presença de sinais clínicos de fotossensibilização^{1,27}. Os sinais clínicos frequentemente observados, nas intoxicações, são o edema de barbel, dermatite com espessamento da pele e formação de crostas, ulceração na parte ventral da língua, edema de orelha, corrimento ocular, salivação, inquietação, prurido e fotofobia (Figura 1)²⁷. Nos animais com emagrecimento progressivo, os sinais clínicos mais comuns são apatia, anorexia e caquexia, podendo evoluir para o óbito dos animais¹.



FIGURA 1 – Bovinos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens* com sinais clínicos de fotossensibilização

Fonte: Fioravanti, 1999

Na necropsia dos animais são observados hepatomegalia, fígado amarelado e com padrão lobular, ulcerações na parte ventral da língua, rins acastanhados e urina escurecida. Nos indivíduos que não apresentam sinais de fotossensibilização, mas que apresentam emagrecimento progressivo observa-se, na necropsia, fígado aumentado de volume e amarelado. No exame histopatológico do fígado observa-se tumefação e vacuolização de hepatócitos, além de graus variáveis de fibrose periportal, hiperplasia de células epiteliais dos ductos biliares, retenção biliar, infiltrado periportal, macrófagos espumosos, cristais birrefringentes no interior dos ductos biliares, células gigantes multinucleadas com núcleos distribuídos no citoplasma ou na periferia²⁷. Bovinos clinicamente saudáveis, mantidos em pastagem de *Brachiaria* spp., podem também apresentar grandes quantidades de macrófagos espumosos no fígado e linfonodos mesentéricos, sugerindo a presença de intoxicação^{2,32,33}.

Na patologia clínica os animais mantidos em pastagens de braquiária com a intoxicação subclínica e clínica, podem apresentar valores da atividade plasmática de AST e

GGT aumentados^{2,34}, sendo a AST mais sensível nesses casos. Apesar disso, os animais podem apresentar lesões hepática sugestiva de esporidesmicotoxicose subclínica e mesmo assim apresentar enzimas hepáticas com valores dentro dos de referência².

2.4. Saponinas

2.4.1. Classificação das saponinas

As saponinas são um grupo de glicosídeos distribuídos nas plantas superiores. Esses glicosídeos têm a habilidade de reduzir a tensão superficial de soluções aquosas, formando espuma, quando submetidos à agitação³⁵. A denominação de saponina deriva-se do latim *sapo* (sabão), refletindo sua habilidade de formar espuma³⁶. As saponinas consistem em uma molécula de açúcar usualmente contendo glicose, galactose, ácido glucônico, xilose e ramnose ligadas a uma aglicona hidrofóbica (sapogenina) que pode ser um triterpeno ou um esteróide natural³⁷. A característica da saponina de formar espuma em solução aquosa é consequência de sua natureza anfifílica, na qual a sapogenina interage com compostos apolares e as cadeias de sacarídeos interagem com substâncias polares³⁶.

As saponinas são geralmente classificadas de acordo com o núcleo fundamental aglicona, podendo ser triterpênicas e esteroidais^{35,38}. As saponinas triterpênicas são encontradas principalmente em plantas dicotiledôneas enquanto que as esteroidais são de ocorrência principal em plantas monocotiledôneas³⁵.

Outra classificação das saponinas baseia-se no número de cadeias laterais de sacarídeos. As mais conhecidas são as saponinas monodesmosídicas, que tem apenas uma posição da aglicona glicolisada (Figura 2). Na maioria destas saponinas a cadeia de sacarídeos está ligada ao grupo C₃ hidroxil. Já saponinas com duas cadeias de sacarídeos são denominadas bidesmosídicas, e essas cadeias estão geralmente ligadas C₂₆ ou C₂₈ (Figura 3). A grande complexidade da estrutura da saponina é advinda da variedade de estruturas de agliconas, a natureza das cadeias laterais e a posição dessas moléculas sobre a aglicona^{39,40}.

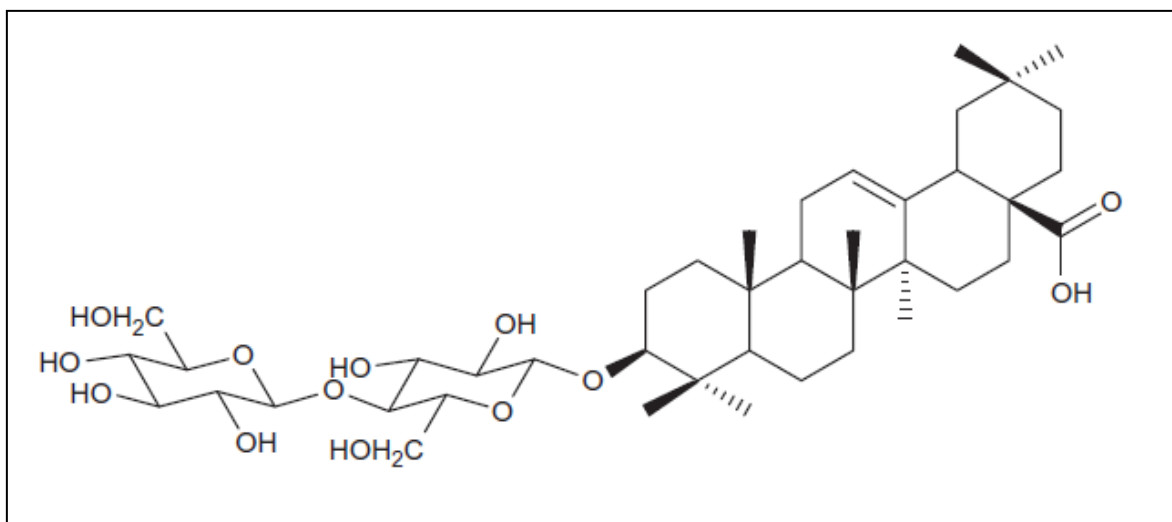


FIGURA 2 – Saponina monodesmosídica

Fonte: Adaptado de AUGUSTIN⁴⁰

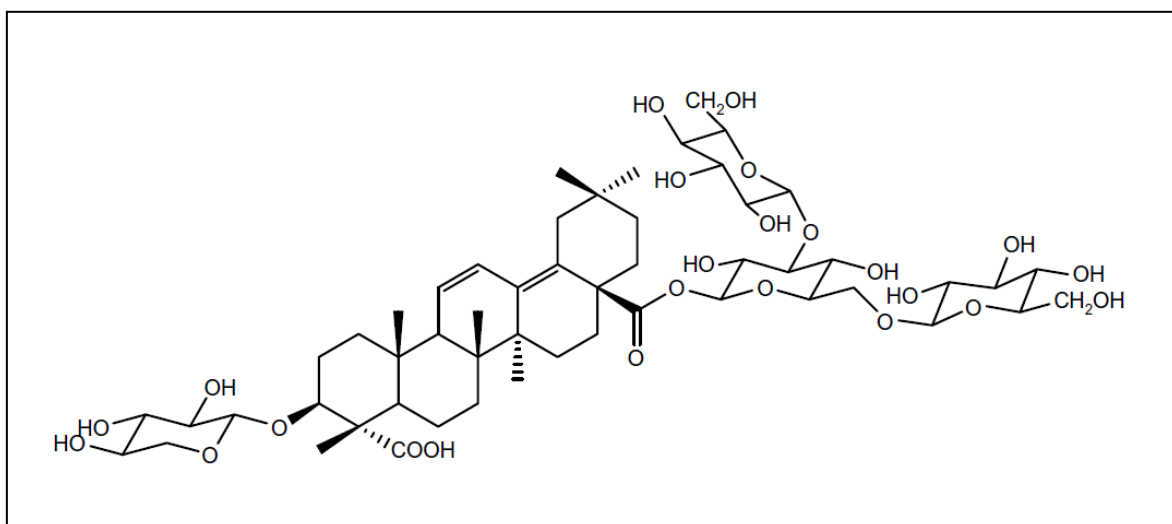


FIGURA 3 – Saponina bidesmosídica

Fonte: Adaptado de AUGUSTIN⁴⁰

Muitas saponinas conhecidas são derivadas de metabólitos secundários das plantas⁴¹. Elas ocorrem em grande quantidade de espécies de plantas, tanto nas silvestres como nas cultivadas. Nas plantas cultivadas as saponinas triterpenóides são geralmente predominantes, enquanto que as saponinas esteroidais predominam em plantas utilizadas na medicina popular, na maioria, silvestres³⁹.

Devido à característica anfifílica, as saponinas têm atraído a atenção do homem desde tempos antigos. Um exemplo disto é a utilização da casca de *Quillaja saponaria*, uma árvore nativa da região dos Andes, que era retirada por indígenas da região e utilizada como agente detergente e, pelos Xamãs, como agente de cura³⁹. Em tempos mais recentes as

características das saponinas têm atraído a atenção de diversos setores da indústria como a área farmacêutica e cosmética.

2.4.2. Produção das saponinas nas plantas

As plantas produzem diversos metabólitos secundários, como parte do seu crescimento normal ou em resposta a ataques de patógenos ou estresse. Por definição os metabólitos secundários são considerados “artigo de luxo”, que não são requeridos para o crescimento ou reprodução da planta. Entretanto podem ser importantes para conferir vantagens para as plantas produtoras, inibindo o crescimento de plantas vizinhas ou protegendo-as contra patógenos. Eles podem ainda ter papel sutil na fisiologia da planta, no entanto esse papel ainda não foi caracterizado. Em adição, os metabólitos secundários também representam um vasto recurso, devido à complexidade de suas moléculas, que são valorizados e explorados pelo homem na farmacologia e em outras áreas⁴².

A formação da saponina ocorre por meio da ligação da molécula de açúcar à aglicona, mas pouco se sabe a respeito de enzimas que participam desse processo e das vias bioquímicas envolvidas na sua biossíntese. No entanto, uma característica comum de todas as saponinas é a ligação de uma molécula de açúcar à posição C₃ da aglicona. As cadeias de açúcares diferem substancialmente entre as saponinas, podendo ser ramificadas e constituídas por até cinco moléculas de açúcar. Acredita-se que o processo de glicolização seja a etapa final da formação das saponinas, no entanto, inúmeras etapas o precedem⁴².

As plantas produtoras de saponinas geralmente acumulam essas substâncias como etapa normal de seu desenvolvimento. No entanto, a produção de saponinas pode ser influenciada por diversos fatores ambientais como disponibilidade de nutrientes, água, irradiação solar, e outros fatores combinados. A produção de saponinas varia também de acordo com as características individuais das plantas ou tecidos e demonstram flutuações sazonais⁴⁰.

A quantidade de saponinas pode apresentar em diferentes concentrações a depender da parte da planta. Há plantas que tem maior quantidade de saponinas nas folhas, enquanto outras, nos frutos. Essa variação ocorre devido às diferentes necessidades de proteção da planta. Assim, a maior quantidade de saponinas nos frutos jovens previne o ataque de herbívoros e fungos, favorecendo o amadurecimento de maior quantidade de frutos, garantindo o amadurecimento das sementes e dispersão destas⁴³. Em outras plantas a quantidade de saponinas pode ser maior nos tubérculos, protegendo a parte reprodutiva da planta⁴⁰, ou mesmo

nas raízes prevenindo ataque de fungos⁴⁴. A quantidade de saponinas pode ainda variar em diferentes estágios de amadurecimento das plantas⁴⁵. Em geral as plantas em estado de germinação ou imaturas apresentam maiores quantidade de saponinas³⁹. Nas *Brachiaria decumbens* e *B. brizantha* foi demonstrado que as plantas em pleno crescimento apresentam maior quantidade de saponinas que as plantas em fase reprodutiva⁴⁶.

As concentrações de saponinas nas plantas podem ser aumentadas em resposta ao tratamento com indutores, como extratos com leveduras. Estas estratégias são adotadas quando há o objetivo da utilização das saponinas para fabricação de produtos comerciais. Assim, quanto maior a concentração de saponinas na planta, mais fácil é seu isolamento⁴¹.

2.4.3. Ação das saponinas no rúmen

As saponinas têm demonstrado a capacidade de alterar a fermentação ruminal, refletindo na melhoria da produção animal. A modificação na fermentação ruminal pelas saponinas é mediada por meio de sua influência direta sobre a atividade de protozoários, bactérias e fungos. Em geral, o mecanismo de ação das saponinas sobre os micro-organismos é devido à sua interação com a molécula de esterol que está presente na membrana celular dos micro-organismos. Nas bactérias o mecanismo de ação relaciona-se com a alteração da parede bacteriana, por meio da modificação da tensão superficial extracelular⁴⁷, já que elas não têm esteróis em sua parede⁴⁸.

Os efeitos das saponinas sobre a comunidade microbiana no rúmen e fermentação são interdependentes, variando com o tipo e níveis de saponinas, composição da dieta, população microbiana afetada e adaptação da microbiota ruminal à saponina⁴⁷.

Em decorrência da diversidade de saponinas existentes, elas podem atingir diferentes micro-organismos. Isso ocorre devido à interação dos esteróis de membrana com a saponina, os quais alteram de acordo com a espécie do micro-organismo. Devido a esse efeito espécie dependente, o uso de uma saponina pode favorecer a manipulação seletiva do metabolismo do rúmen. Um exemplo disto seria a descoberta de uma saponina que reduzisse o crescimento de *Streptococcus bovis* em dietas com alto teor de concentrados, o que reduziria a produção de ácido láctico e por consequência a ocorrência de acidose ruminal⁴⁷.

As saponinas têm sido mais efetivas contra os protozoários, causando sua morte. Os protozoários consomem as bactérias e fungos do rúmen, o que diminui a eficiência da utilização de proteínas pelos ruminantes⁴⁷. Assim, a diminuição no número de protozoários

pode aumentar a eficiência da síntese bacteriana, o fluxo de proteínas para o duodeno e melhorar a retenção de nitrogênio nos animais^{47,49}.

As saponinas podem também diminuir a liberação do metano para a atmosfera, diminuindo o impacto ambiental^{50,51}. Acredita-se que elas podem se ligar ao metano quando suas concentrações estão altas no rúmen, e liberá-lo quando as concentrações voltam a ficar baixas. Isso mantém um suprimento constante para a síntese microbiana de proteínas⁵². A diminuição na liberação do metano pode ocorrer também devido à ação das saponinas contra a microbiota envolvida na formação do metano, incluindo os metanogênicos e protozoários⁵¹.

Em estudo utilizando sistema de fermentação ruminal *in vitro*, foram adicionadas diferentes quantidades de saponinas de *Quillaja saponaria*, com intuito de avaliar a composição química, a fração microbiana e os parâmetros da fermentação. Observou-se que as saponinas reduziram significativamente a contagem de protozoários após 24 horas, tendo diminuição de 51,3% quando comparada com o controle. Houve ainda aumento no nitrogênio o que foi atribuído ao efeito antiprotozoários das saponinas. A adição de saponinas favoreceu a redução na produção de metano e melhorou a eficiência da síntese microbiana de proteínas⁵³.

Para avaliar o efeito das saponinas sobre a performance produtiva dos animais, um estudo utilizou 27 ovelhas alocadas em três grupos: sem saponina, 3g e 6g de saponinas por dia. As doses utilizadas nos animais foram estabelecidas em experimento *in vitro* que avaliou a fermentação ruminal. No estudo *in vitro* foi observado, após a adição das saponinas, que a produção de metano diminuiu significativamente em 12 e 24 horas, reduziu a quantidade de protozoários em até 45% (dose dependente), aumentou a disponibilidade de nitrogênio e aumentou o fluxo de proteína microbiana para o intestino, em comparação com o grupo que não recebeu saponinas. *In vivo* foi observado que a adição de saponinas melhorou o ganho de peso diário e a eficiência alimentar⁵⁴. Ao contrário dos achados de Hu⁵⁴, os resultados de Zhou⁵⁵ ao trabalhar com saponinas de *Ilex kudingcha*, adicionadas na dieta de carneiros, não indicaram melhoria na digestibilidade de nutrientes e fermentação ruminal.

2.4.4. Toxicidade das saponinas

Plantas que contêm saponinas frequentemente têm sido apontadas como causadoras de quadros de intoxicações caracterizados, principalmente, por lesões hepáticas, renais e fotossensibilização^{30,56,57}, podendo causar também problemas gastrointestinais, como

gastroenterites e diarreia⁵⁰. Acredita-se que a intoxicação esteja relacionada com a formação de estruturas cristaloides e sua deposição no sistema biliar e no fígado⁵⁸.

A formação dos cristais biliares se dá, provavelmente, no metabolismo gastrointestinal das saponinas nos animais. Acredita-se que após a ingestão das saponinas esteroidais elas são hidrolisadas formando as sapogeninas, as quais sofrem conjugação com ácido glicurônico. Os glicoronídeos das sapogeninas ligam-se com os íons de cálcio e formam sais insolúveis que depositam em forma de cristais^{59,60}. Com a deposição dos cristais, pode ocorrer a inflamação e obstrução do sistema biliar, necrose de hepatócitos periportais e, consequentemente, os sinais de intoxicação relatados^{50,59,60}.

As intoxicações por saponinas são relatadas em inúmeras plantas, mas são mais frequentemente descritas nas *Brachiaria* spp, *Tribulus terrestris*, *Panicum* spp, *Agave lecheguilla*, *Nartheccium ossifragum*, quase sempre relacionadas a quadros de fotossensibilização⁵⁰.

Especificamente nas braquiárias, a saponina encontrada em maior quantidade é a protodioscina, a qual tem na sua estrutura a diosgenina como aglicona⁵⁹. A diosgenina é uma sapogenina esteroidal originada da hidrólise das saponinas presentes em inúmeras espécies de plantas como *Dioscorea nipponoca* Makino, *Smilax china* Linn, *Smilax bockii* Warb, *Solanum incanum*, *Solanum xanthocarpum*, *Costus speciosus* and *Trigonella foenum graecum*⁶¹, *B. decumbens*⁶² e *Panicum dichotomiflorum*⁶⁰. Essa sapogenina é utilizada como material inicial para a síntese de contraceptivos orais, hormônios sexuais e outros componentes esteroidais. Além disso, tem o seu uso estudado em diversas doenças como a leucemia e a hipercolesterolemia⁶¹. Apesar de seus efeitos benéficos serem bastante estudados, plantas que contém saponinas com a diosgenina como aglicona têm sido associadas a intoxicações em animais⁵⁹.

3. Contextualização da linha de pesquisa

O início das pesquisas com *Brachiaria* e seus efeitos sobre os animais na EVZ/UFG teve como primeiro trabalho desenvolvido a tese de doutorado “Incidência, avaliações clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos”, desenvolvido em parceria com a Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu e Jaboticabal². O estudo avaliou aspectos da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos, mantidos em pastagens de *Brachiaria* sp, na idade ao abate, além de realizar a

comparação com animais que apresentavam sintomas clínicos da intoxicação. Nos animais estudados foi observado que 64% apresentavam incidência subclínica da doença. Os achados histopatológicos sugestivos de esporidesminotoxicose foram colangiohepatite, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório mononuclear restrito ao espaço porta, acompanhado de hiperplasia do tecido conjuntivo e proliferação dos ductos biliares. Não foram encontrados cristais dentro dos hepatócitos, sinusóides e ductos biliares. A colangiohepatite foi encontrada isoladamente ou acompanhada de outras alterações. A reação inflamatória granulomatosa zonal esteve mais frequentemente associada a ela e caracterizou-se pelo acúmulo de macrófagos espumosos, sob a forma de células isoladas ou aglomerados, no parênquima hepático e no espaço porta. Houve correlação negativa entre peso vivo das fêmeas e dos machos e o número de macrófagos encontrados no fígado. A correlação negativa também foi significativa entre a intensidade da doença e o peso vivo das fêmeas, consequentemente, apesar das lesões histopatológicas não provocarem sinais clínicos e não determinarem alterações macroscopicamente observáveis, o funcionamento do órgão foi afetado, refletindo-se negativamente no ganho de peso.

Considerando as diversas dúvidas quanto a etiopatogenia da lesão hepática de bovinos mantidos em braquiária, o segundo trabalho desta linha de pesquisa, a tese de doutorado intitulada “Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistema de pastejo”⁶³ tinha como objetivos: 1. realizar o isolamento e quantificação da saponina protodioscina nas diferentes fases do ciclo vegetativo de *B. decumbens* e *B. brizantha*, verificando se a fase de desenvolvimento interferia na quantidade de saponina da planta e se houve diferença na quantidade de saponina entre as duas espécies de braquiária; 2. acompanhar casos clínicos em ruminantes com contagem de esporos do fungo e dosagem de saponinas nas pastagens a fim de determinar o agente etiológico da enfermidade; 3. avaliar rebanhos bovinos mantidos em pastos de *Brachiaria* sp e a quantidade da saponina esteroideal protodioscina e de esporos presentes nas pastagens ao longo do ano. Nessa última fase, foi feita avaliação da quantidade da saponina e de esporos e se houve diferenças com relação à estação do ano; avaliou-se a presença de alterações hepáticas, por meio da determinação da atividade sérica de gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) e dos valores de bilirrubina⁶³. Durante o período do estudo não ocorreram surtos em bovinos, tendo sido observado somente um surto de fotossensibilização em ovinos, com presença de pequena quantidade de esporos do *Pithomyces chartarum* insuficiente para causar a intoxicação, mas houve a presença de protodioscina, associando esse surto à saponina do capim. A manutenção de bovinos em pastagens de braquiárias sem a

presença de quantidade elevada de fungos, mas com presença de protodioscina não resultou em lesões histopatológicas e laboratoriais sugestivas da intoxicação. O conjunto de achados sugeriu que os ovinos são susceptíveis a intoxicação por protodioscina presente na braquiária, mas bovinos não, ou seja, somente a presença da saponina protodioscina não é suficiente para determinar o aparecimento de surtos de fotossensibilização hepatógena nos bovinos^{17,63}. A maior quantidade da saponina protodioscina foi observada em março, final da estação das chuvas, e a menor quantidade ocorreu em julho, no meio da estação seca, demonstrando grande variação nas concentrações de saponinas, sugerindo uma relação com a precipitação pluviométrica e/ou ciclo de vida das espécies de *Brachiaria* avaliadas⁴⁵.

Nesta fase de desenvolvimento das pesquisas, estava claro para a equipe, que seria necessário o desenvolvimento de mais estudos, especialmente a reprodução experimental da intoxicação com quantificação da saponina e a determinação das concentrações tóxicas de saponinas para ruminantes, além do acompanhamento de casos clínicos da enfermidade. Outro grande desafio colocado é a determinação da capacidade de produção de esporidesmina pelas cepas brasileiras de *P. chartarum*, bem como a realização do isolamento e quantificação da micotoxina (esporidesmina)⁶³.

O terceiro estudo da linha de pesquisa, foi a tese de doutorado intitulada “Avaliação clínico-laboratorial e desempenho de bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon*”, que avaliou o desempenho ponderal e a higidez do fígado de bovinos, por meio de exames laboratoriais e histológicos, fazendo a relação com a contagem de esporos e a concentração de saponinas nas pastagens de *Andropogon* e *Brachiaria*⁶⁴. Os dois capins apresentaram contagens semelhantes de esporos de *P. chartarum* que variaram de 0 a 50.000 esporos por grama de forrageira. A saponina protodioscina foi detectada nos capins *Brachiaria* e *Andropogon*, ocorrendo em maior quantidade nas pastagens de *Brachiaria* e na época chuvosa. Foi observado que apesar dos bovinos mantidos em *Andropogon* apresentarem vantagem no desempenho, os exames laboratoriais e histológicos dos animais mantidos em ambas as pastagens apresentaram resultados semelhantes^{34,64}. Ocorreu um aumento da AST, GGT e bilirrubinas, indicando presença de alteração hepática crônica nos bovinos alimentados com os dois tipos de capim^{34,64}. Os resultados histológicos indicam que a presença de alterações hepáticas degenerativas e inflamatórias independe do tipo de capim ingerido pelos bovinos. Os macrófagos espumosos estiveram presentes no parênquima hepático e no linfonodo mesentérico dos bovinos alimentados com os dois tipos de capim, mas com maior ocorrência nos animais alimentados com capim *Brachiaria*. Bovinos com maior número de macrófagos espumosos no fígado apresentaram pesos menores^{64,65}.

Ao término desse estudo, inevitavelmente novos desafios foram estabelecidos pela equipe. Como a variável ganho em peso sofre influências do indivíduo, do ambiente e da ocorrência de enfermidades e maioria dos bovinos, independentemente do tipo de capim ingerido, apresentou graus variáveis de alteração hepática com presença de correlações negativas com o peso, fica claro que são necessários mais estudos que visem quantificar as possíveis perdas em decorrência do menor desenvolvimento de bovinos alimentados com capim *Brachiaria* spp. A ocorrência de alteração hepática crônica, em bovinos alimentados com os capins *Brachiaria* e *Andropogon*, confirmada pelo aumento da AST, GGT e bilirrubinas e pela presença de colangiohepatite acompanhada grande número de macrófagos espumosos ocupando grande extensão de parênquima hepático, é fortemente sugestiva de esporidesminotoxicose na forma subclínica. Portanto são necessários estudos que avaliem a capacidade de produção de esporidesmina pelas cepas brasileiras de *P. chartarum*, bem como a realização do isolamento e a quantificação da micotoxina⁶⁴.

Diante da manutenção das lacunas no esclarecimento do mecanismo etiopatogênico da intoxicação de ruminantes mantidos em pastagens de braquiárias, uma vez que os trabalhos deste e de outros grupos de pesquisa falharam no estabelecimento da intoxicação experimental por braquiária em bovinos, optou-se por tentar um modelo experimental que incluísse ovinos. Neste contexto, foram desenvolvidas a dissertação de mestrado intitulada “Avaliação clínico-laboratorial, histopatológica hepática e desempenho de ovinos alimentados com feno de braquiária ou cana-de-açúcar”⁶⁶ e a tese de doutorado “Fatores que interferem nas concentrações de saponinas em braquiárias e intoxicação experimental em bovinos”⁴⁶.

A dissertação de mestrado foi desenvolvida com o objetivo de avaliar a função hepática e o desempenho de ovinos alimentados com feno de *Brachiaria brizantha* ou cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), por meio de exames clínicos, laboratoriais, análise macro e microscópica do fígado. Os animais, independentemente da alimentação fornecida, apresentaram desempenho semelhante e alteração bioquímica da função hepática, com diminuição nos níveis séricos de colesterol total e elevação de GGT, acompanhados de alterações histológicas características de leve colangite⁶⁶. Assim, os achados não implicaram as saponinas como causadora das lesões nos animais alimentados com *Brachiaria brizantha*.

A cada estudo desenvolvido algumas perguntas eram respondidas e inúmeras lacunas eram abertas. Por essa razão, estudos mais controlados começaram a ser executados e a tese de doutorado abarcou vários deles: a avaliação dos fatores que afetam as concentrações de saponina esteróide e esporos do fungo *P. chartarum* em *Brachiaria brizantha* (BB) e *Brachiaria decumbens* (BD); a determinação do efeito do estágio de crescimento da planta nas

concentrações de saponinas esteróides em BB e BD e a correlação entre protodioscina, saponina e fibras das gramíneas; avaliação do efeito da ensilagem ou fenação sobre as concentrações de saponina esteróide em BB e BD; e os efeitos da alimentação com feno de BB contendo saponina esteróide em bezerros⁴⁶.

Canteiros de braquiárias (*B. decumbens* e *B. brizantha*) foram plantados com intuito de avaliar as saponinas e a presença do fungo *Pithomyces chartarum*. Foi observado que a *B. decumbens* contém maiores quantidades de protodioscina que a *B. brizantha* e que as plantas jovens contêm maior quantidade de protodioscina. Em relação ao fungo, observou-se que as plantas mais velhas apresentaram maior quantidade de esporos dos fungos em ambas as braquiárias. No estudo, relacionou-se também a quantidade de saponinas com a idade e a concentração de fibras nas plantas. Foi constatado que a idade da planta influenciou na quantidade de protodioscina, sendo que plantas mais jovens, com baixa concentração de fibras, apresentaram maiores quantidades de protodioscina. Assim, pôde-se sugerir a atuação das saponinas no sistema de defesa das plantas, já que plantas jovens têm maiores concentrações de protodioscina devido à baixa deposição de fibras na parede celular. Devido a essa baixa deposição de fibras, as plantas jovens, não têm a barreira física completamente formada. Desta forma, maiores quantidades de saponinas as protegem contra fungos e bactérias, o que poderia afetar também os herbívoros^{46,67}.

Paralelamente, buscando o estabelecimento de modelos experimentais da intoxicação, o estudo anterior também avaliou os efeitos da fenação e da ensilagem sobre as concentrações de saponina e o efeito do feno de braquiária na alimentação de bovinos⁴⁶. Foi observado que no processo de ensilagem as saponinas não são mais detectadas após quatro dias na *B. brizantha* e que reduzem em 80% na *B. decumbens*, sendo que nesta última as concentrações chegam a zero após 20 dias^{46,68}. Os bovinos alimentados com o feno de braquiária foram comparados com animais que receberam cana de açúcar. Alterações compatíveis com hepatopatia como presença macrófagos espumosos, infiltrado de células inflamatórias mononucleares, degeneração macrovacuolar e necrose de coagulação no fígado foram observadas em ambos os grupos, não podendo ser atribuída a participação das saponinas no processo⁴⁶.

Nesta fase de desenvolvimento da linha de pesquisa as principais considerações sobre o estado da arte serão descritas a seguir. Nos últimos anos, diante da evidência que as cepas do fungo *Pithomyces chartarum* encontradas no Brasil, na sua maioria, não são produtoras de esporidesmina, os estudos sobre fotossensibilização hepatógena priorizaram a avaliação das propriedades tóxicas da *Brachiaria*, especialmente a identificação e quantificação

de saponinas esteroidais. Infelizmente a ausência de grupos no Brasil trabalhando com o fungo resultou na impossibilidade de realização do isolamento e quantificação da micotoxina⁴⁶.

Como, mesmo depois de vários anos de estudo, a etiopatogenia da intoxicação hepatógena de ruminantes alimentados com *Brachiaria* ainda não estava completamente esclarecida, optou-se por uma outra abordagem do problema, a busca da origem dos macrófagos espumosos no fígado dos bovinos.

A primeira abordagem foi a realização da dissertação de mestrado intitulada “Macrófagos espumosos: estudo comparativo entre placas de aterosclerose em seres humanos e fígado de bovinos”, com o objetivo de avaliar a expressão de receptores de membrana de macrófagos espumosos das placas de aterosclerose em humanos e do fígado de bovinos clinicamente saudáveis mantidos em pastagem de *Brachiaria* sp. A reação granulomatosa do fígado de bovinos apresenta semelhanças em relação à reação encontrada em placas de aterosclerose em seres humanos, especialmente quanto a presença das células espumosas. Outra similaridade é a maior concentração dessas células próximas a veia terminal hepática, ou seja, próximo de endotélio. Considerando-se que a etiopatogenia da aterosclerose está bem caracterizada, esperava-se que um estudo comparativo utilizando diferentes marcadores imunoistoquímicos, para macrófagos espumosos, pudesse elucidar pontos importantes ainda obscuros na etiopatogenia do processo que determina o surgimento dessas células em fígado de bovinos aparentemente saudáveis⁶⁹.

A hipótese que sustentou o estudo foi proposta por Fioravanti² que relatou que uma das mais expressivas alterações encontradas em bovinos alimentados com braquiária foi a presença dos macrófagos espumosos, sobretudo devido ao grande número de células observadas. Em alguns animais as quantidades eram tão significativas que ocorria substituição de extensão apreciável de parênquima hepático por granulomas. Essas células apareceram de forma isolada ou em grandes aglomerados, caracterizando uma inflamação crônica do tipo granulomatosa.

Em sua discussão, Fioravanti² informa que os macrófagos espumosos são células de citoplasma abundante, com inúmeros vacúolos pequenos de lipídios, que dão ao citoplasma a aparência de espuma⁷⁰. Essas células foram observadas em vários processos: tumores de mama⁷¹; xantomas ou xantogranulomas da pele^{72,73}; glomeruloesclerose⁷⁴, pulmão⁷⁵, placas de arteriosclerose^{70,73,76} e em fígado, baço e linfonodos de bovinos e ovinos mantidos em pastos de braquiária^{32,77-79}. Os macrófagos espumosos podem ser encontrados em qualquer sítio de lesão celular e reação inflamatória, como resultado da fagocitose do colesterol das membranas das células destruídas⁷⁰.

Fioravanti² relata ainda que os macrófagos podem agrupar-se de modo bastante peculiar e são capazes de fagocitar quantidades crescentes de substâncias estranhas ao organismo, à medida que permanecem por mais tempo nos locais onde existe estes materiais. Neste caso, os fagócitos apresentam-se, inicialmente, como células isoladas e jovens, que evoluem para ninhos de células hipertróficas maduras e, finalmente, dão origem a granulomas bem formados⁸⁰. Esta cronologia de eventos foi observada nas lesões granulomatosas do seu estudo, bem como por Silva⁷⁷. No estudo de Fioravanti² os macrófagos espumosos, tanto na forma de células isoladas como de granulomas, apresentaram o mesmo padrão de distribuição no lobo direito e esquerdo do fígado. Em ordem decrescente foram encontrados na região periácinar, mediozonal, dentro do espaço porta e na região centroacinar. Esta maior prevalência na região periácinar também foi descrita em outros estudos^{32,77,79}. Os macrófagos espumosos ocorreram em 67,57% (n= 150) dos bovinos estudados por Fioravanti² e em 52,2% (n= 94) dos estudados por Silva⁷⁷.

Segundo Fioravanti² algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar a causa do surgimento dos macrófagos espumosos no fígado dos bovinos estudados. A presença de degeneração gordurosa extensa resultando em morte de hepatócitos pode desencadear o surgimento dos macrófagos espumosos⁷⁰. Esta possibilidade foi excluída, porque nos bovinos avaliados, a degeneração gordurosa não foi uma característica relevante e a necrose pouco ocorreu. Além disso, o processo inflamatório manteve-se limitado ao espaço porta e o maior acúmulo de macrófagos espumosos ocorreu na região periácinar.

Para Fioravanti², no caso da arteriosclerose o mecanismo de acúmulo de lipídios no interior dos macrófagos já está bem definido. O macrófago espumoso deriva da internalização da LDL modificada por oxidação, via receptores inespecíficos (*scavenger*)^{81,82}. O macrófago espumoso estoca em seu citoplasma colesterol livre e esterificado⁸³. A LDL oxidada é tóxica em decorrência da lesão oxidativa que causa à membrana do lisossoma, provocando vazamento das enzimas para o citosol⁸⁴. Além disso provoca alteração na síntese do DNA, na estrutura da membrana plasmática e na função celular⁸⁵.

A oxidação enzimática e não enzimática do colesterol produz uma série de produtos chamados oxisteróis. Nos alimentos são formados por processos não enzimáticos de oxidação, especialmente a auto-oxidação. Essas substâncias são citotóxicas, aterogênicas, mutagênicas e carcinogênicas. Os oxisteróis alteram a LDL desencadeando o aparecimento de macrófagos espumosos⁸⁶. O estresse oxidativo, por diminuição dos mecanismos de proteção do organismo⁸² ou pela presença de uma substância exógena capaz de produzir lipoperoxidação também promovem a oxidação do LDL e consequentemente o surgimento dos macrófagos espumosos.

Silva⁷⁷ imputou o aparecimento dessas células à alguma substância trazida pelo sangue até o fígado, sugerindo a possibilidade de haver relação com a esporidesmina. Driemeier e colaboradores⁷⁹ atribuíram a presença dos macrófagos espumosos a obstrução de ductos biliares decorrente da contínua ingestão de *Brachiaria* sp.

Frente a todas essas considerações alguns pontos foram levantados por Fioravanti². Apesar de um número muito grande de animais apresentarem a colangiohepatite não foram observados sinais histopatológicos e bioquímicos de colestase. Portanto, não se pode atribuir a presença dos macrófagos à obstrução biliar.

Como a esporidesmina é rapidamente auto-oxidada, gerando radicais superóxidos⁸⁷ esses radicais podem ocasionar, no fígado, a peroxidação de lipídios, que, por sua vez, poderia desencadear o surgimento de macrófagos espumosos. Um segundo ponto a ser considerado é o fato da lesão predominar em torno das veias terminais. Esta localização poderia indicar o envolvimento das células endoteliais no desencadeamento do processo². Hipótese semelhante é levantada por Spanel-Borowski e colaboradores⁸⁸, em estudo *in vitro* com células endoteliais de aorta de bovinos, que sugerem ser necessária a presença concomitante de monócitos e células endoteliais para que haja a formação das células gigantes multinucleadas.

Os resultados obtidos pelo trabalho de Trindade⁶⁹ foram pouco esclarecedores, pois foram relatados diversos problemas com os marcadores, especialmente porque os comercialmente disponíveis são específicos para humanos e roedores, praticamente não existindo, a época da realização do estudo, marcadores para macrófagos bovinos e não foi possível chegar a um resultado conclusivo que permitiria confirmar ser a aterosclerose poderia ser um modelo de etiopatogenia para a lesão no fígado de bovinos.

Mesmo diante deste resultado negativo, outros estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar se substâncias antioxidantes tem o potencial de reduzir o número de macrófagos espumosos no fígado de bovinos e conseqüentemente resultarem em melhor desempenho produtivo. Assim desenvolveu-se a tese de doutorado intitulada “Estresse oxidativo em bovinos confinados alimentados com feno de *Brachiaria* sp e suplementados com antioxidantes”. Nesse estudo acompanhou-se bovinos confinados recebendo feno de *B. briazantha* e suplementação com diferentes antioxidantes (vitamina E, selênio, zinco e selênio associado a vitamina E). Concluiu-se que a suplementação não alterou o estresse oxidativo nos eritrócitos mas, os antioxidantes reduziram o número de macrófagos espumosos presentes no parênquima hepático e a suplementação com selênio associado a vitamina E e a de zinco minimizam o dano oxidativo hepático⁸⁹.

Outra tese de doutorado, desenvolvida paralelamente com a anterior, intitulada “Avaliação clínica, laboratorial e produtiva de bovinos confinados e alimentados com feno de *Brachiaria* sp. e suplementados com antioxidantes” concluiu que a suplementação com antioxidantes não melhorou o desenvolvimento ponderal dos bovinos, as características de carcaça e a qualidade da carne. Os bovinos alimentados com feno de braquiária com baixas quantidades de saponina e de esporos do fungo *Phytomyces chartarum* não desenvolveram sinais clínicos de lesão hepática e a avaliação laboratorial indicou pequenos aumentos da bilirrubina direta e de globulina sugerindo presença de alteração hepática inflamatória crônica. A suplementação com antioxidantes não alterou o perfil metabólico dos bovinos alimentados com feno de braquiária, mas resultou na redução na quantidade dos macrófagos espumosos no fígado dos bovinos⁹⁰.

Fechando essa série realizou-se mais uma dissertação de mestrado intitulada “Avaliação dos macrófagos espumosos hepáticos e do peso de carcaça quente de bovinos criados extensivamente em *Brachiaria* spp.”. Na pesquisa foram analisados os pesos das carcaças de bovinos no momento do abate e correlacionado com as lesões observadas na fotossensibilização subclínica. Histologicamente, no tecido hepático, foram relatados degeneração do tipo microvacuolar, necrose, colangiohepatite e presença de macrófagos espumosos. No entanto, não houve correlação entre o peso da carcaça com a área comprometida do parênquima hepático contendo macrófagos espumosos⁹¹.

Além dos trabalhos utilizando animais de produção, tem-se tentado o desenvolvimento de modelo experimental em animais de laboratório. Esse modelo experimental poderia diminuir os custos, agilizar os processos, ter um melhor entendimento da etiopatogenia e trabalhar com as saponinas isoladas ao invés de trabalhar com a planta inteira. Em dados não publicados, os pesquisadores da linha de pesquisa têm realizado tentativas de induzir a intoxicação por saponinas em ratos e camundongos. No entanto, em ratos não foi possível constatar a intoxicação. Análises preliminares com os camundongos demonstraram que a dose necessária para intoxicação nesses animais pode ser inviável e possivelmente os animais são resistentes a toxicidade das saponinas. No entanto, o estudo ainda está em fase de análise de dados.

Diante do exposto e após os resultados do trabalho de Lima⁴⁶, a nova etapa da linha de pesquisa teve como foco a busca por padronizações que possam auxiliar no seguimento dos estudos, como o desenvolvimento de um padrão para a colheita e preservação de braquiária para a quantificação de saponinas, além de o desenvolvimento de um modelo experimental

viável que possa auxiliar no entendimento da etiopatogenia do processo. Dessa forma, trabalhos com esse intuito iniciaram-se em 2012 e deram origem a esta Tese de doutorado.

4. Justificativa e objetivos

Devido a relação entre a intoxicação e o consumo de plantas com saponinas ainda não estar claramente estabelecido, muitos estudos tentam reproduzir o quadro clínico com a de plantas que contem saponinas, sendo raro as pesquisas que trabalham com saponinas isoladas. Além disso, tentativas de induzir a intoxicação, mesmo com concentrações mais elevadas do que as encontradas nas plantas têm falhado, o que leva ao questionamento se somente as saponinas são suficientes para desencadear a intoxicação ou se há um sinergismo delas com outros fatores, como a presença de micotoxinas⁵⁰ ou de uma microflora intestinal ou ruminal específica⁹².

Diante de todas estas lacunas, o presente estudo teve como objetivos definir o método mais adequado de processamento e conservação de amostras de *Brachiaria* para a quantificação de saponina e avaliar a toxidez da sapogenina, presente na *Brachiaria*, em cobaias (*Cavia porcellus*).

Referências

1. Riet-Correa B, Castro MB, Lemos RA, Riet-Correa G, Mustafa V, Riet-Correa F. *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. *Pesqui Vet Bras*. 2011;31(3):183–92.
2. Fioravanti MCS. Incidência, avaliação clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos. Botucatu: Tese [Doutorado em Medicina Veterinária] - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 1999.
3. Brewer D, Russel DW, Amaral REM, Aycardi ER. An examination of North and South American isolates of *Pithomyces chartarum* for production of sporodesmin and sporidesmolides. *Proc N S Inst Sci*. 1989;38(2):73–81.
4. Knupp SNR, Knupp LS, Riet-Correa F, Lucena RB. Plants that cause photosensitivity in ruminants in Brazil. *Semin Agrar*. 2016;37(4):2009–20.
5. Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, Peixoto PV, Dobereiner J. Plantas tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro: Helianthus; 2012. 586 p.
6. Di Menna ME, Smith BL, Miles CO. A history of facial eczema (pithomycotoxicosis) research. *New Zeal J Agric Res*. 2009;52(4):345–76.
7. Pessoa CRM, Medeiros RMT, Riet-Correa F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesqui Vet Bras*. 2013;33(6):752–8.

8. Júnior M, Vilela L. Pastagens no cerrado: baixa produtividade pelo uso limitado de fertilizantes. Planaltina: Embrapa Cerrados; 2002. 32 p.
9. Hoffmann A, Moraes EHBK, Mousquer CJ, Simioni TA, Gomes FJ, Ferreira VB, et al. Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período seco. *Nativa*. 2014 Jun 26;2(2):119–30.
10. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2006 [Internet]. Ibge. 2009 [cited 2017 Feb 4]. p. 777. Available from: <http://www.ibge.gov.br/>
11. Alvim MJ, Botrel MA, Xavier DF. As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no País. Embrapa gado de Leite. Juiz de fora: Embrapa gado de leite; 2002. p. 3–6.
12. Seiffert NF. Gramíneas forrageiras do gênero *brachiaria*. Embrapa gado de corte. Campo Grande: Embrapa gado de corte; 1980. p. 83p.
13. Macedo MCM, Zimmer AH. Sistemas integrados de lavoura-pecuária na região dos cerrados do Brasil. In: Anais do Simpósio Internacional em Integração Lavoura-Pecuária; 2007 ago 13-15; Curitiba: Embrapa gado de corte; 2007. p. 1–24.
14. Macedo MCM. Pastagens no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: Anais do 42 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2005 ago 25-28. Goiânia: Associação Brasileira de Zootecnia; 2005. p. 56–84.
15. Barbosa JD, Oliveira CMC, Tokarnia CH, Peixoto PV. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. *Pesqui Vet Bras*. 2006;26(3):147–53.
16. Mustafa VS, Moscardini ARC, Borges JRJ, Reckziegel GC, Riet-Correa F, Castro MB. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. *Pesqui Vet Bras*. 2012;32(12):1272–80.
17. Brum KB, Haraguchi M, Lemos RAA, Riet-Correa F, Fioravanti MCS. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Pesqui Vet Bras*. 2007;27(1):39–42.
18. Graydon RJ, Hamid H, Zahari P, Gardiner C. Photosensitisation and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. *Aust Vet J*. 1991;68(7):234–6.
19. Cruz C, Driemeier D, Pires VS, Colodel EM, Taketa AT, Schenkel EP. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Vet Hum Toxicol*. 2000;42(3):142–5.
20. Castro MB, Santos Jr HL, Mustafa VS, CV G, Moscardini ACR, Louvandini H, et al. *Brachiaria* spp. poisoning in sheep in Brazil: experimental and epidemiological findings. In: *Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins*. Oxfordshire: CABI Head Office; 2009. p. 110–7.
21. Mustafa VS. Caracterização da intoxicação natural por *Brachiaria* spp . em ovinos no Brasil Central. Brasília: Dissertação [Mestrado em Saúde Animal] - Universidade de Brasília; 2009.
22. Russomanno OMR, Portugal MASC, Coutinho LN, Calil EMB, Figueiredo MB. *Leptosphaerulina Chartarum* (= *Pithomyces Chartarum*) e seu envolvimento no eczema facial. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)*. 2003;70(3):385–90.

23. Faccin TC, Riet-Correa F, Rodrigues FS, Santos AC, Melo GKA, Silva JA, et al. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naive and experienced sheep. *Toxicon*. 2014;82:1–8.
24. Albernaz TT, Silveira JAS, Silva NS, Oliveira CHS, Belo Reis ADS, Oliveira CMC, et al. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. *Pesqui Vet Bras*. 2010;30(9):741–8.
25. Pupin RC, Melo GKA, Heckler RF, Faccin TC, Ítavo CCBF, Fernandes CE, et al. Identification of lamb flocks susceptible and resistant against *Brachiaria* poisoning. *Pesqui Vet Bras*. 2016;36(5):383–8.
26. Sant’Ana FJF, Reis-Junior JL, Neto APF, Moreira-Junior CA, Vulcani VAS, Rabelo RE, et al. Plantas tóxicas para ruminantes do Sudoeste de Goiás. *Cienc Rural*. 2014;44(5):865–71.
27. Souza RIC, Riet-Correa F, Brum KB, Fernandes CE, Barbosa-Ferreira M, Lemos RAA. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. *Pesqui Vet Bras*. 2010;30(12):1036–42.
28. Pérez AJ, Hussain SM, Pecio Ł, Kowalczyk M, Herling VR, Stochmal A. Ultrahigh-performance liquid chromatography-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry based metabolomics reveals key differences between *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha*, two similar pastures with different toxicities. *J Agric Food Chem*. 2016;64(22):4686–94.
29. Santos Júnior HL. Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento da *Brachiaria decumbens* em ovinos. Brasília: Dissertação [Mestrado em Saúde Animal] - Universidade de Brasília; 2008.
30. Mendonça FS, Camargo LM, Freitas SH, Dória RGS, Baratella-Evêncio L, Neto JE. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens*. *Ciênc Anim Bras*. 2008;9(4):1034–41.
31. Lemos RAA, Nakazato L, Herrero Junior GO, Silveira AC, Porfirio LC. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. *Cienc Rural*. 1998;28(3):507–10.
32. Driemeier D, Barros SS, Peixoto PV, Tokarnia CH, Döbereiner J, Farias Brito M. Estudos histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”). *Pesqui Vet Bras*. 1998;18(1):29–34.
33. Moreira CN, Banys VL, Pinto AS, Franco LAF, Haragushi M, Fioravanti MCS. Bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon*: desempenho, avaliação da quantidade de esporos do fungo *Pithomyces chartarum* e teor de saponina das pastagens. *Ciênc Anim Bras*. 2009;10(1):184–94.
34. Moreira CN, Carvalho TF DE, Costa TN, Queiroz JACC, Lage G, Haragushi M, et al. Bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon*: hematologia e bioquímica clínica. *Ciênc Anim Bras*. 2009;10(1):195–205.
35. Sparg SG, Light ME, Van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol*. 2004;94(2):219–43.
36. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochem Rev*. 2010;9(3):425–74.

37. Morrissey JP, Osbourn AE. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(3):708–24.
38. Lacaille-Dubois MA, Pegnyemb DE, Noté OP, Mitaine-Offer AC. A review of acacic acid-type saponins from Leguminosae-Mimosoideae as potent cytotoxic and apoptosis inducing agents. *Phytochem Rev.* 2011;10(4):565–84.
39. Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr.* 2002;88(6):587–605.
40. Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry.* 2011;72(6):435–57.
41. Yendo ACA, Costa F, Gosmann G, Fett-Neto AG. Production of plant bioactive Triterpenoid saponins: Elicitation strategies and target genes to improve yields. *Mol Biotechnol.* 2010;46(1):94–104.
42. Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2002;75:31–49.
43. Ndamba J, Lemmich E, Mølgaard P. Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. *Phytochemistry.* 1994;35(1):95–9.
44. Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12923–8.
45. Brum KB, Haraguchi M, Garutti MB, Rosa B, Fioravanti MCS. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. *Cienc Rural.* 2009;39(1):279–81.
46. Lima FG. Fatores que interferem nas concentrações de saponinas em braquiárias e intoxicação experimental em bovinos. Goiânia: Tese [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás; 2012.
47. Patra AK, Saxena J. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr Res Rev* [Internet]. 2009;22(2):204. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0954422409990163
48. Soetan KO, Oyekunle M a, Aiyelaagbe OO, Fafunso M a. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum Bicolor* L . Moench. *African J Biotechnol Biotechnol.* 2006;5(23):2405–7.
49. Fonseca AJM, Dias-da-Silva AA. Efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen no desempenho produtivo de ruminantes – Revisão. *Rev Port Ciências Veterinárias.* 2001;96(538):60–4.
50. Wina E, Muetzel S, Becker K. The impact of saponins or saponin containing plant materials on ruminant production-A review. *J Agric Food Chem.* 2005;53:8093–105.
51. Wang JK, Ye JA, Liu JX. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance—a review. *Trop Anim Health Prod.* 2012;44(4):697–706.
52. Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr* [Internet]. 2002;88(6):587–605. Available from: <http://dx.doi.org/10.1079/BJN2002725>

53. Castro-Montoya JM, Makkar HPS, Becker K. Effects of monensin on the chemical composition of the liquid associated microbial fraction in an in vitro rumen fermentation system. *Can J Anim Sci.* 2011;91:433–48.
54. Hu W, Liu DJ, Wu Y, Guo Y, Ye J. Effects of tea saponins on in vitro ruminal fermentation and growth performance in growing Boer goat. *Arch Anim Nutr.* 2006;60(1):89–97.
55. Zhou M, Xu M, Ma X, Zheng K, Yang CR, Wang YF, et al. Antiviral triterpenoid saponins from the roots of *Ilex asprella*. *Planta Med.* 2012;78(15):1702–5.
56. Aslani MR, Movassaghi AR, Mohri M, Ebrahim-pour V, Mohebi AN. Experimental *Tribulus terrestris* poisoning in goats. *Small Rumin Res.* 2004;51(3):261–7.
57. Riet-Correa F, Medeiros RMT. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: Importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesqui Vet Bras.* 2001;21(1):38–42.
58. Miles CO, Wilkins AL, Erasmus GL, Kellerman TS, Coetzer JA. Photosensitivity in South Africa. VII. Chemical composition of biliary crystals from a sheep with experimentally induced geeldikkop. *Onderstepoort J Vet Res.* 1994;61(3):215–22.
59. Santos JCA, Riet-Correa F, Simões SVD, Barros CSL. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesqui Vet Bras.* 2008;28(1):1–14.
60. Miles CO, Munday SC, Holland PT, Smith BL, Embling PP, Wilkins AL. Identification of a sapogenin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. *N Z Vet J.* 1991;39(4):150–2.
61. Patel K, Gadewar M, Tahilyani V, Patel DK. A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: a concise report. *Nat Prod Bioprospect.* 2012;2:46–52.
62. Pires VS, Taketa ATC, Gosmann G, Schenkel EP. Saponins and sapogenins from *Brachiaria decumbens* Stapf. *J Braz Chem Soc.* 2002;13(2):135–9.
63. Brum KB. Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistema de pastejo. Goiânia: Tese [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás; 2006.
64. Moreira CNS. Avaliação clínico-laboratorial e desempenho de bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon*. Goiânia: Tese [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás; 2006.
65. Moreira CN, Moraes M, Garcia EC, Neto SC, Araújo EG, Fioravanti MCS. Bovinos alimentados com *Brachiaria* spp e *Andropogon gayanus*: alterações histológicas de fígados e linfonodos. *Ciênc Anim Bras.* 2009;10(1):206–18.
66. Lima FG de. Avaliação clínico-laboratorial, histopatológica hepática e desempenho de ovinos alimentados com feno de *Braquiária* ou cana-de-açúcar. [Goiânia]: Tese [Mestrado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás; 2009.
67. Lima FG, Ribeiro CS, Andrade, Diogo DF, Costa GL, Pires, Hugo CM, Guimarães VY, et al. Effects of *Brachiaria brizantha* Hay Containing a Steroidal Saponin in Lambs. *Int J Poisonous Plant Res.* 2012;2(1):20–7.
68. Lima FG de, Lee ST, Pfister JA, Miyagi ES, Costa GL, Silva RD da, et al. The effect of ensiling and haymaking on the concentrations of steroidal saponin in two *Brachiaria* grass species. *Cienc Rural.* 2015;45(5):858–66.

69. Trindade BR. Macrófagos espumosos: estudo comparativo entre placas de aterosclerose em seres humanos e fígado de bovinos. Goiânia: Dissertação [mestrado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás; 2006.
70. Cotran R., Kumar V, Collins TR. *Phatologic basis of disease*. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999. 1425 p.
71. Damiani S, Cattani MG, Buonamici L, Eusebi V. Mammary foam cells. Characterization by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Virchows Arch*. 1998;432(5):433–40.
72. Kodama H, Akiyama H, Nagao Y, Akagi O, Nohara N. Persistence of foam cells in rabbit xanthoma after normalization of serum cholesterol level. *Arch Dermatol Res*. 1988;280:108–13.
73. Jones TC, Hunt RD, King. N. W. *Veterinary pathology*. 6th ed. Baltimore: Willians & Wilkins; 1996. 1392 p.
74. Magil AB, Cohen AH. Monocytes and focal glomerulosclerosis. *Lab Invest*. 1989;61(2):404–9.
75. Shibuya K, Tajima M, Yamate J, Saitoh T, Nunoya T. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity enhances the development of pulmonary foam cells in rats fed a cholesterol-cholic acid diet. *Toxic Pathol*. 1997;25(5):487–94.
76. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Suenram CA, Rozek MM. Atherosclerosis as an inflammatory process. The roles of the monocyte-macrophage. *Ann NY Acad Sci*. 1993;691:115–20.
77. Silva LB. Alterações hepáticas em bovinos acometidos de “Doença periodontal” (cara inchada). [Belo Horizonte]: Dissertação [Mestrado] - Universidade Federal do Maranhão; 1989.
78. Lemos RAA, Ferreira LCL, Silva SM, Nakazato L, Salvador SC. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagens com *Brachiaria decumbens*. *Cienc Rural*. 1996;26(1):109–13.
79. Driemeier D, Döbereiner J, Peixoto PV, Brito MF. Relação entre macrófagos espumosos (“foam cells”) no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp no Brasil. *Pesqui Vet Bras*. 1999;19(2):79–83.
80. Goldner RD, Adams DO. The structure of mononuclear phagocytes differentiating in vivo. *Am J Pathol*. 1977;89(2):335–50.
81. Liu SX, Zhou M, Chen Y, Wen WY, Sun MJ. Lipoperoxidative injury to macrophages by oxidatively modified low density lipoprotein may play an important role in foam cell formation. *Atherosclerosis*. 1996;121:55–61.
82. Kinscherf R, Kamencic H, Deigner HP, Pill J, Schmiedt W, Schrader M, et al. Effect of alterations of blood cholesterol levels on macrophages in the myocardium of New Zealand white rabbits. *J Leukoc Biol*. 1997;62:719–25.
83. Yancey PG, Jerome WG. Lysosomal sequestration of free and esterified cholesterol from oxidized low density lipoprotein in macrophages of different species. *J Lipid Res*. 1998;39:1349–61.
84. Yuan XM, Li W, Olsson AG, Brunk UT. The toxicity to macrophages of oxidized low-density lipoprotein in mediated through lysosomal damage. *Atherosclerosis*. 1997;133:153–61.

85. Brown AJ, Dean RT, Jessup W. Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages. *Lipid Res.* 1996;37:320–35.
86. Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rapecas M, Boatella J. Biological effects of oxysterols: current status. *Fd Chem Toxic.* 1996;34(2):193–211.
87. Munday R. Studies on the mechanism of toxicity of the mycotoxin, sporidesmin. I. Generation of superoxide radical by sporidesmin. *Chem Biol Interact.* 1982;41(3):361–74.
88. Spänel-Borowski K, Herrmann G, Ricken AM, Davis WC. Evidence for the development of macrophage-like cells in long-term culture of bovine aortic endothelial cells. *Ann Anat.* 1997;179(6):535–44.
89. Silva RD. Estresse oxidativo em bovinos confinados alimentados com feno de brachiaria e suplementados com antioxidantes. Goiânia: Tese [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade federal de Goiás; 2014.
90. Lage GC. Avaliação laboratorial e produtiva de bovinos confinados com feno de Brachiaria sp. e suplementados com antioxidantes. Goiânia: Tese [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás; 2014.
91. Gonzaga BCF. Avaliação dos macrófagos espumosos hepáticos e do peso da carcaça quente de bovinos criados extensivamente em Brachiaria spp. Goiânia; 2016. p. 54.
92. Flaoyen A, Smith BL, Miles CO. An attempt to reproduce crystal-associated cholangitis in lambs in experimental dosing of sarsasapogenin or diosgenin alone and in combination with sporidesmin. *N Z Vet J.* 1993;41(4):171–4.

CAPÍTULO 2 – PADRONIZAÇÃO PARA COLHEITA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE *Brachiaria brizantha* UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS

Resumo

O gênero *Brachiaria* possui importantes espécies de forrageiras utilizadas em países de regiões tropicais. No entanto, esse gênero de gramíneas está associado à fotossensibilização e intoxicações em animais de produção. Deste modo, o objetivo deste estudo foi estabelecer padrão para colheita e método de processamento de amostras de *Brachiaria brizantha* para quantificação da saponina protodioscina e contagem de esporos de *Pithomyces chartarum*. Foram colhidas amostras de oito pastos as quais foram subdivididas em folhas jovens, folhas maduras, folhas velhas e planta inteira e submetidas a nove diferentes métodos de processamento. Após separação e tratamento das amostras foi realizada a quantificação de protodioscina e a contagem de esporos. Observou-se que na maioria dos tratamentos as folhas jovens apresentaram quantidades maiores de protodioscina que as folhas velhas e planta inteira. Os tratamentos que mantiveram as maiores quantidades de protodioscina foram temperatura ambiente, estufa e estufa com ventilação forçada. Nas amostras das pastagens não foram encontrados esporos do fungo. Desta forma, conclui-se que a concentração de protodioscina é maior nas folhas jovens; a secagem em temperatura ambiente, em estufa ou em estufa de ventilação são os melhores métodos para preservação de protodioscina e o congelamento de plantas para a quantificação de protodioscina não é recomendado.

Palavras-chave: braquiária, capim, fotossensibilização, protodioscina.

Standardization for harvesting and preservation of *Brachiaria brizantha* samples utilized to saponins quantification

Abstract

The genus *Brachiaria* has provided important forage species to the countries located in tropical regions. However, this genus of the grasses is associated with photosensitization and poisonous in farm production. Thus, the aim of this study was to establish the standard for the collection, processing and conservation of *Brachiaria brizantha* samples for protodioscin quantification and spore count from *Pithomyces chartarum*. Samples were collected from eight pastures, which were subdivided into young leaves, mature leaves, old leaves, and whole plant. After that, the samples were submitted to nine different drying and conservation treatments. After separation and treatment of the samples, saponins were quantified and spores were counted. In most of treatments, the young leaves presented larger amounts of protodioscin than the old leaves and the whole plant. The treatments that maintained the highest amounts of protodioscin were room temperature, oven, and oven with forced air circulation. No fungal spores were found in the pasture samples. Thus, we concluded that the concentration of protodioscin varies with the maturation stage of the leaves; drying at room temperature, in an oven, or in an oven with forced air circulation are the best methods, and freezing plants for preservation of protodioscin is not recommended.

Keywords: *Brachiaria*, grass, photosensitization, protodioscin.

1. Introdução

O gênero *Brachiaria* tem fornecido importantes espécies de forrageiras para os países localizados em regiões tropicais, dentre eles o Brasil. As espécies de *Brachiaria* sp. são amplamente utilizadas na formação de pastos por serem gramíneas de alta produção de matéria seca, por adaptarem a uma gama de tipos de solos e apresentarem crescimento bem distribuído durante a maior parte do ano¹. No entanto, esse gênero de gramíneas está associado a intoxicações em animais²⁻⁵, causando perdas substanciais para os produtores⁶⁻⁸.

Nas intoxicações por *Brachiaria* sp. os animais apresentam a forma clínica, no qual é evidenciado sinais de fotossensibilização ou podem apresentar uma síndrome progressiva que causa o emagrecimento e a morte dos animais, conhecida como a forma subclínica da doença. Em ovinos foram descritos sinais clínicos como, prurido, inquietação, fotofobia, edema de orelha, pálpebra e base da cauda, mucosas amareladas, lesões cutâneas (crostas na região dos olhos, focinho e orelha), cólica, depressão, apatia, anorexia, além de sinais clínicos relacionados ao sistema nervoso como incoordenação motora, tremor de cabeça, letargia, ataxia, depressão e coma antes da morte. Na avaliação da bioquímica renal e hepática observou-se aumento nas concentrações séricas de ureia, creatinina, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, bilirrubina total (BT) e na atividade sérica de gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST)⁹.

Alguns autores associam a toxicidade da *Brachiaria* sp. à presença de saponinas^{2,10,11}, para outros, os quadros de fotossensibilização são decorrentes da micotoxina esporidesmina produzida pelo fungo *Pithomyces chartarum*^{8,12}. É fato que as plantas relacionadas com a fotossensibilização associada a cristais contêm saponinas esteroidais e que os cristais biliares são produtos de seu metabolismo, mas isso não implica que elas sejam as únicas responsáveis pelas lesões hepáticas. É possível que fatores, tais como outras plantas ou micotoxinas, tenham efeito sinérgico ou levem ao metabolismo anormal que resulte na formação de cristais biliares^{13,14}. Assim os pesquisadores utilizam a quantificação de saponinas e a contagem dos fungos como uma ferramenta de apoio nas pesquisas que buscam elucidar a etiopatogenia da intoxicação de animais mantidos em pastagens de *Brachiaria* sp.

Para realizar a quantificação de saponinas e identificação do fungo *Pithomyces chartarum* amostras de *Brachiaria* sp. são colhidas de diferentes formas nas pastagens. A colheita pode ser realizada cortando a planta rente ao solo^{15,16}, a dez centímetros do solo¹⁷ e na altura de pastejo¹⁸. Existem ainda pesquisadores que não descrevem o método de colheita da *Brachiaria* sp. para contagem de *Pithomyces chartarum* ou quantificação de saponinas^{19,20}. É

importante salientar que podem ocorrer variações na quantidade de saponina das gramíneas conforme a época do ano e a idade da planta^{11,21,22}.

Frente ao exposto, devido a ampla variação das saponinas, os diferentes métodos de colheita e tratamento das amostras podem causar divergências nos valores e nos resultados dos experimentos, ocasionando uma falta de homogeneidade nos resultados quando comparados entre si. Deste modo, há a necessidade de estabelecer o padrão para colheita e armazenamento de amostras de *Brachiaria* spp. destinadas a quantificação de saponinas e contagem de esporos do fungo *Pithomyces chartarum*.

Assim, com este estudo objetivou-se estabelecer o padrão para colheita e processamento de amostras de *Brachiaria brizantha*, a serem utilizadas para a quantificação da saponina protodioscina e contagem de esporos do fungo *Pithomyces chartarum*.

2. Material e métodos

O estudo foi realizado na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (UFG) com colheita de amostras na Fazenda Tomé Pinto/UFG, localizada no município de São Francisco de Goiás, e na Embrapa Arroz e Feijão, localizada no município de Santo Antônio de Goiás. A quantificação de protodioscina nas amostras de pastos foi realizada no *Poisonous Plant Research Laboratory – United States Department of Agriculture (PPRL/USDA)*, na cidade de Logan (Utah, EUA).

As amostras de capim utilizadas neste estudo foram de oito pastos de *B. brizantha*, quatro da fazenda Tomé Pinto e quatro da Embrapa Arroz e Feijão. A colheita das amostras foi realizada seguindo a recomendação de 15 a 20 sub amostras por hectare, de forma que toda a área da pastagem fosse abrangida²³, as plantas foram colhidas rente ao solo em somente um momento, no mês de abril do ano de 2013. Após colheita e homogeneização da amostragem, foi realizada a subdivisão do material em folhas jovens (FJ), folhas maduras (FM), folhas velhas (FV) e planta inteira (PI), em metodologia adaptada de Ferreira²¹. As folhas jovens compreendiam as folhas em expansão, as folhas maduras compreendiam as folhas expandidas, as folhas velhas compreendiam as folhas senescentes e a amostra de planta inteira foi composta por toda a parte aérea da planta.

Posteriormente, alíquotas das amostras (FJ, FM, FV e PI) foram submetidas a diferentes métodos de processamento, que caracterizaram nove grupos, descritos a seguir: 1. secagem em temperatura ambiente (TA), 2. estufa (E), 3. estufa com circulação forçada (EVF),

4. congelamento seguido de secagem em temperatura ambiente (C+TA), 5. congelamento seguido de secagem em estufa (C+E), 6. congelamento seguido de secagem em estufa com circulação forçada (C+EVF), 7. congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa (C+TA+E), 8. congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa com circulação forçada (C+TA+EVF) e 9. *freezer dry* (FD).

Após a distribuição nos grupos, as amostras foram submetidas imediatamente aos diferentes métodos de processamento. O grupo TA permaneceu em temperatura ambiente (24 °C) por quatro dias consecutivos, os grupos E e EVF permaneceram em estufa por 48 horas a 55°C, as amostras congeladas (C+TA, C+E, C+EVF, C+TA+E, C+TA+EVF) permaneceram por sete dias em freezer e as FD foram congeladas por sete dias e submetidas ao processamento na sequência. Os grupos C+TA, C+E, C+EVF, após congelamento, foram processados da mesma forma que os TA, E e EVF. Os grupos C+TA+E, C+TA+EVF após sete dias de congelamento permaneceram por três horas em temperatura ambiente para descongelamento e posteriormente foram processados da mesma forma que os TA, E e EVF (Figura 1).

Para a quantificação da protodioscina, 100 mg das amostras secas e moídas em peneira de 2mm foram colocadas em tubos de 13 ml. Para a extração 5 ml de metanol foi adicionado a cada tubo e colocadas em agitador mecânico (30 rmp) por 30 min, em seguida foram centrifugadas por 10 min (3000 rpm) em temperatura ambiente para separação do resíduo de planta. Após centrifugação, o conteúdo líquido foi separado em outro tubo e o resíduo foi novamente extraído por mais duas vezes com metanol, repetindo o mesmo procedimento. Ao final, obteve-se 15 ml de conteúdo. Uma alíquota de 0,1 ml de metanol com o material extraído foi transferida para tubo de autoanálise de 1mL contendo 0,9 ml de ácido fórmico 0,1%. Uma alíquota de 5µL foi injetada automaticamente em equipamento de HPLC-ESI-MS (Thermo Finnigan, San Jose, CA USA)²⁴.

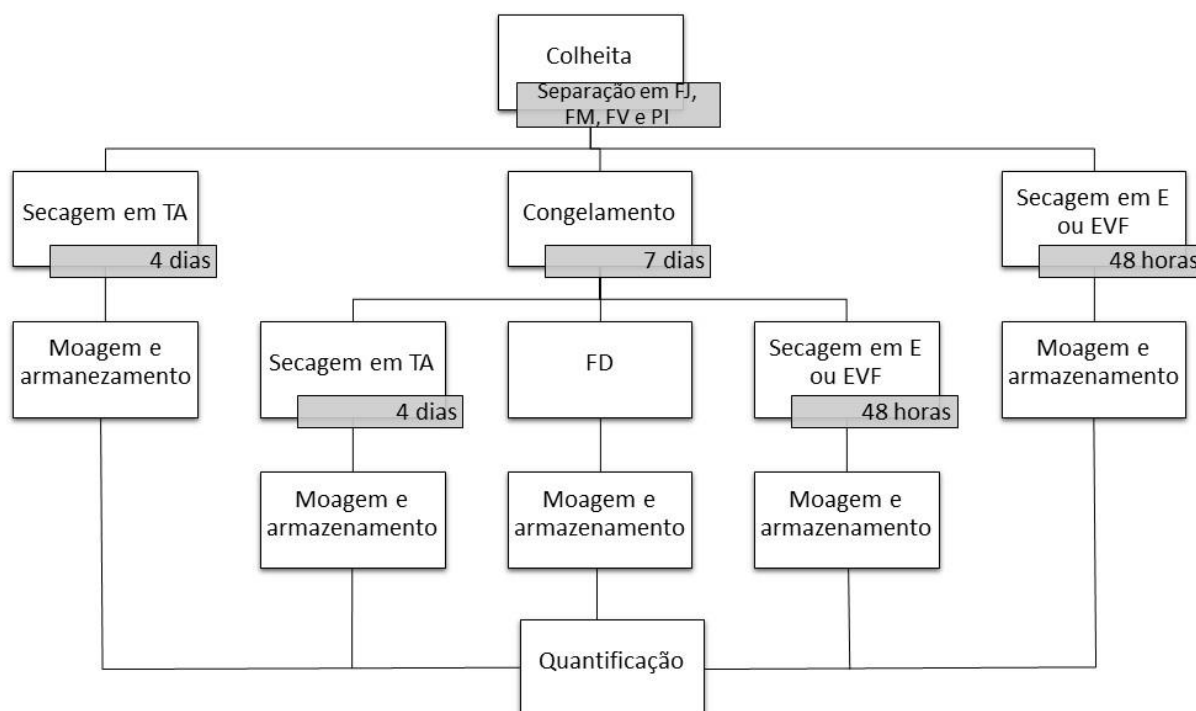


FIGURA 1 – Organograma do processamento das amostras de braquiária colhidas para a quantificação de protodioscina e contagem de esporos. FJ: folha jovem; FM: folha madura; FV: folha velha; PI: planta inteira; TA: temperatura ambiente; E: estufa; EVF: estufa de ventilação forçada; FD: *freezer dry*

A contagem dos esporos do fungo *Pithomyces chartarum* foi realizada utilizando a técnica descrita por DiMenna & Bailey²⁵. Para tanto foi misturada uma quantidade de matéria vegetal (60 g) com um volume dez vezes maior de água (600 ml). A mistura foi agitada por um minuto e posteriormente foi realizada a contagem em câmara de hematimetria (Neubauer). A quantidade de esporos contados em 2mm³ multiplicado por 5.000 foi à quantidade de esporos presentes em 1 grama de forrageira.

Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância em esquema fatorial (9 métodos de processamento x 4 estágios de desenvolvimento) em delineamento de blocos ao acaso. As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott considerando 5% de significância. Os blocos foram constituídos pelas parcelas de coleta, totalizando 8 blocos. Para realização das análises estatísticas foi utilizado o software R (R Core Team, 2016) com o pacote *easyanova*²⁶.

3. Resultados

Quando observados os valores para os diferentes tratamentos empregados para secagem das plantas observa-se, que nas folhas jovens, madura e na planta inteira, os valores foram significativamente maiores nos tratamentos TA, E e EVF em relação aos tratamentos C+TA, C+E, C+EVF, C+TA+E, C+TA+EVF e FD. Nas folhas jovens os tratamentos C+TA, C+E, C+EVF e C+TA+E não apresentaram diferença entre si, mas foram significativamente diferentes do tratamento FD. Nas folhas maduras e na planta inteira não houve diferença estatística entre os tratamentos C+TA, C+E, C+EVF, C+TA+E e FD. Não houve diferença entre os tratamentos nas folhas velhas.

Em relação as diferentes partes das plantas, observou-se resultados significativamente maiores nas FJ em relação as FM, FV e PI, nas FM em relação as FV e PI, e na PI em relação a FV. Esses resultados foram iguais para os tratamentos TA, E e EVF. Os valores para as FJ e FM foram iguais nos tratamentos C+TA, C+E, C+EVF e C+TA+E.

TABELA 1 – Valores de protodioscina para diferentes partes da planta e método de processamento de amostras de *Brachiaria* sp., colhidas na Fazenda Tomé Pinto/UFG e Embrapa Arroz e Feijão

	FJ(%)	FM(%)	FV(%)	PI(%)
TA	1,65±0,25 ^{Aa}	1,15±0,22 ^{Ab}	0,31±0,18 ^{Ad}	0,80±0,47 ^{Ac}
E	1,52±0,29 ^{Aa}	1,16±0,19 ^{Ab}	0,33±0,20 ^{Ad}	0,71±0,39 ^{Ac}
EVF	1,49±0,25 ^{Aa}	1,12±0,19 ^{Ab}	0,39±0,26 ^{Ad}	0,73±0,37 ^{Ac}
C+TA	0,89±0,43 ^{Ba}	0,63±0,37 ^{Ba}	0,25±0,18 ^{Ab}	0,32±0,19 ^{Bb}
C+E	0,85±0,36 ^{Ba}	0,64±0,41 ^{Ba}	0,25±0,16 ^{Ab}	0,34±0,21 ^{Bb}
C+EVF	0,77±0,32 ^{Ba}	0,72±0,35 ^{Ba}	0,23±0,14 ^{Ab}	0,32±0,15 ^{Bb}
C+TA+E	0,80±0,29 ^{Ba}	0,61±0,36 ^{Ba}	0,24±0,16 ^{Ab}	0,31±0,15 ^{Bb}
C+TA+EVF	0,99±0,37 ^{Ba}	0,66±0,36 ^{Bb}	0,29±0,19 ^{Ac}	0,35±0,17 ^{Bc}
FD	0,48±0,15 ^{Ca}	0,37±0,18 ^{Ba}	0,17±0,11 ^{Aa}	0,21±0,13 ^{Ba}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna demonstram diferença significativa entre tratamentos. Letras minúsculas diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa entre idades; **FJ**: folhas jovens; **FM**: folhas maduras; **FV**: folhas velhas; **PI**: planta inteira; **TA**: temperatura ambiente; **E**: estufa; **EVF**: estufa de ventilação forçada; **C+TA**: congelamento seguido de secagem em temperatura ambiente; **C+E**: congelamento seguido de secagem em estufa; **C+EVF**: congelamento seguido de secagem em estufa de ventilação forçada; **C+TA+E**: congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa; **C+TA+EVF**: congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa com ventilação forçada; **FD**: freezer dryer.

Nos tratamentos C+TA, C+E, C+EVF e C+TA+E os valores de FJ e FM não foram significativamente diferentes entre si, mas foram maiores que nas FV e PI. Nesses tratamentos não houve diferença significativa entre os valores de FV e PI.

As FJ tiveram valores significativamente maiores as FM, FV e PI no tratamento C+TA+EVF. Nesse mesmo tratamento os valores de FM foram maiores que FV e PI, as quais não apresentaram valores diferentes entre si. No tratamento FD não houve diferença significativa entre as diferentes partes da planta.

Na comparação entre os tratamentos em cada parte da planta, os grupos que mantiveram as maiores quantidades de protodioscina para as FJ foram TA, E e EVF. Nas FM o grupo FD foi significativamente menor que os grupos TA, E e EVF, e o grupo E foi significativamente maior que o C+TA+EVF. Nas FV não foram observadas diferenças entre os grupos. Na PI a única diferença encontrada foi entre TA e FD, onde os valores de protodioscina foram superiores em TA (Figura 2).

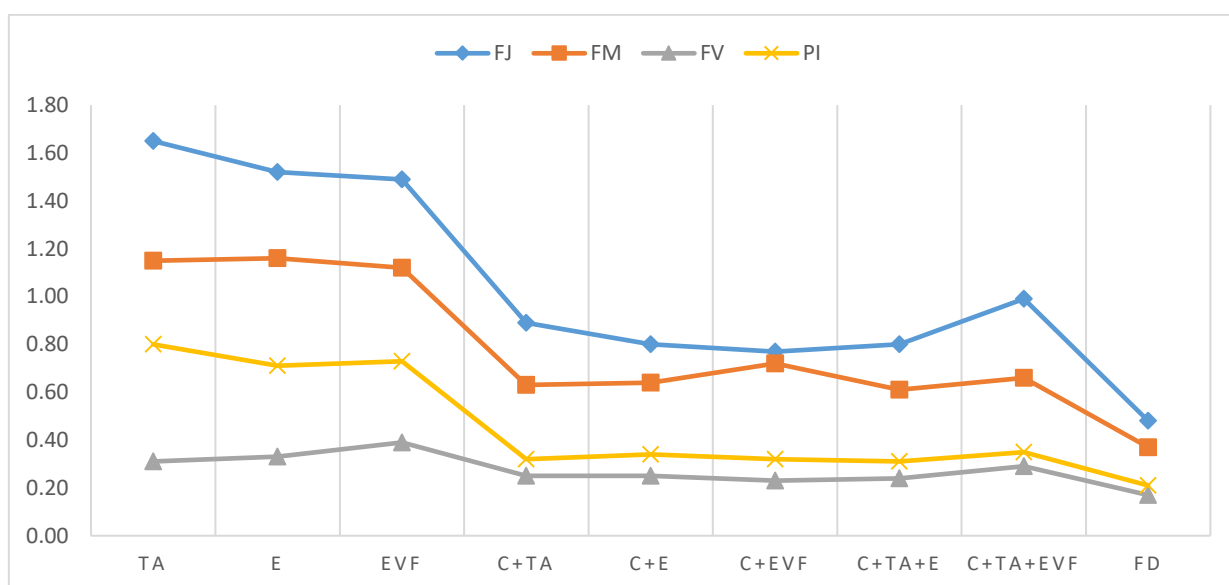


FIGURA 2 – Concentração de protodioscina em diferentes estágios fisiológicos e tratamentos para amostras de *Brachiaria* sp., colhidas na Fazenda Tomé Pinto/UFG e Embrapa Arroz e Feijão

FJ: folhas jovens; FM: folhas maduras; FV: folhas velhas; PI: planta inteira; TA: temperatura ambiente; E: estufa; EVF: estufa de ventilação forçada; C+TA: congelamento seguido de secagem em temperatura ambiente; C+E: congelamento seguido de secagem em estufa; C+EVF: congelamento seguido de secagem em estufa de ventilação forçada; C+TA+E: congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa; C+TA+EVF: congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa com ventilação forçada; FD: *freezer dryer*.

Nas amostras das pastagens analisadas não foram encontrados esporos do fungo *Pithomyces chartarum*.

4. Discussão

No presente estudo, observou-se que com o envelhecimento das folhas da braquiária a quantidade de protodioscina presente decresce, sugerindo variação de acordo com o estado fisiológico das plantas. Segundo Dinan²⁷ o conteúdo de saponinas nas plantas depende de inúmeros fatores, como a cultivar, a idade, localização geográfica, diferentes partes das plantas, podendo estar em maior quantidade nas folhas, sementes e flores e menor quantidade no caule. Grande parte dos estudos realizados apresentam resultados semelhantes com os encontrados neste estudo, com maiores quantidades de saponinas nas plantas jovens^{21,22}. A avaliação de *B. brizantha* e de *B. decumbens* por 13 meses mostrou que com o amadurecimento da planta as concentrações de protodioscina diminuem, passando, respectivamente, de 1,87% e 2,33% em plantas jovens para 0,47% e 1,03% em plantas maduras²². A concentração de protodioscina avaliada por 16 meses em *B. brizantha* e em *B. híbrida* cv. Mulato foi, respectivamente, nas folhas jovens de 3,76% ($\pm 0,73$) e 4,62% ($\pm 0,44$) e nas folhas velhas de 1,80% ($\pm 0,54$) e 1,75% ($\pm 0,72$)²¹.

Neste estudo, independente do tratamento, a maior concentração de protodioscina foi encontrada nas folhas jovens. O alto conteúdo de saponinas nas porções jovens da planta serve como proteção do ataque de predadores²⁸, garantindo que a planta tenha desenvolvimento total e chegue à idade reprodutiva²⁹. No entanto, quando à idade reprodutiva, a planta depende da polinização de insetos e outros animais que utilizam do néctar para a alimentação, o que explica a diminuição da quantidade de metabólitos secundários, garantindo a polinização²⁹.

A presença de folhas em brotação também é associada a maior ocorrência de intoxicação em pastagens de braquiária. Têm-se relatado que animais mantidos em pastagens com plantas mais jovens têm maior chance de apresentarem sinais de intoxicação do que animais que alimentam em pastos com plantas mais velhas²².

Outras plantas que têm a presença de saponina e sapogeninas também apresentam diminuição na concentração com o amadurecimento. Em pesquisa com *Agave americana* e *Agave salmiana* foi observado uma diminuição de quase metade da quantidade de saponinas quando da aproximação da idade reprodutiva da planta²⁹. Em amostras de *Trigonella foenum-graecum* essa diminuição também foi observada, onde a maior quantidade de saponinas foi encontrada nas plantas jovens diminuindo significativamente quando comparadas com as amostras das mesmas plantas já amadurecidas³⁰.

Apesar de neste estudo o grau de maturação da folha ter interferido nas concentrações de protodioscina, nem sempre as maiores concentrações de saponinas são

encontradas nas plantas jovens. No estudo de Faccin³¹, com *B. brizantha* colhida durante o período chuvoso, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de protodioscina em folhas com diferentes estados de maturação. Já no estudo de Brum¹¹, no qual avaliou-se amostras de *B. decumbens* e *B. brizantha*, em diferentes estágios de desenvolvimento, durante o período chuvoso, a maior concentração de protodioscina estava presente na fase de queda de sementes e em menores concentrações na fase inicial da planta.

Em relação aos métodos de processamento empregados nos grupos, pode-se observar que as amostras que foram congeladas tiveram uma menor quantidade de protodioscina quando comparadas com as amostras que não passaram por nenhum processo de resfriamento. Esta diferença foi encontrada principalmente nas folhas jovens. Observou-se também que os tratamentos utilizados nos grupos TA, E e EVF foram os que mais satisfatoriamente conservaram a protodioscina não havendo a necessidade de equipamentos mais sofisticados como o *freezer dryer* para o processamento de amostras para esse fim. Possivelmente o maior conteúdo de água nas plantas afeta a quantidade de saponina, no entanto, não foram encontradas evidências científicas que pudessem explicar esse fato. Acrescenta-se que o tratamento térmico com aumento de temperatura aos quais as amostras foram submetidas não alterou de forma significativa as concentrações de protodioscina em amostras de *Brachiaria brizantha*.

As concentrações de protodioscina em produtos vegetais podem variar de acordo com o tratamento térmico aos quais são submetidos. Em amostras de aspargos estocadas por 28 semanas à -18C° observou-se que as concentrações de saponinas se mantiveram estáveis até a vigésima semana, decrescendo 40% da vigésima para a vigésima oitava semana. A estabilidade das saponinas durante esse período provavelmente teve relação com a menor decomposição enzimática e microbiológica nessa temperatura³².

No presente estudo, observou-se grande diminuição nas concentrações de protodioscina quando as amostras são congeladas. Portanto, não se recomenda que tal procedimento seja utilizado. As quantidades de protodioscina não diminuiriam substancialmente quando utilizados os tratamentos realizados nos grupos E e EVF quando comparado ao tratamento realizado no grupo TA, sendo recomendado a utilização desse tratamento quando houver a necessidade de secagem mais rápida das amostras. Acrescenta-se que apesar da diferença significativa das FJ para as PI nos grupos TA, E e EVF, a separação nas diferentes partes da plantas somente seria necessária quando houver necessidade de avaliar particularidades no comportamento ingestivo da espécie a ser estudada. Deste modo, a forma

mais prática de obtenção de plantas para quantificação de saponinas seria a colheita da planta inteira com secagem em temperatura ambiente ou estufa, seja de circulação forçada ou não.

A ausência de esporos do fungo *Pithomyces chartarum*, em pastagens de braquiária, evidenciada neste estudo, também foi observada em outros trabalhos^{2,3,16,33,34}. O manejo adequado das pastagens pode estar relacionado a esse fato, pois evita o acúmulo de material vegetal, o qual serve de substrato para a esporulação do fungo, reduzindo sua proliferação³⁵ e, consequentemente o número de esporos encontrados.

5. Conclusões

Em relação a amostras de *Brachiaria brizantha* foi possível concluir que: a concentração de protodioscina varia com o estado de maturação das folhas, sendo maior nas folhas jovens e menor em folhas velhas; a secagem em temperatura ambiente, em estufa ou em estufa de ventilação forçada utilizando a planta inteira são os melhores métodos para a colheita e processamento das gramíneas destinadas a quantificação de protodioscina; o congelamento de amostras de braquiária para a quantificação de protodioscina não é recomendado.

Agradecimentos. Ao CNPq pelo financiamento por meio do Edital Universal (472480/2013-8) e pela bolsa na primeira etapa do trabalho, a CAPES pela bolsa para o Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior e pela bolsa na segunda etapa e ao *Poisonous Plant Laboratory Research/USDA* por disponibilizar sua estrutura e equipe para a pesquisa.

Referências

1. Seiffert NF. Gramíneas forrageiras do gênero *brachiaria*. Embrapa gado de corte. Campo Grande: Embrapa gado de corte; 1980. p. 83p.
2. Lemos RAA, Ferreira LCL, Silva SM, Nakazato L, Salvador SC. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagens com *Brachiaria decumbens*. Cienc Rural. 1996;26(1):109–13.
3. Lemos RAA, Nakazato L, Herrero Junior GO, Silveira AC, Porfirio LC. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. Cienc Rural. 1998;28(3):507–10.
4. Saturnino KC, Mariani TM, Barbosa-Ferreira M, Brum KB, Fernandes CES, Lemos RA.

- Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. *Pesqui Vet Bras.* 2010;30(3):195–202.
5. Souza RIC, Riet-Correa F, Brum KB, Fernandes CE, Barbosa-Ferreira M, Lemos RAA. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. *Pesqui Vet Bras.* 2010;30(12):1036–42.
 6. Fagliari JJ, Passipieri M, Okuda HT, Silva SL, Silva PC. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2007;59(6):1355–8.
 7. Costa AMD. Plantas tóxicas de interesse pecuário nas microrregiões de Araguaína e Bico do Papagaio, Norte do Tocantins. Araguaiana: Dissertação [Mestrado em Ciência Animal] - Universidade Federal do Tocantins; 2009.
 8. Fioravanti MCS. Incidência, avaliação clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos. Botucatu: Tese [Doutorado em Medicina Veterinária] - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 1999.
 9. Albernaz TT, Silveira JAS, Silva NS, Oliveira CHS, Belo Reis ADS, Oliveira CMC, et al. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. *Pesqui Vet Bras.* 2010;30(9):741–8.
 10. Barbosa JD, Oliveira CMC, Tokarnia CH, Peixoto PV. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. *Pesqui Vet Bras.* 2006;26(3):147–53.
 11. Brum KB, Haraguchi M, Garutti MB, Rosa B, Fioravanti MCS. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. *Cienc Rural.* 2009;39(1):279–81.
 12. Fagliari JJ, Okuda HT, Pereira GT, Passipieri M. Efeito de zinco suplementar nos sintomas de fotossensibilização causada pela esporidesmina em bovinos jovens. *ARS Veterinária.* 2003;19(1):96–103.
 13. Miles CO, Munday SC, Holland PT, Smith BL, Embling PP, Wilkins AL. Identification of a sapogenin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. *N Z Vet J.* 1991;39(4):150–2.
 14. Munday SC, Wilkins AL, Miles CO, Holland PT. Isolation and structure elucidation of dichotomin, a furostanol saponin implicated in hepatogenous photosensitization of sheep grazing *Panicum dichotomiflorum*. *J Agric Food Chem.* 1993;41:267–71.
 15. Brum KB. Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistema de pastejo. Goiânia: Tese [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás; 2006.
 16. Mustafa VS. Caracterização da intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. Brasília: Dissertação [Mestrado em Saúde Animal] - Universidade de Brasília; 2009.
 17. Saturnino KC. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos. Campo Grande: Dissertação [Mestrado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2009.
 18. Santos Júnior HL. Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento da *Brachiaria decumbens* em ovinos. Brasília: Dissertação [Mestrado em Saúde Animal] - Universidade de Brasília; 2008.

19. Moreira CNS. Avaliação clínico-laboratorial e desempenho de bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon*. Goiânia: Tese [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás; 2006.
20. Mendonça FS, Camargo LM, Freitas SH, Dória RGS, Baratella-Evêncio L, Neto JE. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens*. *Ciênc Anim Bras*. 2008;9(4):1034–41.
21. Barbosa-Ferreira M, Pfister JA, Gotardo AT, Maiorka PC, Górnica SL. Intoxication by *Senna occidentalis* seeds in pregnant goats: Prenatal and postnatal evaluation. *Exp Toxicol Pathol*. 2011;63(3):263–8.
22. Lima FG, Lee ST, Pfister JA, Fioravanti MCS, Riet-Correa F. Análise de saponina protodioscina por HPLC-ESI-MS em *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens* durante 13 meses. *Veterinária e Zootecnia* 2011;18 (4 Suppl 3);576-579.
23. Genro TCM, Orqis MG. Informações básicas sobre coleta de amostras e principais análises químico-bromatológicas de alimentos destinados a produção de ruminantes. Embrapa. Bagé: Embrapa Pecuária Sul; 2008. p. 24.
24. Lima FG. Fatores que interferem nas concentrações de saponinas em braquiárias e intoxicação experimental em bovinos. Goiânia: Tese [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás; 2012.
25. DiMenna ME, Bailey JR. *Pithomyces chartarum* spore counts in pasture. *NZJAgriRes*. 1973;16:343–51.
26. Arnhold E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Bras J Vet Res Anim Sci*. 2013;50(6):488–92.
27. Dinan L, Harmatha J, Lafont R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *J Chromatogr A*. 2001;935(1–2):105–23.
28. Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. 2011;72(6):435–57.
29. Leal-Díaz AM, Santos-Zea L, Martínez-Escobedo HC, Guajardo-Flores D, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldivar SO. Effect of *Agave americana* and *Agave salmiana* ripeness on saponin content from Aguamiel (*Agave Sap*). *J Agric Food Chem*. 2015;63(15):3924–30.
30. Ortuño A, Oncina R, Botía JM, Del Río JA. Distribution and changes of diosgenin during development of *Trigonella foenum-graecum* plants. Modulation by benzylaminopurine. *Food Chem*. 1998;63(1):51–4.
31. Faccin TC, Riet-Correa F, Rodrigues FS, Santos AC, Melo GKA, Silva JA, et al. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naive and experienced sheep. *Toxicon*. 2014;82:1–8.
32. Schwarzbach A, Schreiner M, Knorr D. Effect of cultivars and deep freeze storage on saponin content of white asparagus spears (*Asparagus officinalis* L.). *Eur Food Res Technol*. 2005;222(1–2):32–5.
33. Brum KB, Haraguchi M, Lemos RAA, Riet-Correa F, Fioravanti MCS. Crystal-ystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Pesqui Vet Bras*. 2007;27(1):39–42.
34. Lima FG, Ribeiro CS, Andrade DDF, Guimarães VY, Costa GL, Silva AS, et al. Avaliação histopatológica hepática e desempenho de ovinos alimentados com feno de

- Brachiaria Brizantha ou cana de açúcar. Ciênc Anim Bras 2009; Suppl 1:360-366.
35. Russomanno OMR, Portugal MASC, Coutinho LN, Calil EMB, Figueiredo MB. Leptosphaerulina Chartarum (= Pithomyces Chartarum) e seu envolvimento no eczema facial. Arq Inst Biol (Sao Paulo). 2003;70(3):385–90.

CAPÍTULO 3 – TOXICIDADE SUBCRÔNICA DE DIOSGENINA EM *Cavia porcellus*

Resumo

As saponinas são metabólitos secundários das plantas relacionadas ao seu sistema de defesa. Devido sua grande diversidade e de suas propriedades, têm sido amplamente utilizadas em pesquisas científicas para produção de medicamentos. Apesar disso, algumas plantas contendo saponina têm efeitos tóxicos aos animais. Diante do exposto, objetivou-se com este estudo a avaliação da *Cavia porcellus* como modelo experimental na intoxicação pela saponina diosgenina. Para o estudo foram utilizadas 14 cobaias, divididas em dois grupos, o grupo tratado (GT) e o grupo controle (GC). O GT recebeu 480 mg/kg de diosgenina diluída em óleo vegetal e o GC recebeu somente o óleo vegetal, ambos por 30 dias. Para avaliação do hemograma e análises bioquímicas foram colhidas amostras sanguíneas no dia 0 (M0) e no dia 30 (M30). Na bioquímica plasmática foram realizadas análises para ALT, AST, GGT, ALP, ureia, creatinina, glicose, colesterol, HDL, triglicerídeos, lactato, colinesterase e cálcio. A hematologia e a bioquímica não apresentaram alterações relacionadas à doença hepática causada por saponinas. Na histologia apenas um animal apresentou hiperplasia de ductos biliares, as outras alterações observadas foram de forma geral inespecíficas. Conclui-se que, na dose utilizada, a administração da diosgenina a cobaias não produz lesões hepáticas expressivas nem alterações hematológicas e bioquímicas relacionadas a hepatopatia.

Palavras-chave: braquiária, esporidesmina, fotossensibilização, hemograma, saponina

Subchronical toxicity of diosgenin in guinea pigs *Cavia porcellus*

Abstract

Saponins are secondary metabolites of plants related to their defense system. Due their great diversity and their properties, the saponins have been widely used in scientific research for the production of medicines. Despite this, some plants containing saponins have been caused poisonous to animals. Thus, the aim of this study was the evaluation of *Cavia porcellus* as an experimental model for intoxication by diosgenin. For the study, 14 guinea pigs were divided into two groups, the treatment group (TG) and the control group (CG). The TG received 480 mg/kg of diosgenin and the CG received only vegetable oil. Both groups received the treatment for 30 days. Blood samples were collected on day 0 (M0) and day 30 (M30) for blood cell count and biochemical analyzes. In clinical biochemistry, the analyzes were performed for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma glutamyl transferase, alkaline phosphatase, urea, creatinine, glucose, cholesterol, HDL, triglycerides, lactate, cholinesterase, and calcium. Hematology and biochemistry did not present alterations, which could not be related to hepatic disease caused by saponins. In histology, only one animal had bile duct hyperplasia, the other alterations observed were generally nonspecific. Therefore, we concluded that the administration of 480 mg/kg of diosgenin to guinea pigs did not produce significant hepatic lesions or hematological and biochemical alterations related to liver disease.

Keywords: Blood cell count, photosensitization, saponin, signal grass, sporidesmin

1. Introdução

As saponinas são um grupo de glicosídeos distribuídos nas plantas superiores que têm a habilidade de reduzir a tensão superficial de soluções aquosas, formando espuma, quando submetidos à agitação¹. As saponinas consistem em uma molécula de açúcar usualmente contendo glicose, galactose, ácido glucônico, xilose e ramnose ligadas a uma aglicona hidrofóbica (sapogenina) que pode ser um triterpeno ou um esteróide natural².

Devido aos diferentes usos benéficos das saponinas, como o poder antitumoral, potencial hipoalergênico, melhoria na reprodução animal, atividade antioxidante, entre outras, vários estudos utilizando essa substância no desenvolvimento de medicamentos e cosméticos tem sido desenvolvidos³. Apesar do potencial valor benéfico das saponinas, algumas plantas contendo essas moléculas têm causado efeitos tóxicos aos animais⁴. As intoxicações por saponinas e sapogeninas são relatadas em decorrência do consumo, principalmente, de *Tribulus terrestris*, *Agave lecheguilla*, *Nartheceum ossifragum* e gramíneas do gênero *Brachiaria*^{5,6}.

Os efeitos tóxicos das saponinas ocasionam sinais de fotossensibilização seguida de degeneração hepática e renal, podendo causar, ainda, problemas gastrointestinais, como gastroenterites e diarreia⁴. Nos animais acometidos pela intoxicação com plantas que contém saponinas pode-se observar dano hepático caracterizado pela deposição de substâncias cristalinas em torno⁷ e dentro dos ductos biliares, nos macrófagos espumosos e no lúmen de túbulos renais⁸.

No Brasil, as plantas que contem saponinas e que estão mais associadas com a intoxicação são as gramíneas do gênero *Brachiaria*. Nas plantas desse gênero já foi relatada a presença de diferentes saponinas (protodioscina⁸ e dioscina) e sapogeninas (diosgenina e yamogenina)⁶, algumas delas relacionadas à fotossensibilização hepatógena e a intoxicação em animais. Mais comumente os casos de intoxicação são relatados em animais de produção, podendo acometer bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos^{5,6,9-11}.

Nas intoxicações por *Brachiaria* spp. os animais apresentam sinais de fotossensibilização ou podem apresentar uma síndrome progressiva causando emagrecimento e morte, mas sem apresentarem sinais clínicos de fotossensibilização^{5,12}. Podem apresentar também sinais clínicos como prurido, inquietação, fotofobia, edema de orelha, pálpebra e base da cauda, mucosas amareladas e lesões cutâneas, além de sinais clínicos neurológicos como incoordenação motora, tremor de cabeça, ataxia, depressão e coma antes da morte. Na avaliação da bioquímica renal e hepática observa-se aumento nas concentrações séricas de ureia,

creatinina, bilirrubina conjugada, bilirrubina não conjugada, bilirrubina total e na atividade sérica de gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST)¹³.

Nos exames histopatológicos do fígado observa-se tumefação e vacuolização de hepatócitos, além de graus variáveis de fibrose periportal, hiperplasia de células epiteliais dos ductos biliares, retenção biliar, infiltrado periportal, macrófagos espumosos, cristais birrefringentes no interior dos ductos biliares, células gigantes multinucleadas com núcleos distribuídos no citoplasma ou na periferia.¹² Bovinos clinicamente saudáveis, mantidos em pastagem de *Brachiaria* spp., podem também apresentar grandes quantidades de macrófagos espumosos no fígado e linfonodos mesentéricos, sugerindo a intoxicação^{14,15}.

A intoxicação experimental em animais de produção é realizada, na maioria, das vezes utilizando a administração das plantas que contêm saponinas^{8,13}. No entanto, esse método pode suscitar dúvidas quanto ao fato dos resultados estarem relacionados somente com as saponinas ou poder haver outros elementos relacionados ao capim^{4,16}. Apesar disso, a utilização de saponinas isoladas nas intoxicações muitas vezes se torna impeditiva devida a grande quantidade de material necessário para a intoxicação de um animal de produção. Assim a utilização de animais de menor porte e que sejam herbívoros, como a cobaia, poderia gerar resultados mais próximos ao que ocorre em herbívoros de porte maior.

Assim, apesar de inúmeros experimentos serem desenvolvidos com animais de produção, alimentados em pastagens cultivadas com *Brachiaria*, pouco se sabe do real papel desempenhado pelas saponinas e sapogeninas nas intoxicações. Dessa forma, com este trabalho objetivou-se a avaliação da *Cavia porcellus* como modelo experimental na intoxicação por diosgenina por meio de análises hematológicas, bioquímicas e histológicas.

2. Material e métodos

O estudo foi realizado após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFG, sob protocolos nº 014/13 e nº 049/16, e seguiu todos os preceitos éticos recomendados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

Neste estudo, foram utilizados 14 animais (*Cavia porcellus*), com idade variando de três a seis meses, de ambos os sexos. Os animais foram adquiridos de criatórios comerciais e mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (ICB/UFG) durante o período de adaptação e experimentação. Os animais foram acomodados em caixas de polietileno com medidas de 60×50×22, com cama de maravalha de pinus. O

macroambiente do biotério dispunha de temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram alimentados com ração comercial (Ração Coelho, Comigo, Rio Verde, Goiás), *ad libitum*. A água também ficava disponível *ad libitum*, foi trocada diariamente e suplementada com 300mg/L de vitamina C (Vita-Vet C[®], Vetnil, Louveira, SP)¹⁷.

Os animais foram divididos em dois grupos de sete animais cada, o grupo tratado (GT) e o grupo controle (GC). O GT recebeu 480 mg/kg de diosgenina diluído em óleo vegetal e o GC recebeu quantidade proporcional somente de óleo vegetal. A dose de diosgenina foi baseada na quantidade da sapogenina que animais à pasto ingeririam por dia e em experimento piloto prévio. Tanto o GT como o GC receberam o tratamento durante um período de 30 dias, por meio de gavagem, realizada uma vez ao dia, de modo a simular uma intoxicação sub crônica. A diosgenina utilizada no experimento foi adquirida comercialmente com pureza de 98% (Hefei Joye Import & Export Co., Ltd, Hefei, China). A gavagem foi realizada adaptando a técnica descrita por Ning¹⁸.

Diariamente na manipulação dos animais para gavagem, foi realizada avaliação clínica observando mudanças de comportamento ou sinais clínicos sugestivos de intoxicação. O peso dos animais foi avaliado semanalmente para ajuste da dose da diosgenina.

Para o hemograma e avaliação da bioquímica plasmática duas colheitas sanguíneas foram realizadas, uma no dia 0 (M0), antes do início da gavagem, e outra no dia 30 (M30), após 30 dias consecutivos de gavagem. Para as colheitas de sangue os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano e as amostras foram obtidas por venopunção da veia jugular em tubo heparinizado, obtendo-se aproximadamente 2 ml de amostra de cada animal.

O hemograma foi realizado em aparelho semiautomático BC 2800 VET (Mindray, Shenzhen, China). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada a partir de esfregaço sanguíneo. Para a avaliação da bioquímica plasmática as amostras foram centrifugadas e o plasma foi separado em alíquotas, sendo processadas imediatamente. As amostras sanguíneas foram avaliadas para alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), HDL, colesterol, triglicerídeos, colinesterase, cálcio, gama glutamiltransferase (GGT), glicose, lactato, creatinina e ureia. Foram utilizados reagentes comerciais da marca Labtest[®] (Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa – MG). Para a leitura utilizou-se de espectrofotômetro automático clínico Wiener Lab CM200 (Wiener Lab Group, Rosario, Argentina).

Para estabelecer o limite de referência para as enzimas plasmáticas e para o hemograma foi utilizado os valores dos animais no M0. Inicialmente calculou-se a média e o desvio padrão e para estabelecer os valores *outliers*, utilizou-se como limite máximo e mínimo

a média somada ou subtraída de duas vezes o desvio padrão, respectivamente. Posterior ao estabelecimento dos valores *outliers*, os mesmos foram retirados e novamente calculou-se a média e o desvio padrão. Foi considerado como valor de referência máximo a média acrescida ao desvio padrão e para o valor de referência mínimo, considerou-se a média subtraída do desvio padrão.

Ao final do período experimental, todos os animais foram submetidos à eutanásia por meio de anestesia profunda com isoflurano. Amostras de tecido hepático e de linfonodos mesentéricos foram colhidas para exames histológicos. As amostras foram fixadas em formol 10% tamponado, rotineiramente processadas e coradas por hematoxilina e eosina (HE) para exame microscópico.

O critério de avaliação das lâminas foi adaptado de Fioravanti¹⁹ e Moreira²⁰. Para descrever a localização das lesões utilizou-se a definição de Rappaport²¹ (1973), em que o ácino hepático é dividido em três zonas (zona 1-periportal, zona 2-mediozonal e zona 3-periacinar). As lesões foram caracterizadas quanto ao tipo, como degenerativas ou inflamatórias, e classificadas de acordo com sua distribuição (focal, multifocal e difusa) e intensidade (discreta, moderada e acentuada). Avaliou-se ainda a presença de macrófagos espumosos, hiperplasia de ducto, infiltrado periductal e colangiohepatite.

Ao final, todas as variáveis foram submetidas à análise de variância em esquema de parcelas subdivididas no tempo (2 tratamentos $\times$ 2 tempos), no delineamento inteiramente ao acaso. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey considerando 5% de significância. Para realização das análises estatísticas foi utilizado o software R²² com o pacote easyanova²³.

3. Resultados e discussão

A utilização de óleo vegetal como veículo para diluição da diosgenina foi devido a característica lipofílica e hidrofóbica das sapogeninas²⁴, o que possibilitou melhor homogeneização do produto e facilidade para a gavagem.

A opção pela utilização de cobaias (*Cavia porcellus*), se deu por ser um animal fundamentalmente herbívoro¹⁷, o que poderia reproduzir mais fielmente a fisiologia digestiva de outros herbívoros como ruminantes e equinos. São animais de fácil manejo e a gavagem foi realizada de maneira rápida e com o mínimo de estresse aos animais. O acesso venoso foi bastante difícil, mesmo com o animal anestesiado, o que impossibilitou que mais de duas colheitas sanguíneas fossem realizadas.

Os valores de referência para a bioquímica sérica encontrados na literatura apresentaram grande variação²⁵⁻²⁸. Dessa forma, optou-se por utilizar os valores de referência no M0, obtidos a partir dos animais utilizados no experimento. Os valores de referência calculados a partir dos dados obtidos demonstraram ser bem mais rigorosos, com limites máximos e mínimos mais próximos do que os valores descritos na literatura.

Os valores médios do hemograma dos animais de ambos os grupos estão dispostos na Tabela 1 e permaneceram dentro da faixa de normalidade quando comparados com os valores de referência, exceto para o hematócrito, hemoglobina, VCM e CHCM que estavam ligeiramente elevados no GT no M0. No leucograma, o número de leucócitos totais foi significativamente diferente entre o GC e GT no M0 ($p=0,039$) e entre o M0 e o M30 no GT ($p>0,001$). Os linfócitos apresentaram diferença significativa entre o GC e o GT no M0 ($p=0,020$) e entre o M0 e o M30 no GC ($p=0,046$) e no GT ($p<0,001$). Apesar das diferenças encontradas, nos leucócitos totais e linfócitos, entre o M0 e o M30 no GC e no GT, não se atribui ao consumo de diosgenina, pois as variações em ambos os grupos ocorreram de forma semelhante. Não foram encontradas na literatura consultada estudos que demonstrassem alterações no perfil hematológico de *Cavia porcellus* intoxicados com plantas que contém saponinas.

TABELA 1 – Hemograma e valores de referência de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Parâmetros	Primeira colheita		Segunda colheita		Valores de referência
	GC	GT	GC	GT	
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	4,58	4,80	4,82	5,04	4,41 - 5,14
Hematócrito (%)	37,78	41,47	41,76	45,13	35,53 - 43,73
Hemoglobina (g/dL)	11,51	12,73	12,54	13,86	10,32 - 13,32
VCM (fl)	82,78	80,70	81,88	89,73	79,66 - 88,72
HCM (pg)	25,20	26,50	25,98	27,44	25,02 - 27,27
CHCM (%)	30,53	30,64	29,18	30,64	31,13 - 30,28
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	593	492	505	449	654 - 543
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7.400 ^{Aa}	5.471 ^{Ab}	8.886 ^{Aa}	9.600 ^{aB}	4.645 - 8.226
Neutrófilo ($10^3/\text{mm}^3$)	1.184	1.591	980	1.727	324 - 2.028
Eosinófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	80	55	152	116	19 - 87
Basófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	12	39	15	0	0 - 60
Linfócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5.557 ^{aA}	3.470 ^{Ab}	7.269 ^{aB}	7.671 ^{aB}	2.796 - 6.231
Monócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	566	282	468	474	121 - 727

Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa dentro do grupo. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

Os valores médios obtidos na avaliação bioquímica estão expressos na Tabela 2. A atividade plasmática de ALT, AST e GGT e as concentrações plasmáticas de lactato, colinesterase, ureia, creatinina, colesterol, HDL e triglicerídeos não apresentaram diferença significativa. As variações observadas individualmente nos animais não apresentam, aparentemente, significado clínico.

TABELA 2 – Valores dos parâmetros bioquímicos e de referência de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Bioquímica Plasmática	Primeira colheita		Segunda colheita		Valores de referência
	GC	GT	GC	GT	
ALT (UI/L)	80,37	48,03	44,64	63,04	32,21 - 69,45
AST (UI/L)	148,55	134,29	67,53	90,45	46,25 - 235,50
GGT (UI/L)	12,16	15,05	21,34	21,17	9,38 - 18,04
ALP (UI/L)	235,82	126,90	180,65	125,80	77,04 - 246,32
Ureia (mg/dL)	52,11	56,24	48,63	57,97	47,16 - 61,20
Creatinina (mg/dL)	0,25	0,20	0,28	0,31	0,10 - 0,31
Glicose (mg/dL)	161,38 ^{Aa}	153,74 ^{Aa}	218,94 ^{Ba}	201,81 ^{Bb}	124,90 - 190,23
Colesterol (g/dL)	35,28	37,86	25,19	38,02	22,12 - 51,02
HDL (mg/dL)	3,65	2,11	2,08	1,41	0,74 - 4,18
Triglicerídeos (mg/dL)	84,83	96,28	111,8	133,67	60,80 - 120,31
Lactato (UI/L)	42,51	55,74	51,87	74,83	26,41 - 71,80
Colinesterase (UI/L)	4084	4486	4747	4242	3263 - 4985
Cálcio (mg/dL)	10,04 ^A	10,10 ^A	12,71 ^B	11,95 ^B	9,02 - 11,14

Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa dentro do grupo. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos; ALT: alanino aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamiltransferase; ALP: fosfatase alcalina; HDL: lipoproteína de alta densidade

O limite de referência para a atividade plasmática da ALT antes da intoxicação variou entre 32,21 a 69,45 UI/L, com média de 50,83 UI/L. Ao término do período experimental a média do GT aumentou em decorrência da elevação em seis animais, sendo que em dois deles o valor esteve acima da referência. No GC a média aos 30 dias foi menor, possivelmente devido a um animal no momento inicial apresentar valor muito elevado (238 UI/L), o que elevou a média do M0 em relação ao M30.

A atividade plasmática da AST no GC diminuiu aos 30 dias, devido a redução em cinco animais. Além disso, um animal apresentou valor elevado no M0 (325,3 UI/L), o que contribuiu para a maior média nesse momento. No GT observou a mesma diminuição no M30, com redução nos valores em quatro animais, e um animal no M0 apresentou valor elevado (300,10 UI/L).

As médias da atividade plasmática de GGT apresentaram acima do valor de referência no M30 nos dois grupos. Os valores de referência antes da intoxicação foram de 9,38 a 18,03 UI/L. No GC, aos trinta dias, seis animais apresentaram aumento nos valores, sendo que cinco estavam acima dos valores de referência. No GT observou-se aumento em quatro animais e cinco estavam acima dos valores de referência. Devido à elevação observada na maioria dos animais em ambos os grupos, ocorreu o aumento na média no M30. Apesar dos valores da média encontrados no M30 estarem acima dos valores de referência, não se pode atribuir à diosgenina administrada, pois o comportamento foi semelhante em ambos os grupos.

Os valores de referência da atividade plasmática de ALP variaram entre 77,04 a 246,32 UI/L, antes do início do tratamento. Observou-se entre o início e o término do período experimental que houve diminuição nos valores da atividade de ALP para o GC e manutenção dos no GT. No GC ao início do experimento quatro animais estavam com a atividade plasmática de ALP superior ao valor de referência e um animal apresentou valor bastante elevado (437,20 UI/L). No M30 seis animais apresentaram diminuição dos valores no GC, o que acarretou na queda da média em relação ao M0. No GC houve uma pequena diminuição em cinco animais nos valores de ALP no M30, o que não foi suficiente para alterar a média da atividade plasmática da enzima. Em ambos os grupos houve grande variação individual nos valores da enzima. No GC o intervalo foi de 25,68 a 437,20 UI/L e no GT de 22,63 a 212,90 UI/L. Essa variação também foi encontrada nos valores de referência citados na literatura. Hein & Hartmann²⁸ encontraram valores de atividade sérica de ALP entre 0 a 418 UI/L, Kitagaki²⁶ de 72 a 216 UI/L e Caisey & Duncan²⁷ o maior valor médio (876 UI/L).

De forma geral, intoxicações com envolvimento de saponina resultam em alterações nas enzimas hepáticas^{8,29}. Intoxicação com *T. terrestris* em ovelhas levou ao aumento na atividade enzimática da ALP e AST. Em bovinos e ovinos, intoxicações experimentais e surtos naturais decorrentes do consumo de plantas do gênero *Brachiaria* são acompanhados de aumento de AST, GGT^{5,30,20} e ALP¹³. Neste estudo este padrão de resposta não foi observado. Adicionalmente, Qin³¹ em intoxicação experimental em ratos com diosgenina relataram diminuição da AST e ALT, sugerindo que a sapogenina seria prejudicial somente em altas doses.

Os valores de referência para a ureia foram de 47,16 a 61,20 mg/dL e para creatinina de 0,10 a 0,31 mg/dL. Nos dois grupos em nenhum dos momentos houve alterações nos valores das médias de ureia e creatinina em relação aos valores de referência, mantendo-se uniforme nas duas colheitas (M0 e M30). Apesar disso é descrito que intoxicações por saponina, em

ovinos, podem também afetar o rim, o que pode levar ao aumento da creatinina e ureia sanguínea^{13,32}. Esta alteração não foi observada neste estudo.

Os valores de referência para glicose no M0 variaram de 124,90 a 190,23 mg/dL. As médias dos valores de glicose foram significativamente maiores no M30 em relação ao M0 para ambos os grupos (GC – $p=0,0087$; GT – $p=0,0226$). No GC todos os animais aumentaram os valores no M30, sendo que cinco tinham valores acima dos de referência nesse momento. No GT seis animais apresentaram aumento de glicose no M30, sendo que, quatro estavam com valores acima dos valores de referência. O aumento de glicose em todos os animais do GC e na maioria dos animais no GT causou o aumento na média no M30. O aumento da glicose pode ser atribuído à suplementação de vitamina C na água, pois o suplemento em questão tinha como veículo solução de glicose. Portanto, não foi possível associar esse aumento ao consumo de diosgenina. Apesar do aumento nos valores de glicose aqui encontrado, saponinas isoladas de outras plantas podem levar a diminuição da glicose^{3,33}.

A análise do lipidograma foi realizada para completar o perfil de avaliação hepática. Na lesão hepática aguda, o plasma pode conter valores altos de triglicerídeos, baixos de colesterol e padrão anormal de lipoproteínas³⁴. Neste estudo, a diosgenina não provocou alterações significativas no metabolismo dos lipídios. Os animais do GC apresentaram no M0 diminuição no valor de HDL, aumento de triglicerídeos e valores semelhantes para colesterol. No GT foi observado redução do valor de HDL, aumento de triglicerídeos e a média do valor de colesterol foi semelhante no M0 e no M30. Os valores limítrofes de colesterol e triglicerídeos encontrados neste estudo foram, respectivamente, de 22,12 a 51,02 mg/dL e de 60,08 a 120,31 mg/dL.

Os valores de referência para lactato, no início do experimento, estiveram entre 26,45 a 71,80 UI/L. As médias dos valores de lactato em ambos os grupos aumentaram no M30. No GC o lactato aumentou em cinco animais no M30, um animal tinha valores de lactato acima dos valores de referência no M0 e um no M30. No GT o lactato aumentou em cinco animais no M30, sendo que três animais tinham valores de lactato acima dos valores de referência. Portanto, esse aumento nos valores de lactato na maioria dos animais refletiu na média final, elevando a média em ambos os grupos. Aumento nos valores de lactato foram observados em camundongos após receberem saponinas de Ginseng³⁵. No entanto, no presente estudo o aumento foi semelhante nos dois grupos, não se pode atribuir ao consumo de diosgenina.

Os valores de referência para a colinesterase estiveram entre 3.263 a 4.985 mg/dL. Foi observado que quatro animais do GC apresentaram aumento no M30 e estavam acima do

valor de referência. No GT nenhum animal apresentou valor acima do de referência no M30 mas três animais apresentaram valores maiores de colinesterase no M30 em relação ao M0.

Os valores de referência no M0 de cálcio foram de 9,02 a 11,14 mg/dL. Ambos os grupos apresentaram valores de cálcio significativamente maiores no M30 comparado ao M0 (GC – $p = 0,0001$; GT – $p = 0,0086$). No GC cinco animais apresentaram aumento nos valores aos trinta dias, sendo que um tinha valor acima do de referência. No GT cinco animais tiveram os valores aumentados no M30, sendo que quatro estavam acima do valor de referência. Essas variações demonstraram resposta quantitativa em ambos os grupos, portanto, não se relaciona ao consumo de diosgenina.

Durante a necropsia, nos dois grupos, não foram encontradas alterações macroscópicas em nenhum órgão examinado. No exame microscópico do fígado, notou-se degeneração micro e macrovacuolar nos dois grupos (Figura 1), na frequência de 57% (4/7) dos animais para o GC e de 86% (6/7) para o GT. Em ambos os grupos as lesões estavam localizadas nas zonas 1, 2 e 3 (Tabela 3). A degeneração de hepatócitos está associada à intoxicação por plantas que contém saponinas^{30,32,36,37}, no entanto, no presente estudo tanto o GC quanto o GT apresentaram frequência semelhante, não podendo ser associada ao consumo de diosgenina.

TABELA 3 – Frequência de casos de vacuolização, segundo a intensidade e distribuição, em tecido hepático de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Grupo	Frequência	Distribuição			Intensidade		
		Focal	Difusa	Multifocal	D	M	I
Controle	4	-	1	3	1	1	2
Tratado	6	-	5	1	4	2	-

D: discreta; M: moderada; I: intensa

Infiltrado inflamatório no espaço porta com distribuição multifocal estava presente na frequência de 86% (6/7) nos animais do GC. No GT foi observado infiltrado inflamatório no espaço porta em 86% (6/7) dos animais, sendo que 50% (3/6) desses tinham distribuição focal e 50% (3/6) multifocal (Tabela 4). Infiltrado inflamatório periductal é associado a intoxicação por plantas que contém saponinas^{30,32,36,37}. Entretanto, no presente estudo, o infiltrado inflamatório estava presente em ambos os grupos em frequência semelhante e com intensidade semelhante.

TABELA 4 – Frequência de casos segundo a intensidade e distribuição de alteração inflamatória no espaço porta de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Grupos	Frequência	Distribuição			Intensidade (Grau)		
		Focal	Multifocal	Difusa	D	M	I
Controle	6	3	3	-	5	1	
Tratado	6	-	6	-	6	-	-

D: discreta; M: moderada; I: intensa.

Apesar da hiperplasia de ductos estar presente nas intoxicações associadas as saponinas, principalmente em ovinos^{32,36,37}, apenas um animal do GT apresentou esse achado (Figura 1). Outros achados comuns nas intoxicações relacionadas com saponinas como cristais birrefringentes nos ductos biliares e macrófagos espumosos^{5,32,36,37}, não foram observados nesse estudo. Dessa forma, acredita-se que as alterações encontradas não estão relacionadas exclusivamente a administração de diosgenina aos animais.

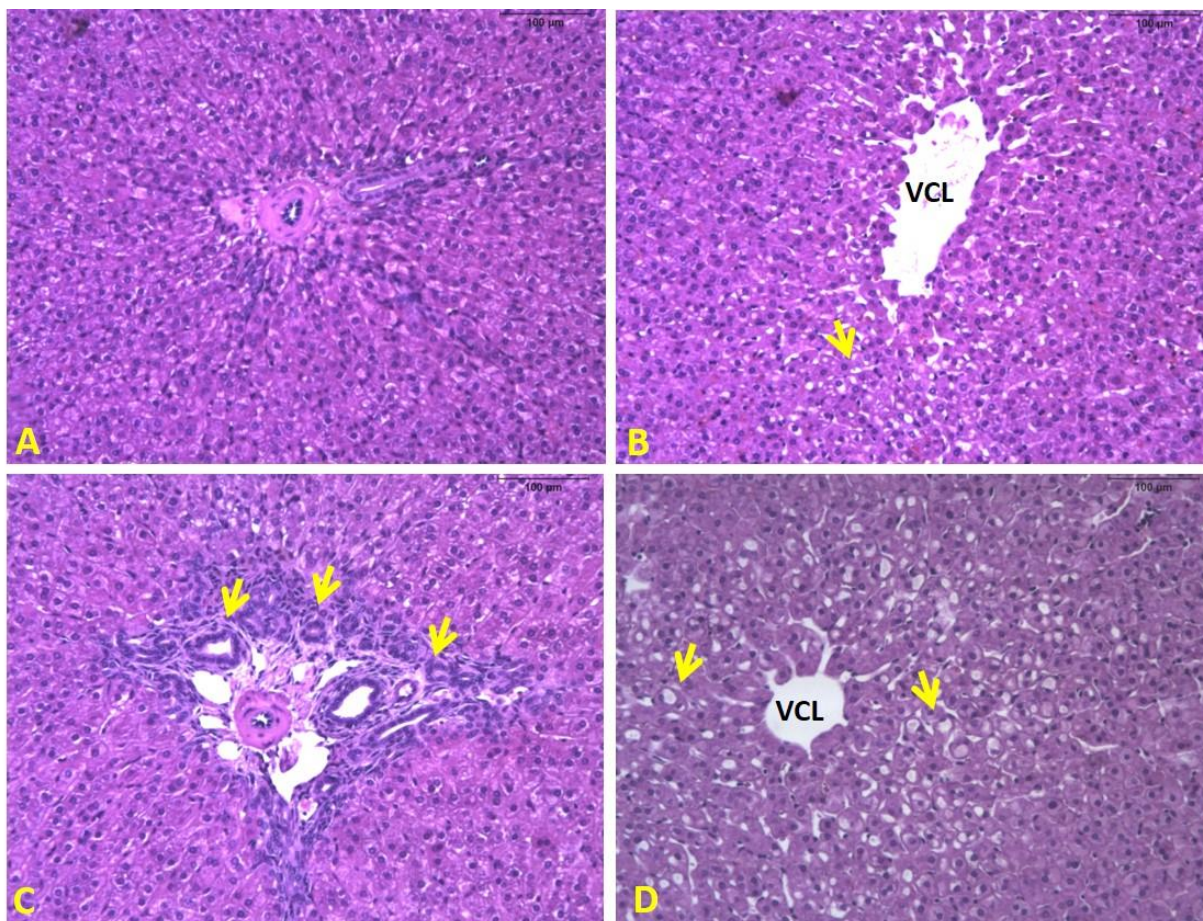


FIGURA 1 – Fotomicrografia de fígado de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina (HE, 100X). Grupo Controle: (A) Tríade portal evidenciando preservação da arquitetura. (B) Zona 3 com presença discreta de vacúolos citoplasmáticos (seta). Grupo Tratado: (C) Hiperplasia de ducto biliar (seta). (D) Zona 3 com presença moderada de vacúolos citoplasmáticos (seta); VCL – veia centrolobular

Os linfonodos de ambos os grupos apresentaram arquitetura preservada, não apresentando alterações. Embora não ter sido encontrado alterações nos animais deste estudo, é relatada a presença de grande quantidade de macrófagos espumosos nos linfonodos mesentéricos de animais alimentados com plantas com saponinas^{15,20}.

Apesar dos inúmeros relatos da intoxicação por plantas que contêm saponinas, muitas vezes não se consegue reproduzir os mesmos quadros de toxidez^{16,38}. Na alimentação de coelhos com *Brachiaria decumbens* durante 90 dias, não foi possível demonstrar a toxidez das saponinas contidas na gramínea. Os animais não apresentaram sinais clínicos de intoxicação nem alterações nos exames histopatológicos³⁸. Em estudo da toxidez de saponinas em ovelhas, somente foi possível reproduzir lesões no fígado quando as saponinas foram associadas à esporidesmina¹⁶. Adicionalmente, o tempo de intoxicação pode ocorrer de forma aguda a crônica, podendo levar meses para o aparecimento dos sinais clínicos. Em levantamento epidemiológico da intoxicação por *Brachiaria* foi encontrada diferença no tempo de intoxicação dos animais variando de 15 dias à mais de 12 meses, que pode ser atribuída à concentração de saponinas nas pastagens, à idade dos animais e à susceptibilidade individual³⁷. Desta forma acredita-se que nesse estudo, o não acometimento dos animais pela intoxicação por saponinas possa estar relacionado à baixa dose utilizada, o tempo de intoxicação não ter sido suficiente ou a necessidade de ter outros fatores envolvidos, como a possibilidade de uma flora intestinal específica ou mesmo ao sinergismo de micotoxinas presentes nas pastagens.

4. Conclusão

A administração de 480 mg/kg de peso vivo de diosgenina a cobaias por um período de 30 dias não produziu lesões hepáticas expressivas nem alterações hematológicas e bioquímicas relacionadas a hepatopatia. A cobaia não pode ser descartada como modelo experimental para estudo da intoxicação por saponinas em ruminantes. Além disso, a diosgenina isoladamente pode não ser a causa das intoxicações relacionadas as *Brachiarias* sp. Assim recomenda-se que novos estudos sejam realizados com doses mais altas e períodos mais longos, além, da associação da diosgenina com outras saponinas e sapogeninas encontradas nas *Brachiarias*.

Agradecimentos: Ao CNPq pelo financiamento por meio do Edital Universal (472480/2013-8) e pela bolsa na primeira etapa do trabalho, pela bolsa CAPES na segunda etapa, ao Hospital Veterinária/EVZ/UFG pelo apoio técnico para a realização do experimento e ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas/UFG por ceder local para manutenção dos animais.

Referências

1. Sparg SG, Light ME, Van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol*. 2004;94(2):219–43.
2. Morrissey JP, Osbourn AE. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63(3):708–24.
3. Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr*. 2002;88(6):587–605.
4. Wina E, Muetzel S, Becker K. The impact of saponins or saponin containing plant materials on ruminant production-A review. *J Agric Food Chem*. 2005;53:8093–105.
5. Riet-Correa B, Castro MB, Lemos RA, Riet-Correa G, Mustafa V, Riet-Correa F. *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. *Pesqui Vet Bras*. 2011;31(3):183–92.
6. Pires VS, Taketa ATC, Gosmann G, Schenkel EP. Saponins and sapogenins from *Brachiaria decumbens* Stapf. *J Braz Chem Soc*. 2002;13(2):135–9.
7. Cheeke PR. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *J Anim Sci*. 1995;73(3):909–18.
8. Brum KB, Haraguchi M, Lemos RAA, Riet-Correa F, Fioravanti MCS. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Pesqui Vet Bras*. 2007;27(1):39–42.
9. Lemos RAA, Ferreira LCL, Silva SM, Nakazato L, Salvador SC. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagens com *Brachiaria decumbens*. *Cienc Rural*. 1996;26(1):109–13.
10. Barbosa JD, Oliveira CMC, Tokarnia CH, Peixoto PV. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. *Pesqui Vet Bras*. 2006;26(3):147–53.
11. Brum KB, Haraguchi M, Garutti MB, Rosa B, Fioravanti MCS. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. *Cienc Rural*. 2009;39(1):279–81.
12. Souza RIC, Riet-Correa F, Brum KB, Fernandes CE, Barbosa-Ferreira M, Lemos RAA. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. *Pesqui Vet Bras*. 2010;30(12):1036–42.
13. Albernaz TT, Silveira JAS, Silva NS, Oliveira CHS, Belo Reis ADS, Oliveira CMC, et al. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. *Pesqui Vet Bras*. 2010;30(9):741–8.
14. Moreira CN, Banys VL, Pinto AS, Franco LAF, Haragushi M, Fioravanti MCS. Bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon*: desempenho, avaliação da quantidade de esporos do fungo *Pithomyces chartarum* e teor de saponina das pastagens. *Ciênc Anim Bras*. 2009;10(1):184–94.
15. Driemeier D, Barros SS, Peixoto PV, Tokarnia CH, Döbereiner J, Farias Brito M.

- Estudos histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”). *Pesqui Vet Bras.* 1998;18(1):29–34.
16. Flaoyen A, Smith BL, Miles CO. An attempt to reproduce crystal-associated cholangitis in lambs in experimental dosing of sarsapogenin or diosgenin alone and in combination with sporidesmin. *N Z Vet J.* 1993;41(4):171–4.
 17. Couto SER. Criação e Manejo de Coelho. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editors. *Animais de Laboratório: criação e experimentação.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 2002. p. 71–9.
 18. Ning C, Zhao H, Juan-mei Y, Yi-bo H, Yuan X. Modified gavage methods for guinea pigs. *Fudan Univ Med Sci.* 2010;37(2):232–5.
 19. Fioravanti MCS. Incidência, avaliação clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos. Botucatu: Tese [Doutorado em Medicina Veterinária] - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 1999.
 20. Moreira CN, Moraes M, Garcia EC, Neto SC, Araújo EG, Fioravanti MCS. Bovinos alimentados com *Brachiaria* spp e *Andropogon gayanus*: alterações histológicas de fígados e linfonodos. *Ciênc Anim Bras.* 2009;10(1):206–18.
 21. Rappaport AM. The structural and functional units of the human liver (liver acinus). *Microvasc Res.* 1973;6:212.
 22. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. [Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2013. Available from: <http://www.r-project.org/>.
 23. Arnhold E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Bras J Vet Res Anim Sci.* 2013;50(6):488–92.
 24. Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry.* 2011;72(6):435–57.
 25. Waner T, Avidar Y, Peh H, Zass R, Bogin E. Hematology and clinical chemistry values of normal and euthymic hairless adult male Dunkin-Hartley guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Vet Clin Pathol.* 1996;25(2):61–4.
 26. Kitagaki M, Yamaguchi M, Nakamura M, Sakurada K, Suwa T, Sasa H. Age-related changes in haematology and serum chemistry of Weiser-Maples guineapigs (*Cavia porcellus*). *Lab Anim.* 2005;39(3):321–30.
 27. Caisey JD, King DJ. Clinical chemical values for some common laboratory animals. *Clin Chem.* 1980;26(13):1877–9.
 28. Hein J, Hartmann K. Labordiagnostische Referenzbereiche bei Meerschweinchen. *Tierarztl Prax.* 2003;31(k):383–9.
 29. Mendonça FS, Camargo LM, Freitas SH, Dória RGS, Baratella-Evêncio L, Neto JE. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens*. *Ciênc Anim Bras.* 2008;9(4):1034–41.
 30. Brum KB, Haraguchi M, Lemos RAA, Riet-Correa F, Fioravanti MCS. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Pesqui Vet Bras.* 2007;27(1):39–42.
 31. Qin Y, Wu X, Huang W, Gong G, Li D, He Y, et al. Acute toxicity and sub-chronic

- toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2009;126(3):543–50.
32. Aslani MR, Movassaghi AR, Mohri M, Pedram M, Abavisani A. Experimental *Tribulus terrestris* poisoning in sheep: Clinical, laboratory and pathological findings. *Vet Res Commun.* 2003;27(1):53–62.
 33. Witthawaskul P, Panthong A, Kanjanapothi D, Taesothikul T, Lertprasertsuke N. Acute and subacute toxicities of the saponin mixture isolated from *Schefflera leucantha* Viguier. *J Ethnopharmacol.* 2003;89(1):115–21.
 34. Cornelius CE. A review of new approaches to assessing hepatic function in animals. *Vet Res Commun.* 1987;11(5):423–41.
 35. Harper N, Bittles AH. The effects of ginseng saponins on lactate dehydrogenase activity in the mouse. *Biochem Soc Trans.* 1983;11(4):356–7.
 36. Aslani MR, Movassaghi AR, Mohri M, Ebrahim-pour V, Mohebi AN. Experimental *Tribulus terrestris* poisoning in goats. *Small Rumin Res.* 2004;51(3):261–7.
 37. Mustafa VS, Moscardini ARC, Borges JRJ, Reckziegel GC, Riet-Correa F, Castro MB. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. *Pesqui Vet Bras.* 2012;32(12):1272–80.
 38. Faccin TC, Pupin RC, Leal PV, Gran C. Evaluation of the toxicity of *Brachiaria decumbens* in rabbits. 2016;38(2):143–6.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o estudo descrito nessa Tese, foi possível analisar qual a melhor forma de colheita e armazenamento de *Brachiaria* spp. (Capítulo 2) e o efeito subcrônico da administração de diosgenina em cobaias (Capítulo 3).

O Capítulo 2 foi resultado da parceria que pesquisadores brasileiros mantêm com pesquisadores do *Poisonous Plant Laboratory Research* (PPRL) (Logan, Utah, EUA). Amostras de braquiária foram obtidas na Fazenda Tomé Pinto e na Embrapa Arroz e Feijão. Após a separação nas diferentes idades de maturação, as amostras foram submetidas a diferentes métodos de secagem. Posteriormente, foram levadas para serem analisadas durante o período de Doutorado Sanduíche no Exterior. Após a análise laboratorial foi possível estabelecer um padrão de colheita, processamento e armazenamento, quando o intuito for a quantificação de protodioscina. A melhor forma de realizar a amostragem e o processamento para conservação da protodioscina é a colheita da planta toda submetida a secagem em temperatura ambiente, estufa ou estufa de circulação forçada. A colheita de parte da planta, como as folhas jovens ou maduras, somente deve ser realizada nos casos de estudos que envolvam hábitos ingestivos específicos de cada espécie. Acrescenta-se que parceria com PPRL foi essencial, pois não possuímos a infraestrutura necessária para a quantificação das saponinas.

No capítulo 3, foi possível investigar a ação da diosgenina sobre a função hepática e o início do desenvolvimento de modelo experimental em cobaias (*Cavia porcellus*). A maior dificuldade enfrentada nesta etapa foi a busca de acesso venoso que permitisse que 2 a 3 ml de sangue fossem colhidos de forma que não precisasse submeter os animais à eutanásia. Estabeleceu que a veia jugular permitiria o procedimento, no entanto, o acesso venoso em cobaias é muito trabalhoso e os três tempos iniciais de colheita estabelecidos (0, 15 e 30 dias), tiveram que ser reduzidos para dois (0 e 30), evitando submeter os animais a mais um procedimento anestésico.

Ao final dessa etapa, foi observado que os animais não apresentaram sinais clínicos que sejam relacionados a intoxicação por saponinas. Desta forma, as saponinas presentes na *Brachiaria* spp., podem não ser isoladamente a causa das intoxicações relacionadas à essas gramíneas. É possível que diversos fatores influenciem, como uma flora intestinal ou ruminal específica, a presença de micotoxinas, como a esporidesmina ou outras, ou outros fatores que possam desencadear lesões hepáticas primárias que favoreçam a intoxicação.

A realização de todo o projeto inicialmente pensado para execução do doutorado, não possível devido a problemas enfrentados. O projeto inicial contemplava, além do

executado: 1. A confecção de extrato com protodioscina isolada a partir de braquiária para intoxicação em cobaias; 2. Intoxicação de cobaias com protodioscina e esporidesmina; 3. Estabelecimento de método para a quantificação de saponinas no fígado de animais intoxicados. Descrevemos a seguir os problemas enfrentados em cada etapa pendente.

A confecção de extrato com protodioscina para ser usado na intoxicação dos porquinhos da Índia, foi inicialmente idealizada para ser realizada no Brasil. Mas no início dos trabalhos esbarrou-se na barreira da quantificação das saponinas. Para a confecção do extrato seria necessário, ao seu final quantificar as saponinas, portanto, não poderia ser realizada aqui. Portanto, a realização desta etapa foi transferida para o PPRL, com a subsequente utilização em intoxicação em camundongos, devido a limitação na quantidade de plantas que poderia ser enviada para o laboratório nos EUA. O extrato foi confeccionado e o experimento com camundongos realizado, aguardando somente a confecção de lâminas histológicas que seriam enviadas ao Brasil para análise, mas no momento de redação da tese as lâminas não haviam chegado.

A etapa de intoxicação com protodioscina e esporidesmina não foi possível devido a problemas na importação dos princípios ativos. Na ocasião da compra da diosgenina, efetuou-se também a compra da protodioscina do mesmo fornecedor. A diosgenina foi corretamente enviada pelo Programa Importa Fácil do CNPq em parceria com os Correios, mas a protodioscina, por uma falta de entendimento do fornecedor, foi enviada por outra empresa de transporte e retida pela Receita Federal. Após mais de um ano de tentativas de recuperação da encomenda, fomos orientados em desistir de retirar da encomenda, pois somente de multas e taxas de armazenamento o valor seria muito superior da realização de nova compra. Esse processo foi o que mais comprometeu o prazo de defesa do Doutorado. Em relação a esporidesmina, tentou-se por inúmeros contatos realizar a importação por meio de pesquisadores da Nova Zelândia, no entanto, ao final não se conseguiu que tal negociação fosse realizada.

A etapa que envolve a o estabelecimento de método para identificação de saponinas no tecido hepático de animais, havia sido proposta para realização no PPRL. No entanto, o desenvolvimento desse método não foi possível, pois não se conseguiu extrair a saponina do tecido animal no laboratório. Atualmente, o desenvolvimento dessa etapa está sendo iniciada com parceria do Instituto de Química/UFG.

O período de doutorado sanduíche proporcionou grande aprendizado, tanto profissional como pessoal. No estágio doutoral foi possível o desenvolvimento de estudos com plantas brasileiras e nativas norte americanas, como a *water hemlock* (*Cicuta douglasii*) e

rayless goldenrod (Isocoma pluriflora). Durante o ano de execução foi desenvolvido atividades laboratoriais, com animais de laboratório e de produção e viagens a campo para colheita de amostras. Espera-se que o conhecimento adquirido durante o doutorado sanduíche possa ser aplicado em futuros projetos no Brasil.

As pastagens com gramíneas do gênero *Brachiaria* são de grande importância para a pecuária nacional. Apesar dos problemas vistos nos animais com os casos de fotossensibilização e prejuízos na produção, os benefícios advindos do seu uso são muitos. A melhor caracterização da etiopatogenia da intoxicação permitirá a obtenção do conhecimento necessário para que esses prejuízos sejam evitados.

Apêndice A. Valores de protosdioscina (%) em amostras colhidas nas pastagens da Fazenda Tomé/UFG, submetidas a diferentes tratamentos

		Pasto 1	Pasto 2	Pasto 3	Pasto 4
TA	FJ	1,67	1,37	1,49	1,38
	FM	1,41	1,05	0,71	1,06
	FV	0,40	0,16	0,03	0,08
	PT	0,73	0,30	0,22	0,24
E	FJ	1,35	1,11	1,31	1,46
	FM	1,21	1,29	0,80	0,97
	FV	0,34	0,16	0,04	0,08
	PT	0,79	0,30	0,27	0,19
EVF	FJ	1,42	1,32	1,05	1,44
	FM	1,38	1,14	0,89	0,87
	FV	0,33	0,21	0,06	0,07
	PT	0,63	0,29	0,32	0,29
C+TA	FJ	1,45	1,14	1,11	1,40
	FM	1,04	1,10	0,86	0,88
	FV	0,62	0,17	0,03	0,06
	PT	0,70	0,31	0,24	0,19
C+E	FJ	1,29	1,08	1,00	1,26
	FM	1,17	1,01	0,89	1,05
	FV	0,63	0,21	0,12	0,07
	PT	0,75	0,25	0,25	0,29
C+EVF	FJ	0,98	1,00	1,03	1,11
	FM	1,22	0,93	0,93	0,92
	FV	0,49	0,13	0,07	0,04
	PT	0,69	0,32	0,25	0,21
C+TA+E	FJ	1,02	1,13	1,13	0,72
	FM	1,05	0,93	1,02	0,83
	FV	0,57	0,11	0,04	0,05
	PT	0,57	0,31	0,30	0,28
C+TA+EVF	FJ	1,24	0,94	1,00	1,19
	FM	1,24	0,87	0,86	0,86
	FV	0,64	0,11	0,07	0,06
	PT	0,66	0,21	0,27	0,25
FD	FJ	0,54	0,49	0,65	0,66
	FM	0,53	0,51	0,53	0,52
	FV	0,36	0,12	0,05	0,03
	PT	0,49	0,15	0,13	0,12

FJ: folhas jovens; **FM:** folhas maduras; **FV:** folhas velhas; **PT:** planta toda; **TA:** temperatura ambiente; **EVF:** estufa de ventilação forçada; **C+TA:** congelamento seguido de secagem em temperatura ambiente; **C+E:** congelamento seguido de secagem em estufa; **C+EVF:** congelamento seguido de secagem em estufa de ventilação forçada; **C+TA+E:** congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa; **C+TA+EVF:** congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa com ventilação forçada; **FD:** *freezer dryer*.

Apêndice B. Valores de protosdioscina (%) em amostras colhidas nas pastagens da EMBRAPA arroz e feijão, submetidas a diferentes tratamentos

		Pasto 1	Pasto 2	Pasto 3	Pasto 4
TA	FJ	1,79	2,20	1,67	1,65
	FM	1,01	1,32	1,35	1,26
	FV	0,44	0,36	0,57	0,46
	PT	1,10	1,21	1,48	1,15
E	FJ	1,82	2,11	1,50	1,50
	FM	1,07	1,44	1,29	1,20
	FV	0,58	0,49	0,50	0,48
	PT	1,03	1,34	0,85	0,94
EVF	FJ	1,78	1,91	1,41	1,58
	FM	0,94	1,16	1,35	1,22
	FV	0,87	0,45	0,54	0,56
	PT	0,91	1,12	1,08	1,21
C+TA	FJ	0,22	0,35	0,74	0,73
	FM	0,05	0,18	0,49	0,48
	FV	0,39	0,22	0,24	0,26
	PT	0,05	0,17	0,37	0,50
C+E	FJ	0,37	0,25	0,79	0,79
	FM	0,07	0,19	0,46	0,29
	FV	0,24	0,24	0,24	0,24
	PT	0,13	0,11	0,37	0,59
C+EVF	FJ	0,44	0,11	0,66	0,83
	FM	0,11	0,25	0,69	0,69
	FV	0,26	0,27	0,26	0,29
	PT	0,23	0,15	0,35	0,33
C+TA+E	FJ	0,26	0,47	0,79	0,87
	FM	0,06	0,22	0,50	0,33
	FV	0,27	0,31	0,30	0,24
	PT	0,08	0,13	0,40	0,45
C+TA+EVF	FJ	0,54	0,44	0,89	1,66
	FM	0,07	0,23	0,57	0,56
	FV	0,47	0,28	0,38	0,34
	PT	0,15	0,21	0,51	0,51
FD	FJ	0,29	0,23	0,41	0,61
	FM	0,10	0,10	0,25	0,40
	FV	0,28	0,17	0,12	0,21
	PT	0,10	0,13	0,33	0,22

FJ: folhas jovens; **FM:** folhas maduras; **FV:** folhas velhas; **PT:** planta toda; **TA:** temperatura ambiente; **EVF:** estufa de ventilação forçada; **C+TA:** congelamento seguido de secagem em temperatura ambiente; **C+E:** congelamento seguido de secagem em estufa; **C+EVF:** congelamento seguido de secagem em estufa de ventilação forçada; **C+TA+E:** congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa; **C+TA+EVF:** congelamento com descongelamento em temperatura ambiente e secagem em estufa com ventilação forçada; **FD:** freezer dryer.

Apêndice C. Valores de referência calculados para o hemograma de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Parâmetros	Valor de Referência			
	Mínimo	Máximo	Média	DP
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	4,41	5,14	4,78	0,37
Hematócrito (%)	35,53	43,73	39,63	4,10
Hemoglobina (g/dL)	10,32	13,32	12,12	1,20
VCM (fl)	79,66	88,72	84,19	4,53
HCM (pg)	25,02	27,27	26,15	1,12
CHCM (%)	29,42	31,13	30,28	0,86
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	432	654	543	111
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4.645	8.226	5.315	1790
Neutrófilo ($10^3/\text{mm}^3$)	324	2.028	862	852
Eosinófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	19	87	52	34
Basófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0	60	18	34
Linfócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	2829	6.231	4530	1701
Monócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	121	727	310	303

Apêndice D. – Valores de referência calculados para a bioquímica plasmática de *Cavia porcellus* submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Bioquímica plasmática	Valor de Referência			
	Mínimo	Máximo	Média	DP
ALT (UI/L)	32,21	69,45	50,83	18,62
AST (UI/L)	46,25	235,50	140,87	94,63
GGT (UI/L)	9,38	18,04	13,71	4,33
ALP (UI/L)	77,04	246,32	161,68	84,64
Uréia (mg/dL)	47,16	61,20	54,18	7,02
Creatinina (mg/dL)	0,10	0,31	0,21	0,10
Glicose (mg/dL)	124,90	190,23	157,56	32,66
Colesterol (g/dL)	22,12	51,02	36,57	14,45
HDL (mg/dL)	0,74	4,18	2,46	1,72
Triglicerídeos (mg/dL)	60,80	120,31	90,56	29,75
Lactato (UI/L)	26,45	71,80	49,13	22,67
Colinesterase (UI/L)	3.263	4.985	4.124	861
Cálcio (mg/dL)	9,02	11,14	10,08	1,06

Apêndice E. Valores da atividade da alanino aminotransferase (UI/L) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	32,58	50,95	38,18	68,61
2	35,55	65,00	52,80	78,77
3	46,47	13,49	31,85	50,06
4	55,28	58,67	43,15	46,71
5	238,10	58,74	31,55	67,09
6	64,17	42,70	71,91	44,92
7	90,49	46,70	43,06	85,16
Média	80,38	48,04	44,64	63,05
Mediana	55,28	50,95	43,06	67,09
Desvio Padrão	72,24	17,07	14,09	16,06
Coeficiente de Variação	0,90	0,36	0,32	0,25

Apêndice F. Valores da atividade da aspartato aminotransferase (UI/L) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	83,69	68,66	76,95	172,90
2	42,84	148,50	84,76	53,71
3	154,20	44,04	64,22	80,49
4	117,30	231,50	82,02	65,66
5	PA	103,80	44,03	49,58
6	325,30	43,43	75,26	115,30
7	168,00	300,10	45,46	95,55
Média	272,48	134,29	67,53	90,46
Mediana	154,20	103,80	75,26	80,49
Desvio Padrão	339,85	98,98	16,86	43,16
Coeficiente de Variação	1,25	0,74	0,25	0,48

Apêndice G. Valores da atividade plasmática da gama glutamiltransferase (UI/L) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	17,62	16,07	24,78	40,16
2	PA	12,57	19,76	17,99
3	11,95	19,51	16,12	20,25
4	11,52	9,63	18,85	17,78
5	13,98	22,79	22,23	8,98
6	6,54	13,24	32,03	20,87
7	11,35	11,51	15,60	22,16
Média	12,16	15,05	21,34	21,17
Mediana	11,74	13,24	19,76	20,25
Desvio Padrão	3,63	4,69	5,71	9,42
Coeficiente de Variação	0,30	0,31	0,27	0,45

Apêndice H. Valores da atividade plasmática da fosfatase alcalina (UI/L) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	289,30	134,70	273,50	99,60
2	437,20	120,10	321,50	116,50
3	153,60	166,10	160,60	141,30
4	257,20	106,50	138,00	146,30
5	287,40	212,90	233,20	210,90
6	187,70	125,40	112,10	60,81
7	38,34	22,62	25,68	105,20
Média	235,82	126,90	180,65	125,80
Mediana	257,20	125,40	160,60	116,50
Desvio Padrão	125,57	58,21	101,78	47,12
Coeficiente de Variação	0,53	0,46	0,56	0,37

Apêndice I. Valores de ureia (mg/dL) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	46,85	49,86	48,07	55,36
2	45,50	63,42	47,82	71,77
3	47,22	46,32	38,71	45,74
4	56,20	65,30	56,02	56,29
5	47,35	56,11	45,04	44,43
6	60,15	53,14	55,36	60,10
7	61,53	59,53	49,41	72,12
Média	52,11	56,24	48,63	57,97
Mediana	47,35	56,11	48,07	56,29
Desvio Padrão	6,93	6,99	5,96	11,09
Coeficiente de Variação	0,13	0,12	0,12	0,19

Apêndice J. Valores de creatinina (mg/dL) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	0,12	0,21	0,18	0,26
2	0,29	0,25	0,27	0,37
3	0,10	0,06	0,26	0,32
4	0,37	0,37	0,18	0,22
5	0,18	0,08	0,25	0,31
6	0,21	0,15	0,29	0,43
7	0,49	0,30	0,54	0,28
Média	0,25	0,20	0,28	0,31
Mediana	0,21	0,21	0,26	0,31
Desvio Padrão	0,14	0,11	0,12	0,07
Coeficiente de Variação	0,56	0,56	0,43	0,22

Apêndice K. Valores de glicose (mg/dL) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	117,80	146,90	186,90	216,50
2	193,30	137,00	244,60	155,10
3	141,20	107,90	248,60	158,50
4	147,00	202,60	214,00	174,20
5	221,60	143,40	260,20	238,10
6	176,40	164,80	194,30	230,60
7	132,40	173,60	184,00	239,70
Média	161,39	153,74	218,94	201,81
Mediana	147,00	146,90	214,00	216,50
Desvio Padrão	37,02	30,11	31,94	37,90
Coeficiente de Variação	0,23	0,20	0,15	0,19

Apêndice L. Valores de colesterol (g/dL) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	31,13	21,84	29,95	52,63
2	57,73	52,73	31,66	53,87
3	15,06	25,77	12,85	37,09
4	22,42	34,89	32,76	35,73
5	31,37	52,28	14,40	30,69
6	46,89	22,11	22,71	39,42
7	42,35	55,40	31,98	16,71
Média	35,28	37,86	25,19	38,02
Mediana	31,37	34,89	29,95	37,09
Desvio Padrão	14,69	15,26	8,59	12,78
Coeficiente de Variação	0,42	0,40	0,34	0,34

Apêndice M. Valores de HDL (mg/dL) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	8,34	1,30	1,85	2,67
2	3,90	1,82	0,60	0,61
3	1,66	1,14	1,79	1,11
4	0,98	2,95	2,26	1,86
5	0,63	2,08	2,07	0,63
6	5,87	0,64	3,07	1,72
7	4,18	4,82	2,94	1,90
Média	3,65	2,11	2,08	1,50
Mediana	3,90	1,82	2,07	1,72
Desvio Padrão	2,81	1,41	0,82	0,75
Coeficiente de Variação	0,77	0,67	0,40	0,50

Apêndice N. Valores triglicéridos (mg/dL) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	68,74	108,80	160,00	166,60
2	108,60	74,02	102,50	188,80
3	55,33	48,83	79,12	77,98
4	106,20	127,20	146,30	115,70
5	102,80	130,50	66,01	107,30
6	60,16	54,54	89,07	125,10
7	91,97	130,10	139,60	154,20
Média	84,83	96,28	111,80	133,67
Mediana	91,97	108,80	102,50	125,10
Desvio Padrão	22,85	36,32	36,64	38,16
Coeficiente de Variação	0,27	0,38	0,33	0,29

Apêndice O. Valores de lactato (UI/L) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	58,76	75,09	83,97	114,50
2	74,74	24,02	55,15	66,77
3	39,34	87,60	51,25	75,39
4	54,67	35,32	39,16	72,60
5	34,24	72,55	48,12	78,83
6	12,32	42,88	45,28	64,69
7	23,52	52,71	40,20	51,05
Média	42,51	55,74	51,88	74,83
Mediana	39,34	52,71	48,12	72,60
Desvio Padrão	21,61	23,34	15,26	19,70
Coeficiente de Variação	0,51	0,42	0,29	0,26

Apêndice P. Valores de colinesterase (UI/L) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	4191,00	4506,00	3288,00	3809,00
2	3608,00	4757,00	4471,00	4450,00
3	3850,00	4521,00	5837,00	4591,00
4	4768,00	3876,00	6197,00	3699,00
5	4902,00	6378,00	6030,00	4063,00
6	4853,00	4893,00	4960,00	3602,00
7	2414,00	2475,00	2449,00	4780,00
Média	4083,71	4486,57	4747,43	4142,00
Mediana	4191,00	4521,00	4960,00	4063,00
Desvio Padrão	895,36	1171,65	1441,51	466,99
Coeficiente de Variação	0,22	0,26	0,30	0,11

Apêndice Q. Valores de cálcio (mg/dL) de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina

Animal	Momento 0		Momento 30	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	9,42	11,79	13,63	11,99
2	PA	9,06	12,05	10,67
3	9,48	10,21	12,29	10,31
4	10,90	9,14	12,51	11,92
5	8,53	10,33	13,16	11,36
6	11,59	9,03	13,17	12,88
7	10,35	11,17	12,14	14,56
Média	10,05	10,10	12,71	11,96
Mediana	9,92	10,21	12,51	11,92
Desvio Padrão	1,12	1,10	0,61	1,44
Coefficiente de Variação	0,11	0,11	0,05	0,12

PA: perda amostral

Apêndice R. Valores de eritograma de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina, grupo controle no momento 0 e momento 30

Momento 0	HEM	HB	HT	VCM	HCM	CHCM	PLT
Animais	(10 ⁶ /mm ³)	(g/dL)	(%)	(fl)	(pg)	(%)	(10 ³ /mm ³)
1	5,31	11,70	40,70	76,70	22,00	28,70	741,00
2	5,42	13,70	42,30	78,20	24,30	31,20	735,00
3	4,31	10,60	35,70	82,90	25,20	30,50	524,00
4	4,36	11,90	40,50	92,80	27,20	29,30	518,00
5	3,61	9,90	28,60	79,30	27,40	34,60	639,00
6	4,43	11,00	36,90	83,40	24,80	29,80	371,00
7	4,62	11,80	39,80	86,20	25,50	29,60	624,00
Média	4,58	11,51	37,79	82,79	25,20	30,53	593,14
Mediana	4,43	11,70	39,80	82,90	25,20	29,80	624,00
DP	0,62	1,21	4,65	5,52	1,83	1,97	132,17
CV	0,14	0,10	0,12	0,07	0,07	0,06	0,22
Momento 30	HEM	HB	HT	VCM	HCM	CHCM	PLT
Animais	(10 ⁶ /mm ³)	(g/dL)	(%)	(fl)	(pg)	(%)	(10 ³ /mm ³)
1	5,03	12,40	42,70	84,90	24,60	29,00	450,00
2	4,25	11,70	39,60	93,20	27,50	29,50	534,00
3	4,88	12,20	43,90	40,10	25,00	27,70	711,00
4	4,92	13,80	46,50	94,70	28,00	29,60	669,00
5	4,58	10,80	37,00	80,80	23,50	29,10	552,00
6	4,84	12,70	37,00	89,30	26,20	29,30	266,00
7	5,23	14,20	45,60	90,20	27,10	30,10	357,00
Média	4,82	12,54	41,76	81,89	25,99	29,19	505,57
Mediana	4,88	12,40	42,70	89,30	26,20	29,30	534,00
DP	0,32	1,17	3,93	19,03	1,67	0,75	160,43
CV	0,07	0,09	0,09	0,23	0,06	0,03	0,32

HEM: hemácias; HB: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; PLT: plaquetas; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Apêndice S. Valores de hemograma de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina, grupo tratado no momento 0 e momento 30

Momento 0	HEM	HB	HT	VCM	HCM	CHCM	PLT
Animais	(10 ⁶ /mm ³)	(g/dL)	(%)	(fl)	(pg)	(%)	(10 ³ /mm ³)
1	5,06	13,80	45,40	49,90	27,20	30,30	510,00
2	4,53	11,90	39,60	87,60	26,70	30,00	523,00
3	5,17	14,20	45,00	87,10	27,40	31,50	510,00
4	4,59	12,50	40,00	87,30	27,20	31,20	501,00
5	4,93	12,30	39,80	80,80	24,90	30,90	531,00
6	4,74	12,20	41,20	87,00	25,70	29,60	512,00
7	4,62	12,20	39,30	85,20	26,40	31,00	362,00
Média	4,81	12,73	41,47	80,70	26,50	30,64	492,71
Mediana	4,74	12,30	40,00	87,00	26,70	30,90	510,00
DP	0,25	0,89	2,62	13,79	0,92	0,69	58,46
CV	0,05	0,07	0,06	0,17	0,03	0,02	0,12
Momento 30	HEM	HB	HT	VCM	HCM	CHCM	PLT
Animais	(10 ⁶ /mm ³)	(g/dL)	(%)	(fl)	(pg)	(%)	(10 ³ /mm ³)
1	5,46	14,70	47,90	87,90	26,90	30,60	276,00
2	4,82	13,30	44,00	91,30	27,50	30,20	609,00
3	5,21	14,70	47,90	92,00	28,20	30,60	332,00
4	4,81	13,40	44,30	92,10	27,80	30,20	549,00
5	5,32	15,00	44,80	84,30	28,10	33,40	393,00
6	4,68	12,60	41,40	88,60	26,90	30,40	547,00
7	4,97	13,30	45,60	91,90	26,70	29,10	437,00
Média	5,04	13,86	45,13	89,73	27,44	30,64	449,00
Mediana	4,97	13,40	44,80	91,30	27,50	30,40	437,00
DP	0,29	0,93	2,29	2,95	0,62	1,32	123,90
CV	0,06	0,07	0,05	0,03	0,02	0,04	0,28

HEM: hemácias; HB: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; PLT: plaquetas; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Apêndice T. Valores do leucograma de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina, no grupo controle no momento 0 e momento 30

Momento 0	Leu	Neu	Eos	Bas	Linf	KC	Mon
Animais	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)
1	6700	2613	67	0	3283	0	737
2	6900	345	0	0	5520	0	1035
3	8500	680	85	85	7140	0	510
4	5900	944	0	0	4838	0	118
5	8700	2349	87	0	5220	0	1044
6	6600	594	66	0	5676	0	264
7	8500	765	255	0	7225	0	255
Média	7400	1184	80	12	5557	0	566
Mediana	6900	765	67	0	5520	0	510
DP	1136	907	86	32	1360	0	381
CV	0,15	0,77	1,07	2,65	0,24	0	0,67
Momento 30	Leu	Neu	Eos	Bas	Linf	KC	Mon
Animais	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)
1	9000	270	0	0	7470	0	1260
2	10800	216	0	0	9612	0	972
3	9000	1980	90	0	6660	0	270
4	7400	2294	74	0	4810	0	222
5	10300	1442	206	103	8446	0	103
6	7000	140	0	0	6580	0	280
7	8700	522	696	0	7308	0	174
Média	8886	981	152	15	7269	0	469
Mediana	9000	522	74	0	7308	0	270
DP	1384	908	251	39	1517	0	454
CV	0,16	0,93	1,65	2,65	0,21	0	0,97

Leu: leucócitos totais; Neu: Netrófilo; Eso: eosinófilos; Bas: basófilos; Linf: linfócitos; KC: Kurloff cells; Mon: monócitos; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Apêndice U. Valores do leucograma de cobaias (*Cavia porcellus*) submetidas à intoxicação experimental subcrônica com diosgenina, no grupo tratado no momento 0 e momento 30

Momento 0	Leu	Neu	Eos	Bas	Linf	KC	Mon
Animais	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)
1	5200	2236	52	52	2548	52	260
2	4000	2120	40	40	1560	0	240
3	9000	4140	90	90	4140	90	450
4	5900	1357	59	59	4130	0	295
5	5100	306	51	0	4437	0	306
6	6000	360	0	0	5400	0	240
7	3100	620	93	31	2077	93	186
Média	5471	1591	55	39	3470	34	282
Mediana	5200	1357	52	40	4130	0	260
DP	1867	1376	32	32	1413	44	84
CV	0,34	0,86	0,57	0,83	0,41	1,31	0,30
Momento 30	Leu	Neu	Eos	Bas	Linf	KC	Mon
Animais	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)	(10 ³ /mm ³)
1	7600	1140	76	0	5776	76	532
2	11000	4290	220	0	6050	0	440
3	8100	162	81	0	7695	0	162
4	12000	1320	120	0	9840	0	720
5	9700	1940	194	0	7081	0	485
6	12000	2760	120	0	8520	0	600
7	9600	480	0	0	8736	0	384
Média	10000	1727	116	0	7671	11	475
Mediana	9700	1320	120	0	7695	0	485
DP	1762	1426	74	0	1479	29	176
CV	0,18	0,83	0,64	0	0,19	2,65	0,37

Leu: leucócitos totais; Neu: neutrófilo; Eso: eosinófilos; Bas: basófilos; Linf: linfócitos; KC: Kurloff cells; Mon: monócitos; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Anexo A. Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Goiânia, 15 de abril de 2013.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE
PESQUISA/ENSINO PROTOCOLADO NA CEUA SOB O Nº. 014/13

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** Intoxicação por saponinas e esporidesmina: padronização da colheita de gramíneas e desenvolvimento de modelo experimental em *Cavia Porcellus*
2. **Pesquisador Responsável:** Daniel Silva Goulart - EVZ -UFG
3. **Unidade/Órgão:** EVZ –UFG
4. **Pesquisadores Participantes:**
 - Maria Clorinda Soares Fioravanti - UFG
 - Emmanuel Arnhold - UFG
 - Flávia Gontijo de Lima - Autônoma
 - Marynis Santos - UFG
5. **Unidade onde será realizado:** Escola de Veterinária e Zootecnia – UFG
6. **Data de apresentação do protocolo à CEUA:** 19/02/2013
7. **Data do Relato:** 04/03/2013
8. **Data de Atendimento das Pendências:** 15/03/2013

II - Parecer do CEUA:

As solicitações e resposta dos pesquisadores:

-Eslarecer de qual biotério serão adquiridos os animais: Os autores relatam que os animais poderão ser adquiridos de diferentes biotérios no Brasil como Instituto Butantan, Biotério Central da Universidade de São Paulo ou outros centros de pesquisas que trabalham com cobaias no país;

-Especificar idade, sexo e peso dos animais que serão utilizados nos experimentos: Cobaias machos de idade próxima aos seis meses e peso aproximado de 700 gramas,

-Descrever as dimensões das gaiolas, número de animais/área, temperatura e umidade ambiente do local do experimento com os animais: Os animais serão alojados em caixas individuais de polipropileno com

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia
(Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



dimensões de 41x34x16 cm, forradas com cama de maravalha. A temperatura será mantida em 21 °C e a umidade no intervalo de 45% a 65%.

-Esclarecer porque a colheita de sangue será feita por dois métodos distintos: venopunção da veia jugular e venopunção da veia marginal da orelha. Esclarecer se estas colheitas serão feitas no mesmo dia: A colheita de sangue será feita apenas por punção da veia jugular.

-Esclarecer o destino dos animais após a eutanásia: Cremação no setor de Patologia da EVZ -UFG

-Esclarecer se haverá suplementação de vitamina C na ração dos animais: Somente será feita caso não haja possibilidade de compra de rações específicas para a espécie. De acordo com os pesquisadores, as rações específicas já são formuladas com quantidades adequadas de vitamina C.

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

III - Data da reunião:

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Prof^a. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

Anexo B. Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Goiânia, 15 de julho de 2016.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO
PROTOCOLO N. 049/16**

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Doutorado

II - Identificação:

- ☐ **Data de apresentação a CEUA:** 08/07/2016
- ☐ **Título do projeto:** Intoxicação por saponinas e esporidesmina: padronização da colheita de gramíneas e desenvolvimento de modelo experimental em *Cavia porcellus*
- ☐ **Pesquisador Responsável/ Unidade:**

Nome completo

Maria Clorinda Soares
Fioravanti

Instituição/Unidade

Escola de Veterinária e
Zootecnia/UFG

Departamento

Patologia, Clínica e
Cirurgia

Vínculo com a Instituição

Professor

Telefone/E-mail

62-99975-0095

Curriculo *lattes* (endereço)

<http://lattes.cnpq.br/8772502020076257/mariaclorinda@gmail.com>

Experiência Prévia com a área da pesquisa (sim/não) e Tempo

Experiência em pesquisa desde 1992

COLABORADORES

Nome completo

Daniel Silva Gouart

Instituição

Escola de Veterinária e
Zootecnia/UFG

Nível acadêmico

Doutorando

Experiência prévia com a área da pesquisa (anos)

Experiência em pesquisas durante a graduação, mestrado.

Curriculo *lattes* (endereço)

<http://lattes.cnpq.br/5221749202342407>

E-mail

dsgvet@hotmail.com

Função na Pesquisa

Manejo dos animais,
colheita de material biológico e eutanásia.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Outros colaboradores: Juliana Moraes Dias
doutoranda
<http://lattes.cnpq.br/3259302891044619>

Mais quatro graduandos de veterinária que constam no projeto

- ☐ Médico Veterinário Responsável: Daniel Silva Goulart
CRMV-4632
- ☐ Unidade onde será realizado: Biotério Central da UFG

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivos gerais

Avaliação de métodos de amostragem de *Brachiara* para estabelecer o método mais adequado para colheita e conservação pós-colheita da gramínea para dosagem de saponina, obtenção do extrato da planta e contagem de esporos do fungo *Pithomyces chartarum*.

Específicos:

- ☐ Avaliação de métodos de amostragem de *Brachiara* para estabelecer o método mais adequado para colheita e conservação pós-colheita da gramínea para dosagem de saponina, obtenção do extrato da planta e contagem de esporos do fungo *Pithomyces chartarum*.
- ☐ Alimentação de cobaias com rações que contenham quantidades conhecidas de saponina e esporidesmina para avaliar a morfologia e a função hepática por meio de exames laboratoriais e histopatológicos.
- ☐ Padronizar técnica de quantificação de saponina em tecidos animais.

Justificativa

A intoxicação por *Brachiarias* causa grande prejuízos à saúde dos animais bem como prejuízos financeiros para a pecuária. Essas intoxicações são caracterizadas nos por apresentam sinais de fotossensibilização ou podem apresentar uma síndrome progressiva causando emagrecimento e a morte dos animais sem apresentarem os sinais clínicos de fotossensibilização. Deste modo, o estabelecimento das vias de metabolização das saponinas, principalmente no fígado, pode ajudar a esclarecer a fisiopatologia do processo de intoxicação, bem como possibilitar que novos experimentos visem métodos para prevenir e tratar essa intoxicação.

Acrescenta-se que as gramíneas do gênero *Brachiaria* cobrem a grande maioria das pastagens do país e o estabelecimento da causa das intoxicações podem nortear o uso racional dessas plantas.

IV - Sumário do projeto:

☐ Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:

Neste estudo a utilização de métodos alternativos é inviável pois não existe um método alternativo disponível que mimetize a metabolização hepática e a ação das saponinas sobre o organismo do animal. Além disso, será padronizado um método de quantificação de saponina nos tecidos dos animais, após a eutanásia.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876,
Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



- ☐ **Prevê Projeto Piloto:** Sim, sendo 2 machos e 2 fêmeas de *Cavia porcellus*, de 2 meses de idade.
- ☐ **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** Serão utilizadas 42 cobaias (*Cavia porcellus*) sendo 21 machos e 21 fêmeas, de 2 meses de idade com aproximadamente 250 gramas.
- ☐ **Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** Serão utilizadas 42 cobaias (*Cavia porcellus*) sendo 21 machos e 21 fêmeas, de 2 meses de idade com aproximadamente 250 gramas.
- ☐ **Fonte de obtenção do animal:** Animais obtidos de criadores da região.
- ☐ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:**
Os animais serão mantidos em caixas de polipropileno de 60x50 cm e 22 cm de altura, em grupos de no mínimo 02 e no máximo 06. A cama será de maravalha e enriquecimento ambiental de feno ou palha. A água será fornecida à vontade e a comida dentro dos padrões para a espécie, uma vez por dia, com suplementação de vitamina C.
- ☐ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não será utilizado agente infeccioso. Os riscos para o pesquisador será o de mordidas pelos animais, porém como tem conhecimento do manjo da espécie, estes riscos serão minimizados.
- ☐ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:** Previamente ao período experimental os animais passarão por período de adaptação, tanto ao ambiente como a manipulação da equipe. Durante o período experimental os animais receberão diferentes doses, por gavagem, de saponinas, sapogeninas e esporidesmina na tentativa de reproduzir a intoxicação por *Brachiaria*. Quinzenalmente será obtida amostras sanguíneas dos animais por meio da venopunção da veia jugular, ocasião a qual os animais estarão anestesiados. Após o período experimental todos os animais serão submetidos a eutanásia por overdose de isoflurano e os tecidos dos mesmos serão coletados para análises histológicas e quantificação de saponinas.
- ☐ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** Devido ao risco de intoxicação dos animais durante o período experimental será realizado acompanhamento diário desses animais. Os animais que apresentarem quadros de intoxicação moderada a grave, que poderá ser avaliada por meio do comportamento dos animais, poderão ser submetidos a eutanásia antes do fim do experimento.
- ☐ **Grau de invasividade:** GII
- ☐ **Material utilizado em outros projetos:** Não
- ☐ **Método de eutanásia:** Overdose por isoflurano, via inalatória.
- ☐ **Destino do animal:** Após o período experimental os animais serão submetidos a eutanásia e as carcaças serão acondicionadas em sacos plásticos e levadas à câmara de refrigeração do Setor de Patologia da EVZ/UFG, onde ficarão até a incineração no mesmo setor.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

☐ **Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG:**

Todos foram apresentados

☐ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Este é um projeto que já havia sido avaliado e aprovado, voltou a ser apresentado por ter se esgotado o prazo colocado no Cronograma. Este fato se deveu a problemas na alfândega, não sendo responsabilidade do pesquisador o não cumprimento dos prazos constantes no Cronograma. A única mudança neste novo projeto foi a do Cronograma. Considero o projeto sem óbices éticos.

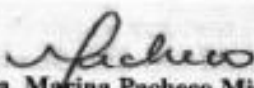
VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **30 de julho 2017**.

VII - Data da reunião: 15 de julho de 2016.


Dra. Marina Pacheco Miguel
 Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG