

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

JÉSSICA BAEÇA REZENDE MARINHO

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS PARA DIAGNÓSTICO DAS
INTOXICAÇÕES POR *CESTRUM AXILLARE* (*C. LAEVIGATUM*) E *CESTRUM
MARIQUITENSE***

Belo Horizonte

2022

JÉSSICA BAEÇA REZENDE MARINHO

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS PARA DIAGNÓSTICO DAS
INTOXICAÇÕES POR *CESTRUM AXILLARE* (*C. LAEVIGATUM*) E *CESTRUM
MARIQUITENSE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Linha de pesquisa: Toxicologia e Plantas Tóxicas

Orientador: Prof. Dr. Benito Soto-Blanco

Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Último de Carvalho
Prof^a. Dr^a. Kelly Moura Keller

Belo Horizonte

2022

M338i Marinho, Jéssica Baeça Rezende, 1990-
Identificação de marcadores químicos para diagnóstico das intoxicações por *Cestrum axillare*
(*C. laevigatum*) E *Cestrum mariquitense* / Jéssica Baeça Rezende Marinho. – 2022.
62f: il.

Orientador: Benito Soto Blanco
Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas
Gerais para obtenção do título de Doutora.
Área de concentração: Ciência animal.
Bibliografia: f. 55 – 59.

1. Plantas venenosas - Toxicologia - Teses - 2. Plantas venenosas para o gado - Teses -
3. Toxicologia veterinária - Teses – 4. Intoxicação - Teses - I. Soto-Blanco, Benito -
II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 581.69

Bibliotecário responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÉSSICA BAEÇA REZENDE MARINHO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 12:00:00 AM, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Benito Soto Blanco
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Debora da Silva Freitas Ribeiro

Dr.(a). Antônio Carlos Lopes Câmara

Dr.(a). Idalécio Pacífico da Silva

Dr.(a). Sílvia Catarina Salgado Oloris



Documento assinado eletronicamente por **Benito Soto Blanco, Membro**, em 23/02/2022, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Debora da Silva Freitas Ribeiro, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Lopes Câmara, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 20:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Catarina Salgado Oloris, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 10:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Idalécio Pacífico da Silva, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1257183** e o código CRC **7953C5AD**.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar e me mostrar os caminhos a percorrer.

À minha família e ao Higor que nunca me deixaram desanimar e dando forças que tudo iria dar certo.

Ao Professor Benito que me deu a oportunidade de tornar esse sonho realidade e também pela paciência.

Aos Professores Antônio Último e Kelly Moura Keller que me incentivaram e sempre estiveram disponíveis para me ajudar.

A todos do Laboratório de Toxicologia pelos risos, conselhos e aprendizado.

À Escola de Veterinária da UFMG, que me acolheu.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar marcadores químicos para o diagnóstico laboratorial da intoxicação por folhas de *Cestrum axillare* (anteriormente *C. laevigatum*) e *Cestrum mariquitense*. Foram coletadas uma amostra de cada uma destas espécies no período de julho/2018 até janeiro/2020. As amostras foram coletadas mensalmente, na primeira semana do mês, no município de Esmeraldas e Belo Horizonte - MG. As coletas foram feitas em diferentes épocas do ano (primavera, outono, verão, inverno) e nas várias fases do desenvolvimento vegetal (floração, frutificação e somente a presença de folhas). Foram identificados dois compostos principais nos extratos das folhas de *C. axillare* e *C. mariquitense*, denominados: Composto 1 e Composto 2. As concentrações destes dois compostos apresentaram variação sazonal, mas não foram afetadas pela pluviosidade. Na comparação das espécies, *C. mariquitense* teve maior dosagem do Composto 2. A segunda etapa do presente estudo visou determinar a presença dos compostos isolados das folhas de *C. axillare* e *C. mariquitense* em amostras de fígado e fluido ruminal de animais intoxicados, visando o desenvolvimento de metodologia analítica para futura utilização na rotina diagnóstica. Assim, a técnica para determinação dos dois compostos foi adaptada para amostras de fluido ruminal e fígado. Inicialmente, foram utilizadas amostras brancas (de animais sem exposição às plantas pesquisadas), analisadas com e sem adição dos compostos 1 e 2 para confirmar a eficiência do processo de extração e a ausência de interferência da matriz na identificação dos compostos. A confirmação da eficácia da metodologia foi obtida com amostras de um caprino experimentalmente intoxicado e de casos espontâneos em bovinos. Nas amostras de fígado e fluido ruminal, foi possível identificar a presença do Composto 2, cuja similaridade química foi confirmada pelo espectro UV. Ainda não encontraram nenhum dos dois compostos nas amostras dos outros casos de mortes de bovinos que não apresentavam lesões patológicas compatíveis com esta intoxicação. Assim, o Composto 2 se mostrou um bom marcador para diagnóstico da intoxicação de ruminantes por plantas do gênero *Cestrum*.

Palavras-Chave: *Cestrum laevigatum*, Solanaceae, plantas tóxicas, plantas hepatotóxicas, necrose hepática, saponinas, carboxiatractilosídeos, hepatopatias em ruminantes.

ABSTRACT

Identification of chemical markers for the diagnosis of poisoning by *Cestrum axillare* (*C. laevigatum*) and *Cestrum mariquitense*

The objective of this work was to identify and quantify chemical markers for the laboratory diagnosis of poisoning by leaves of *Cestrum axillare* (formerly *C. laevigatum*) and *Cestrum mariquitense*. Samples of each of these species were collected in the period from July/2018 to January/2020. Samples were collected monthly, in the first week of the month in Esmeraldas and Belo Horizonte - MG, Brazil. Collections were carried out at different times of the year (spring, autumn, summer, winter) and various stages of plant development (flowering, fruiting and only the presence of leaves). Two main compounds were identified in the extracts of the leaves of *C. axillare* and *C. mariquitense*, named: Compound 1 and Compound 2. The concentrations of these two compounds showed seasonal variation but were not affected by rainfall. When comparing the species, *C. mariquitense* had a higher dose of Compound 2. The second stage of the present study aimed to determine the presence of compounds isolated from the leaves of *C. axillare* and *C. mariquitense* in liver and ruminal fluid samples from poisoned animals, aiming the development of analytical methodology for future use in diagnostic routine. Thus, the technique for determination of the two compounds was adapted for ruminal fluid and liver samples. Initially, white samples (from animals without exposure to the studied plants) were used, analyzed with and without the addition of Compounds 1 and 2 to confirm the efficiency of the extraction process and the absence of matrix interference in the identification of the compounds. Confirmation of the effectiveness of the methodology was obtained with samples from an experimentally poisoned goat and spontaneous cases in cattle. In liver and rumen fluid samples, it was possible to identify the presence of Compound 2, whose chemical similarity was confirmed by the UV spectrum. Furthermore, neither of the two compounds was found in the samples of other cases of death in cattle that did not present pathological lesions compatible with this poisoning. Thus, Compound 2 proved to be a good marker for the diagnosis of poisoning in ruminants by plants of the *Cestrum* genus.

Keywords: *Cestrum laevigatum*, Solanaceae, poisonous plants, hepatotoxic plants, hepatic necrosis, saponins, carboxyatractyloside, liver diseases in ruminants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flores, frutos e folhas de <i>Cestrum axillare</i> , no município de Esmeraldas-MG.....	15
Figura 2: Fígado de bovino intoxicado por <i>C. axillare</i> . À esquerda (A), fígado apresentando superfície de corte com aspecto de “noz moscada”. À direita (B), fígado após ser fixado em formol à 10%.....	18
Figura 3: (A) Fígado de caprino que recebeu folhas de <i>Cestrum axillare</i> na dose de 10g/kg mostrando necrose nas áreas no entorno da veia centrolubular, vacuolização dos hepatócitos ao redor das áreas de necrose. HE, obj.10x. (B) Fígado do mesmo animal com neutrófilos entre as células necróticas, picnose, diferenciação entre as células necróticas e hepatócitos normais. HE, obj.20x	19
Figura 4: Estrutura molecular da gitogenina (A) e digitogenina (B).....	21
Figura 5: Estrutura molecular do carboxiatractilosídeo.	22
Figura 6: Cromatograma do extrato purificado.	42
Figura 7: Espectro UV do Composto 1.	43
Figura 8: Espectro UV do Composto 2.	43
Figura 9: Curva padrão Composto 1.....	44
Figura 10: Curva padrão Composto 2.....	44
Figura 11: Cromatograma gerado a partir de fígado caprino apresentando o Composto 2 (seta).....	47
Figura 12: Espectro UV do Composto 2 em fígado caprino.	48
Figura 13: Cromatograma gerado a partir de fígado bovino (amostra branca), não foram encontrados picos compatíveis com os Compostos 1 e 2.	48
Figura 14: Cromatograma indicando a presença do Composto 2 em fluido ruminal bovino..	49
Figura 15: Espectro UV confirmando a identidade do Composto 2 em fluido ruminal bovino.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média e desvio-padrão da quantificação do Composto 1 de acordo com a variação sazonal (mg/kg).....	45
Tabela 2: Média e desvio-padrão da quantificação do Composto 2 de acordo com a variação sazonal (mg/kg).....	45
Tabela 3: Média e desvio padrão da quantificação do Composto 1, comparando a variação geográfica (mg/kg).....	46
Tabela 4: Média e desvio padrão da quantificação do Composto 2, quando comparadas as espécies de <i>Cestrum</i> (mg/kg).....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resultados de forma comparada para os animais testados.....	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
APs	Alcaloides pirrolizidínicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama-glutamyltransferase
HE	Hematoxilina e eosina
PV	Peso vivo
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Plantas tóxicas no Brasil	14
3.2 Plantas hepatotóxicas	14
3.3 <i>Cestrum axillare</i>	15
3.4 Sinais clínicos	16
3.5 Achados patológicos	17
3.6 Diagnóstico	19
3.7 Tratamento	20
3.8 Princípios tóxicos.....	20
3.8.1 Saponinas	21
3.8.2 Carboxiatractilosídeos.....	22
3.10.1 Sinais clínicos da intoxicação	23
3.10.2 Alterações hematológicas	25
3.10.3 Alterações bioquímicas	25
3.11 Diagnósticos diferenciais	27
3.11.1 Etiopatogenia das hepatopatias em ruminantes	27
3.11.1 Etiopatogenia da encefalopatia hepática	28
3.11.2 Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos	29
3.11.3 <i>Senecio</i>	29
3.11.4 <i>Crotalaria</i>	31
3.11.5 Aflatoxinas	32
3.12 Parâmetros para validação de métodos analíticos.....	34
3.12.1 Seletividade.....	34
3.12.2 Linearidade	34
3.12.3 Precisão	35
3.12.4 Limite de detecção	35
3.12.5 Limite de quantificação.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Material vegetal	37
4.2 Extração dos compostos presentes nas plantas (extração padrão)	37
4.4 Coleta das amostras de fígado.....	38

4.5 Identificação dos compostos em fluido ruminal	40
4.6 Validação da técnica analítica.....	40
4.6.1 Seletividade.....	40
4.6.2 Linearidade	41
4.6.3 Limite de detecção e quantificação.....	41
4.7 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Identificação dos compostos presentes nas plantas	42
5.2 Validação da técnica analítica.....	44
5.2.1 Linearidade	44
5.2.2 Limite de detecção e quantificação.....	45
5.3 Quantificação dos compostos nas plantas.....	45
5.4 Amostras de fígado	46
5.5 Identificação dos compostos em fluido ruminal	49
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as intoxicações por plantas nos animais de produção geram importantes perdas econômicas. Devido à grande extensão territorial, a maioria dos animais são criados em sistema extensivo ou semi-intensivo, em pastagens nativas ou cultivadas, o que aumenta o risco de exposição às plantas (Tokarnia *et al.*, 2002).

O gênero *Cestrum* é o terceiro maior da família Solanaceae, com ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. Essas plantas são popularmente chamadas de “coeranea”, “mata boi”, “pimenteira”, “dama da noite” e “canema”. As plantas deste gênero são responsáveis por causar necrose hepática aguda em ruminantes (Tokarnia *et al.*, 2012). *Cestrum axillare*, anteriormente *C. laevigatum*, é a mais importante planta hepatotóxica do Brasil que causa intoxicação aguda. Tem ocorrência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e em áreas litorâneas do Nordeste. Bovinos, caprinos e ovinos se intoxicam naturalmente devido a longos períodos de escassez de forragem, já que as folhas não possuem boa palatabilidade. Os sinais clínicos da intoxicação são evidenciados em até 24 horas após a ingestão das folhas e a morte ocorre em até 48 horas após o início da sintomatologia (Tokarnia *et al.*, 2002).

Os animais intoxicados apresentam insuficiência hepática aguda, caracterizada por aumento das atividades séricas das enzimas de origem hepática como a aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (GGT). Os sinais clínicos observados nos casos de intoxicação aguda são apatia, anorexia, redução na movimentação ruminal, dorso arqueado, constipação com fezes em formas de pequenas esferas, por vezes recobertas com muco e com estrias de sangue, tremores musculares, andar cambaleante, e às vezes, sialorreia. Podem ser observados sinais neurológicos, devido a interferência no ciclo da ureia pela insuficiência hepática resultando em hiperamonemia (encefalopatia hepática) (Santos *et al.*, 2008).

À necropsia, o principal achado é o fígado com aspecto de noz moscada, edema da parede da vesícula biliar, ressecamento do conteúdo do omaso e do intestino grosso que aparece em forma de esferas envoltas por muco sanguinolento. Na avaliação histopatológica, o principal achado é a necrose hepática centrolobular (Dobereiner *et al.*, 1969).

O princípio tóxico presente no *C. axillare* ainda não está definitivamente comprovado. Alguns autores atribuem a toxicidade da planta à presença das saponinas gitogenina e digitogenina (Canham, 1950; Tokarnia *et al.*, 2012). Em animais de

produção, as saponinas podem interferir com o crescimento, o ganho de peso, na ingestão de alimentos e a reprodução (Cheeke, 1996). Algumas saponinas, como por exemplo as presentes no pericarpo dos frutos do *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril, timbaúva, orelha-de-macaco), podem promover efeito hepatotóxico caracterizado por necrose hepatocelular difusa (Gadelha *et al.*, 2015). No entanto, Marinho *et al.* (2018) administraram extrato de saponinas isoladas de *C. axillare* a caprinos na dose de 20g/kg PV e não foram observados sinais clínicos da intoxicação, nem alteração na função hepática segundo o perfil bioquímico sérico.

As intoxicações por *C. axillare* e *C. mariquitense* são caracterizadas por necrose hepática centrolobular, similar às observadas das intoxicações por plantas que contém os compostos carboxiatractilosídeos, como *Atractylis grummifera*, *Cestrum parqui* e *Xantium* spp. (Cole *et al.*, 1989). Assim, é provável que o princípio tóxico do *C. axillare* sejam compostos similares aos carboxiatractilosídeos.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo identificar e quantificar marcadores que possam auxiliar no diagnóstico da intoxicação por folhas de *C. axillare* e *C. mariquitense*. Além disso, visou validar a técnica para identificação desses compostos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em amostras de folhas, fígado e fluido ruminal.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi identificar e quantificar marcadores químicos para o diagnóstico laboratorial da intoxicação por folhas de *C. axillare* e *C. mariquitense*.

Os objetivos específicos foram:

- determinar o conteúdo e perfil cromatográfico dos compostos isolados das folhas de *C. axillare* e *C. mariquitense*.
- determinar variações na quantificação dos compostos em comparação às diferentes épocas do ano e estágio vegetativo das plantas;
- determinar a presença dos compostos isolados das folhas de *C. axillare* e *C. mariquitense* em amostras de fígado e fluido ruminal de animais intoxicados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas tóxicas no Brasil

Definem-se como plantas tóxicas de interesse pecuário aquelas espécies que ingeridas pelos animais domésticos, sob condições naturais, causam danos à saúde dos animais (Pedroso *et al.*, 2007). No Brasil, o número de plantas conhecidas como tóxicas para ruminantes e equinos aumenta continuamente. Em 1990, mencionava-se a existência de 60 espécies tóxicas. Já em 2012, menciona-se 131 espécies e 79 gêneros (Pessoa *et al.*, 2013).

A ingestão de plantas tóxicas representa uma importante fonte de prejuízos econômicos para a produção animal. No Brasil, de uma população de 221.827.299 bovinos, pelo menos 5% (11.091.365) morre anualmente por diferentes causas e do total de mortes estima-se que entre 7,4% e 15,8% (entre 820.761 e 1.755.763 bovinos) sejam causadas por plantas tóxicas (Pessoa *et al.*, 2013).

O consumo dessas plantas por animais domésticos é determinado por diversos fatores que incluem palatabilidade, carência de forragens, fome, longos períodos de privação hídrica e introdução de animais (mantidos em locais onde não ocorre a planta) em pastagens desconhecidas, planta em brotação após as primeiras chuvas, acesso às plantas tóxicas, período de ingestão, variações de toxicidade, susceptibilidade/resistência, transporte (Pedroso *et al.*, 2007; Tokarnia *et al.*, 2012; Pessoa *et al.*, 2013).

3.2 Plantas hepatotóxicas

No Brasil, ocorrem pelo menos 35 espécies, distribuídas em 16 gêneros, de plantas hepatotóxicas. Estas plantas podem ser subdivididas em três grupos: plantas que causam necrose hepática aguda, plantas que causam fibrose hepática e plantas que causam fotossensibilização (Santos *et al.*, 2008). Dentre as plantas que causam necrose hepática aguda em ruminantes no Brasil estão *Cestrum axillare* (*C. laevigatum*), *Cestrum parqui*, *Cestrum corymbosum*, *Cestrum intermedium*, *Xantium cavanillesi*, *Vernonia mollissima* e *Sessea brasiliensis* (Santos *et al.*, 2008; Marques, 2010).

A insuficiência hepática ocorre somente em lesões difusas com comprometimento de pelo menos 75% do parênquima hepático. Os principais sinais clínicos causados pela insuficiência hepática são icterícia, edema, hemorragias, fotossensibilização e

encefalopatia hepática. Outros sinais clínicos da insuficiência hepática aguda incluem sinais de dor (como escoicear o abdômen, gemidos, dorso arqueado), constipação com fezes ressecadas, ocasionalmente recobertas por muco e estrias de sangue, e hipotonia ou atonia ruminal (Santos *et al.*, 2008).

3.3 *Cestrum axillare*

A família Solanaceae está incluída na subclasse Asteridae, ordem Solanales. Compreende cerca de 3.000 espécies e 90 gêneros de ampla distribuição, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. O gênero *Cestrum* pode ser encontrado como arbusto ou árvore (Silva *et al.*, 2003). A Figura 1 ilustra *C. axillare*, anteriormente *C. laevigatum*, que é a mais importante planta hepatotóxica do Brasil que causa intoxicação aguda em ruminantes (Tokarnia *et al.*, 2002).

Figura 1: Flores, frutos e folhas de *Cestrum axillare*, no município de Esmeraldas-MG.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

A descoberta da toxidez dessa planta, que é originária das Américas, se deu quando a planta foi introduzida na África do Sul, onde foi utilizada como cerca viva em fazendas. Ela é responsável pela doença de bovinos denominada “Chase Valley Disease”,

que ocorria no vale do rio Chase (Tokarnia *et al.*, 2012). No Brasil, esta planta ocorre em muitas áreas das regiões Sudeste e Centro-Oeste (Sul de Goiás e Mato Grosso do Sul) e litorâneas do Nordeste (Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco), sendo encontrada também em áreas não alagadas e grotas (Marques, 2010; Tokarnia *et al.*, 2012).

Sob condições naturais, a espécie mais frequentemente intoxicada é a bovina (Dobereiner *et al.*, 1969; Afonso; Santos, 1995; Tokarnia *et al.*, 2002; Coutinho *et al.*, 2013), mas já foram relatados casos em bubalinos (Barbosa *et al.*, 2010; Tokarnia *et al.*, 2002), caprinos (Brito *et al.*, 2010; Tokarnia *et al.*, 2002) e ovinos (Tokarnia *et al.*, 2012). Uma cabra mantida em um pasto nativo foi intoxicada pela ingestão natural das folhas frescas em um período atípico de estiagem (Brito *et al.*, 2010). Tokarnia *et al.* (2012) relataram a intoxicação de uma cabra que foi amarrada à um arbusto de *C. laevigatum* por dois dias, sem poder escolher outro alimento. Barbosa *et al.* (2000) descreveram uma mortandade de búfalos no município de Itaguaí, RJ.

Apenas a intoxicação aguda foi observada nos casos espontâneos, que pode ser reproduzida com doses de 10 a 50 g/kg da planta fresca. Experimentalmente, administrações diárias de doses subletais pelo período de algumas semanas gera intoxicação crônica (Tokarnia *et al.*, 2012), mas esta forma de intoxicação ainda não foi descrita sob condições naturais, apesar de ser provável que ocorra. Também experimentalmente, com administrações por via oral ou intragástrica, a planta e seus extratos não induziram efeitos tóxicos em suínos, aves, cobaias, ratos e camundongos. Em coelhos, a dose do extrato da planta que causou sinais discretos de intoxicação é muito alta, correspondendo a 70 g/kg dos brotos frescos (Barros; Dobereiner, 1969).

A planta não possui boa palatabilidade; os animais só a ingerem em casos de fome, quase sempre na época da seca e na escassez de pastagem. Na região Sudeste, costuma-se roçar os pastos no início do ano, quando são cortados também os arbustos de *C. axillare*. Então, na época da seca a planta estará em brotação e pode ser ingerida pelos animais. Além disto, as plantas murchas podem ficar mais palatáveis e serem ingeridas (Tokarnia *et al.*, 2012).

3.4 Sinais clínicos

Em bovinos, os primeiros sinais clínicos da intoxicação aguda são observados de 15 a 24 horas após a ingestão da planta, e a morte ocorre entre 6 e 48 horas após o aparecimento das primeiras manifestações clínicas (Tokarnia *et al.*, 2012). Coutinho *et*

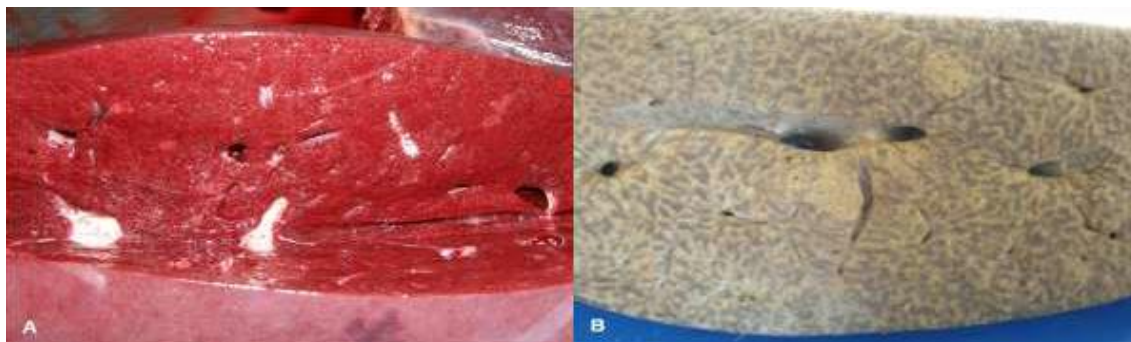
al. (2013) descreveram um surto de intoxicação natural na região Agreste de Pernambuco, afetando oito bovinos leiteiros, dos quais quatro vieram a óbito com evolução de 12 a 48 horas após o início da manifestação dos sinais clínicos. Os sinais clínicos observados na intoxicação aguda são apatia, anorexia, parada ruminal, dorso arqueado, constipação com fezes em formas de pequenas esferas, por vezes recobertas com muco e com estrias de sangue, tremores musculares, andar cambaleante e, às vezes, sialorreia (Tokarnia *et al.*, 2012). Sinais nervosos como excitação e agressividade são interpretados como manifestação da encefalopatia hepática, síndrome provocada por falha no processo de síntese hepática da ureia resultando em hiperamonemia, responsável por degeneração esponjosa no sistema nervoso central (Santos *et al.*, 2008; Tokarnia *et al.*, 2012). Além disso, a intoxicação por *C. axillare* induz hipoglicemia, que contribui para a sintomatologia nervosa (Tokarnia *et al.*, 2012).

Coutinho *et al.* (2013) citaram que um dos bovinos estudados se mostrou agressivo a ponto de ficar dois dias sem ser ordenhado, pois não se conseguia conduzi-lo ao centro de ordenha e passados quatro a cinco dias o animal apresentou plena recuperação. À medida que a doença evolui, os animais deitam-se em decúbito esterno-abdominal, rangem os dentes, encostam ou batem com a cabeça ou os pés no flanco, ficam em decúbito lateral, emitem gemidos e fazem movimentos de pedalagem. Há retração do globo ocular e hipotermia, evoluindo para a morte (Tokarnia *et al.*, 2012). Estes mesmos sinais foram observados por Barbosa *et al.* (2010) em búfalos intoxicados experimentalmente e que vieram a óbito. O índice de letalidade é alto (Tokarnia *et al.*, 2012).

3.5 Achados patológicos

Os achados de necropsia em bovinos mortos pela intoxicação aguda são bastante característicos. A lesão mais importante está localizada no fígado, cuja superfície de corte apresenta aspecto conhecido como de noz moscada (Fig. 2).

Figura 2: Fígado de bovino intoxicado por *C. axillare*. À esquerda (A), fígado apresentando superfície de corte com aspecto de “noz moscada”. À direita (B), fígado após ser fixado em formol à 10%.



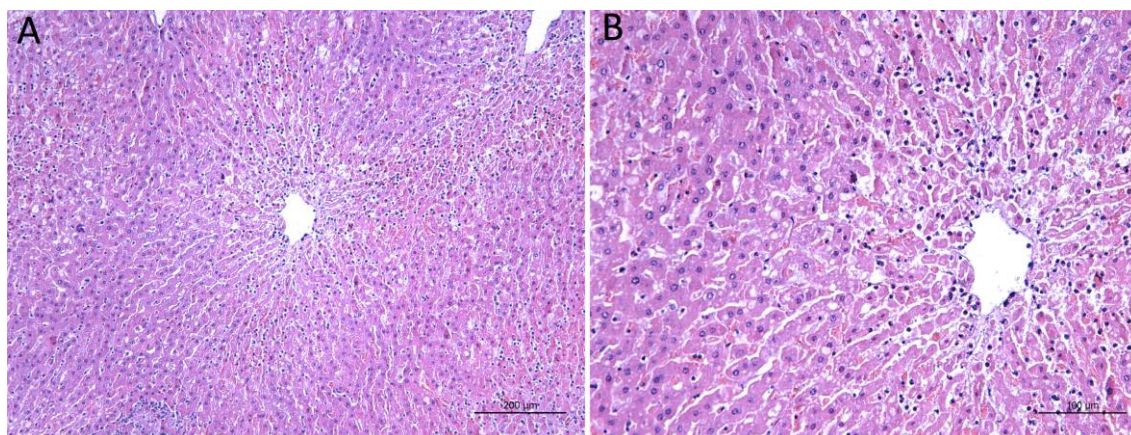
Fonte: Coutinho *et al.* (2013)

A parede da vesícula biliar apresenta edema, há ressecamento do conteúdo do omaso e do intestino grosso que aparece em forma de esferas envoltas por muco sanguinolento (Tokarnia *et al.*, 2012). Há hemorragias muito variáveis em quantidade e extensão, em diversos órgãos e tecidos, especialmente, no epi- e endocárdio, mas também tecido conjuntivo subcutâneo, intermuscular, peritrapeal, nas mucosas da vesícula biliar e do intestino delgado (Tokarnia *et al.*, 2012). Coutinho *et al.* (2013) encontraram áreas hemorrágicas no coração, abomaso, baço, bexiga e intestino delgado e grosso.

Em bubalinos, Marques (2010) observou fígado de cor alaranjada com aspecto de noz moscada, leve edema na parede da vesícula biliar, mucosa do abomaso levemente avermelhada e endocárdio do ventrículo esquerdo com equimoses extensas. Os exames histológicos revelam como lesão mais constante e significativa a acentuada necrose centrolobular com numerosas figuras de picnose e cariorrexia, acompanhada por congestão e hemorragia e esteatose das células hepáticas na periferia do lóbulo (Brito *et al.*, 2010; Tokarnia *et al.*, 2012; Coutinho *et al.*, 2013, Marinho *et al.*, 2018), conforme apresentado na Figura 4.

Marinho *et al.*, (2018), induziu experimentalmente a intoxicação utilizando folhas de *Cestrum axillare* na dose de 10mg/kg Pv e encontrou fígado apresentando aspecto de noz moscada ao corte e presença da planta no rúmen, retículo, omaso, abomaso e duodeno; os demais órgãos se encontravam macroscopicamente sem alterações dignas de nota. Ao exame histológico do fígado, foi verificado que os hepatócitos da região centrolobular apresentavam citoplasma intensamente eosinofílico, com núcleos picnóticos ou fragmentados (necrose centrolobular). Na região mediazonal, foram observados hepatócitos contendo microvacúolos intracitoplasmáticos bem delimitados (degeneração) e infiltrado neutrofílico moderado (Fig. 3).

Figura 3: (A) Fígado de caprino que recebeu folhas de *Cestrum axillare* na dose de 10g/kg mostrando necrose nas áreas no entorno da veia centrolubular, vacuolização dos hepatócitos ao redor das áreas de necrose. HE, obj.10x. (B) Fígado do mesmo animal com neutrófilos entre as células necróticas, picnose, diferenciação entre as células necróticas e hepatócitos normais. HE, obj.20x



Fonte: Marinho *et al.*, 2018, p. 859

Os principais achados de necropsia nos casos crônicos experimentais em bovinos também consistem em alterações no fígado, que se apresenta endurecido, e ao corte, com lobulação bastante evidente. As alterações histológicas consistem em cirrose, caracterizada por proliferação de tecido conjuntivo fibroso, condensação e desarranjo das fibras reticulares (Tokarnia *et al.*, 2012).

3.6 Diagnóstico

O dado mais importante para o diagnóstico é o aspecto de noz moscada da superfície de corte do fígado. Na presença de sinais físicos nervosos, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com outras doenças que afetam o sistema nervoso central (Tokarnia *et al.*, 2012). Os achados clínicos, confirmação visual da planta em quantidade e com evidências de ingestão auxiliam no diagnóstico presuntivo (Brito, 2010; Coutinho *et al.*, 2013).

A avaliação bioquímica sérica pode auxiliar no diagnóstico da intoxicação em animais vivos. Para avaliar a função hepática, não é indicada a mensuração de apenas uma enzima ou metabólito sérico, pois existe interdependência do fígado com outros órgãos. Os testes de função hepática incluem aqueles que medem o transporte (secreção, conjugação e excreção) tais como bilirrubina e ácidos biliares, a atividade enzimática no soro para detectar necrose e colestase, e os bioquímicos que avaliam a capacidade hepática de metabolização de nutrientes como carboidratos e proteínas. Há várias enzimas

intracelulares que se encontram em grandes concentrações nos hepatócitos, e nos casos de elevadas atividades séricas é possível que esteja ocorrendo uma doença hepática ativa (Santos *et al.*, 2008; Marques, 2010; Coutinho *et al.*, 2013).

Em bovinos adultos, as atividades séricas de GGT, fosfatase alcalina (FA), sorbitol desidrogenase e AST são as mais úteis na identificação de doença hepática crônica (Santos *et al.*, 2008). A avaliação de bovinos intoxicados por *C. axillare* revelou elevação nos valores das proteínas totais, globulina, AST e GGT, e redução na relação albumina/globulina (Coutinho *et al.*, 2013). Marques (2010), em bubalinos experimentalmente intoxicados, encontrou aumento de GGT, AST e bilirrubina em todos os animais após a ingestão da planta, independente da dose recebida.

3.7 Tratamento

Não há tratamento específico eficaz para os animais intoxicados por *C. axillare*. Um tratamento proposto é a base de glicose por via endovenosa e de purgantes oleosos (óleo de rícino ou outro óleo purgativo), mas apresenta baixa eficácia (Tokarnia *et al.*, 2012). Coutinho *et al.* (2013) instituíram um tratamento à base de substâncias energéticas como glicose e/ou antitóxicos associados a soluções de cálcio e vitaminas do complexo B, todos os animais tiveram plena recuperação clínica. Essa recuperação pode ter sido devido ao tratamento, bem como da retirada dos animais das pastagens que continham a planta tóxica impedindo que eles continuassem se intoxicando. A profilaxia consiste em arrancar a planta com enxada ou erradicá-la das pastagens com herbicida.

3.8 Princípios tóxicos

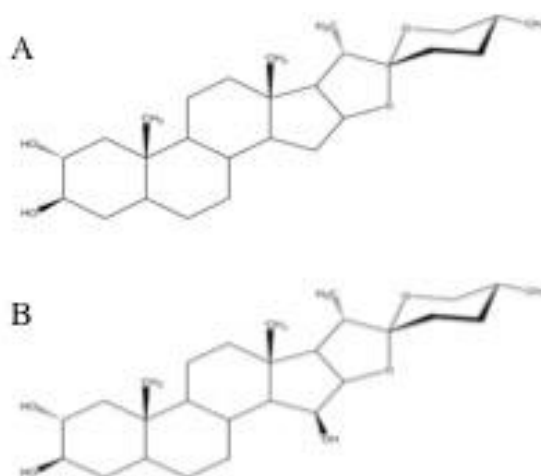
O princípio ativo responsável pela intoxicação ainda não está definitivamente comprovado. Barros e Dobereiner (1968) citaram que os frutos, as folhas, a casca e o caule são tóxicos. Estudos fitoquímicos de *C. axillare* identificaram que os frutos verdes contêm saponinas denominadas gitogenina e digitogenina (Canham, 1950). Além disto, esta planta contém um princípio amargo denominado cestrumida (Tokarnia *et al.*, 2012). A cestrumida provavelmente deve ser a responsável pela baixa palatabilidade da planta.

3.8.1 Saponinas

As saponinas são compostos presentes em uma grande variedade de plantas e produtos que são importantes para a nutrição animal e humana. Vários efeitos biológicos têm sido descritos para as saponinas, como imunoestimulante, diminuição do colesterol e anticarcinogênico. Saponinas esteroidais presentes em algumas plantas tóxicas e forragens são metabolizadas no rumem e absorvidas como sapogeninas, inibem os protozoários do rumem provavelmente pela reação com esteróis de membrana promovendo, assim, a defaunação (Cheeke, 1996). Além disto, diversas saponinas possuem atividade hemolítica devido à afinidade da saponina com o colesterol da membrana da hemácia (Alvares, 2006).

Em animais de produção, as saponinas podem interferir com o crescimento, o ganho de peso, a ingestão de alimentos e a reprodução (Cheeke, 1996). Algumas saponinas, como por exemplo as presentes no pericarpo dos frutos do *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril, timbaúva, orelha-de-macaco), podem promover efeito hepatotóxico caracterizado por necrose hepatocelular difusa (Gadelha *et al.*, 2015). Cuartas e Castano (2008) observaram as saponinas gitogenina e digitogenina nas folhas, frutos, talo e flores de *Cestrum nocturnum* (dama da noite). Canham e Warrem (1950) encontraram as saponinas denominadas gitogenina e digitogenina (Fig. 5) nos frutos de *C. axillare*.

Figura 4: Estrutura molecular da gitogenina (A) e digitogenina (B).

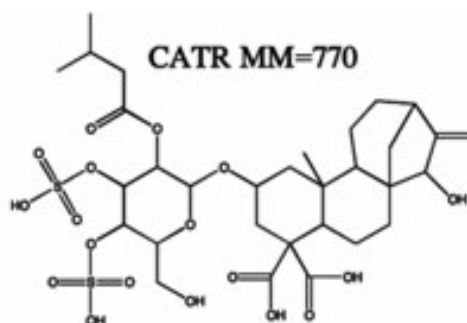


Fonte: Canham e Warrem (1950)

3.8.2 Carboxiatractilosídeos

Os carboxiatractilosídeos (Fig. 6) são glicosídeos diterpenoides produzidos por diversas espécies de plantas, como *Atractylis grummifera*, *Cestrum parqui* e *Xantium* spp.

Figura 5: Estrutura molecular do carboxiatractilosídeo.



Fonte: Carlier *et al.*, 2014

Os frutos da planta *Xantium* spp. são responsáveis por intoxicações em bovinos em vários países, incluindo Estados Unidos, Argentina e Brasil (Carlier *et al.*, 2014). Os carboxiatractilosídeos inibem a translocação da adenina nucleotídeo que transporta adenosina difosfato (ADP) na membrana mitocondrial, inibindo dessa forma a síntese de adenosina trifosfato (ATP), essa inibição da fosforilação oxidativa resulta em um menor aporte de energia para célula, o que induz a morte celular programada (Botha *et al.*, 2014). O transporte de vários metabólitos (nucleotídeos, fosfatos, piruvato, oxoglutarato, entre outros) através da membrana mitocondrial é essencial para o metabolismo eucariótico (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003).

A ação do carboxiatractilosídeo é exercida principalmente em células ricas em mitocôndrias, tais como os hepatócitos e as células do epitélio tubular proximal (Calmes *et al.*, 1994; Daniele *et al.*, 2005). Essa inibição da fosforilação oxidativa faz com que inicialmente os níveis plasmáticos de glicose estejam aumentados devido a gliconeogênese, mas após a reserva hepática acabar, ocorre severa hipoglicemia (Cole, 1989). A hipoglicemia gera danos severos ao organismo, tais como: depressão respiratória, hipóxia, acidose devido ao aumento de ácido lático no plasma e convulsões (Daniele *et al.*, 2005).

Os sinais clínicos da intoxicação em bovinos, caprinos e ovinos são agudos e consistem em apatia, anorexia, parada dos movimentos ruminais, dores abdominais, tenesmo retal com discreto prolapso de reto, sudorese, desidratação progressiva com retração dos globos oculares e sinais nervosos caracterizados por incoordenação motora, tremores musculares generalizados e agressividade (Cole *et al.*, 1989; Driemeier *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2008).

Cole *et al.* (1989) relatam que os carboxiatractilosídeos induzem hipoglicemia em ratos, coelhos e cães. Da mesma forma, um estudo conduzido em humanos naturalmente intoxicados por *Xantium strumarium*, revelou uma hiperglicemia nas primeiras horas após a intoxicação e em seguida acentuada hipoglicemia persistente (Turgut *et al.*, 2005). Outro efeito destes compostos é a hepatotoxicidade, caracterizada por aumento nas atividades séricas das enzimas sorbitol desidrogenase, AST e GGT associada à necrose hepática centrolobular observada microscopicamente (Cole *et al.*, 1989). Além disto, em bovinos intoxicados espontaneamente por *Xanthium cavanillesii* (planta que contém carboxiatractilosídeo) observaram acentuada necrose coagulativa hepatocelular centrolobular acompanhada de congestão e hemorragia (Driemeier *et al.*, 1999).

Existem diversas técnicas analíticas disponíveis para determinar a presença do carboxiatractilosídeo. Botha *et al.* (2014) estudaram a presença de carboxiatractilosídeos na planta *X. strumarium* por meio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Em outro estudo, Carlier *et al.* (2014) validaram o método de quantificação de carboxiatractilosídeo no sangue em casos de intoxicação por *A. gummifera* utilizando também a LC-MS/MS.

A sintomatologia clínica e os achados patológicos induzidos na intoxicação por *C. axillare* são similares aos que ocorrem na intoxicação por diversas espécies de plantas que contém como princípio tóxico o carboxiatractilosídeo (Santos *et al.*, 2008). No entanto, a ocorrência deste composto em *C. axillare* ainda não foi pesquisada.

3.10.1 Sinais clínicos da intoxicação

Os sinais clínicos produzidos pelas plantas que contém carboxiatractilosídeo são muito semelhantes. O início dos sinais clínicos após administração oral dos frutos de *X. cavanillesii* a bovinos foi de 6 a 12 horas, com curso clínico de 5h30min e 8 horas. Neste estudo, um animal apresentou início dos sinais somente após 18 horas, e se recuperou da intoxicação após 90 horas (Colodel; Driemeier; Pilati, *et al.*, 2000).

Em ovinos os sinais iniciaram com 5 a 20 horas após a administração dos frutos, e o quadro clínico foi superagudo ou agudo com evolução oscilando entre 90 minutos e 13 horas (Loretti *et al.*, 1999). Caprinos que receberam folhas secas de *Cestrum parqui*, experimentalmente, tiveram os sinais iniciados em 24 horas e a evolução até a morte ocorreu após 54 e 60 horas (Rossanigo; Frigerio, 2000).

Driemeier e colaboradores (1999), em um surto de intoxicação espontânea pelos frutos de *X. cavanillesii* em bovinos, observaram apatia, anorexia, tenesmo retal com discreto prolapso de reto, desidratação progressiva com retração dos globos oculares, tremores musculares generalizados e agressividade. No entanto, bezerros que ingeriram plantas maduras de *X. strumarium*, apresentaram sinais clínicos variando de morte aguda a hiperexcitabilidade, cegueira, tensão muscular, marcha espástica com cabeça erguida e orelhas eretas, evoluindo para decúbito lateral e convulsão (White *et al.*, 1990).

Ovinos, quando intoxicados experimentalmente com diferentes doses de frutos *X. cavanillesii*, apresentaram prostração, permanecendo em estação, imóveis e com as orelhas caídas, totalmente alheios ao ambiente (sonolentos), com o olhar fixo e movimentos mastigatórios vazios, ptose palpebral e cabeça baixa, próxima ao solo. Abundante corrimento seromucoso espesso pelas narinas, tremores musculares (tremores discretos na cabeça e se intensificavam progressivamente acometendo também os músculos dos membros até tornarem-se generalizados). Quando exercitados, os tremores acentuavam-se. Acentuada incoordenação motora, andar cambaleante, relutância em caminhar, travando os membros, ou andar rígido, com passos curtos, vacilantes e lentos. Acentuado desequilíbrio, balançando o corpo de um lado para o outro e para a frente ou então com os membros posteriores cruzados. Devido à grande instabilidade, membros ficam lateralmente afastados e a cabeça baixa próxima ao solo, assumindo uma posição-de-cavelete (Loretti *et al.*, 1999).

McLennan e Kelly (1984), ao estudar a intoxicação por *C. parqui* na espécie bovina, relataram movimentos de pedalagem, fasciculação muscular, convulsão, decúbito esternal evoluindo para decúbito lateral, estase ruminal, petéquias na conjuntiva, desidratação e temperatura retal normal. Caprinos que receberam folhas secas de *C. parqui* experimentalmente, demonstraram decúbito esternal com opistótono, salivação excessiva, aumento da frequência cardíaca, excitação e temperatura retal de 35°C (Rossanigo; Frigerio, 2000).

O quadro neurológico pode ser explicado pelo menor aporte de glicose às células do sistema nervoso central, que são muito sensíveis a alterações na glicemia. A inibição

da fosforilação oxidativa resulta em hipóxia celular, acelerando assim a glicólise anaeróbia e a glicogenólise. Inicialmente, ocorre uma quebra nas reservas de glicogênio, resultando em uma hiperglicemia transitória, seguida por uma fase de hipoglicemia persistente. Com a acidose, hipoglicemia e hipóxia o animal desenvolve convulsão, coma podendo até mesmo evoluir para morte (Turgut *et al.*, 2005)

A intoxicação por *A. gummifera* é mais comumente relatada em crianças que consumiram inadvertidamente chá feito com os rizomas da planta. A intoxicação inicia rapidamente, com sintomas de dor abdominal, vômitos, cianose, contrações musculares generalizadas e convulsões. A taxa de letalidade é alta, sendo encontrada lesão hepática centrolobular e lesão renal (Daniele *et al.*, 2005).

3.10.2 Alterações hematológicas

Um estudo conduzido experimentalmente em bezerros, que receberam cotilédones de *X. strumarium*, não encontrou diferenças nos parâmetros hematológicos avaliados (hemoglobina, hematócrito, proteínas totais e leucócitos) (Martin, 1983). Já outro estudo, que acompanhou crianças acidentalmente intoxicadas por *A. gummifera*, observou leucocitose (Daniele *et al.*, 2005). O aumento na contagem dos leucócitos também foi observado em bezerros experimentalmente intoxicados por folhas de *C. parqui*, com contagens aumentando de $10,2 \times 10^3$ para $52,1 \times 10^3$ leucócitos/mm³ (McLennan; Kelly, 1984).

3.10.3 Alterações bioquímicas

Colodel e colaboradores (2000) administraram frutos de *X. cavanillesii* a bovinos com idade entre 5 e 24 meses e observaram hipoglicemia iniciando após 12 a 13 horas; após 15 horas da administração, a glicemia observada foi de apenas 30 mg/dl. Entretanto, bezerros que receberam cotilédones *X. strumarium* apresentaram os níveis de glicose dentro da faixa de normalidade nos períodos iniciais, seguida por uma hiperglicemia transitória (5 horas) e então hipoglicemia severa (11 horas) (Martin, 1983). Turgut e colaboradores (2005), relataram hipoglicemia severa e acidose metabólica em crianças que morreram em decorrência da intoxicação acidental por *X. strumarium*.

O aumento na atividade de aspartato aminotransferase (AST) foi relatado por Colodel e colaboradores (2000); os valores de AST chegaram a 1235 U/L em um animal

e 6475 U/L em outro animal (referência para bovinos: até 132 U/L). Em concordância, um estudo realizado por McLennan e Kelly (1984) em bezerros, foi observado aumento na atividade sérica dessa enzima 20h após a administração de folhas de *C. parqui*, com valores de 1202-1413 U/L. Xue e colaboradores (2014) administraram frutos de *X. strumarium* a ratos Wistar machos e observaram aumento estatisticamente significante na atividade de AST, nas doses de 15 g/kg e 30 g/kg. Em uma intoxicação acidental humana por *X. strumarium*, a atividade de AST se encontrou expressivamente aumentada em todos os casos estudados (TURGUT *et al.*, 2005).

O aumento na atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) foi observado em ratos após a administração de *X. strumarium* nas doses de 15 g/kg e 30 g/kg (Xue *et al.*, 2014). Da mesma forma, Turgut e colaboradores (2005) relataram aumento na atividade dessa enzima nos casos de intoxicações humanas. Em um estudo realizado por Colodel *et al.* (2000), onde foram administrados frutos de *X. cavanillesii* a bovinos nas doses de 5 g/kg, 10 g/kg e 15 g/kg não afetou a atividade sérica da fosfatase alcalina (FA). Por outro lado, um estudo realizado por Xue e colaboradores (2014), que administraram 30 g/kg de frutos de *X. strumarium* a ratos, foi relatado aumento na atividade da FA.

Na intoxicação por *C. parqui* em bezerros, a bilirrubina total teve aumento 25 horas após a administração das folhas da planta (McLennan; Kelly, 1984). Outros autores também relataram aumento nos níveis séricos de bilirrubina total em intoxicações com *X. strumarium* em crianças (Turgut *et al.*, 2005) e em ratos Wistar (Xue *et al.*, 2014). Aumento na atividade sérica de creatinofosfoquinase (CPK) foi observado por Martin (1983) 11 horas após a indução da intoxicação com *X. strumarium* em bovinos. Aumento também relatado por Turgut e colaboradores (2005) ao estudar a intoxicação acidental por *X. strumarium* em crianças.

A albumina sérica teve aumento significante quando ratos Wistar foram submetidos a dose de 30 g/kg dos frutos de *X. strumarium* (Xue *et al.*, 2014). Por outro lado, pacientes humanos intoxicados espontaneamente pela mesma planta não apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de albumina (Turgut *et al.*, 2005). O aumento no tempo de protrombina foi observado por Turgut e colaboradores (2005), em pacientes humanos intoxicados por *X. strumarium*, e por McLennan e Kelly (1984) em bezerros intoxicados por *C. parqui*.

O pH sanguíneo foi mensurado por Turgut e colaboradores (2005) em pacientes humanos intoxicados por *X. strumarium*; em todos os casos analisados esteve abaixo dos valores de normalidade, indicando acidose metabólica. A dosagem da creatinina não

revelou diferença estatística quando foram administrados frutos de *X. strumarium* a ratos Wistar (Xue *et al.*, 2014). No entanto, no trabalho de Turgut e colaboradores (2005), de nove casos de pessoas intoxicadas por *X. strumarium* acompanhados, quatro apresentaram os níveis de creatinina acima do intervalo de normalidade.

3.11 Diagnósticos diferenciais

Existem várias espécies de plantas e micotoxinas hepatotóxicas que apresentam curso clínico semelhante a intoxicação por plantas do gênero *Cestrum*. Dessa forma, o diagnóstico diferencial é importante ferramenta de auxílio no diagnóstico.

3.11.1 Etiopatogenia das hepatopatias em ruminantes

Nos ruminantes, as hepatopatias podem ser causadas por diferentes agentes, como a intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos e aflatoxinas. A encefalopatia hepática é o resultado da incapacidade do fígado em metabolizar a amônia em ureia; o excesso de amônia circulante é extremamente nocivo para as células do sistema nervoso central (SNC), principalmente do cérebro. A encefalopatia hepática pode ser resultante da intoxicação por diversos agentes, embora em alguns casos o princípio tóxico ainda não esteja totalmente elucidado (Damiani *et al.*, 2013).

No Brasil, a intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes é frequentemente relatada pela ingestão de plantas do gênero *Senecio* e *Crotalaria* (Lucena *et al.*, 2010). Os sinais clínicos incluem inapetência, diarreia, depressão, tenesmo e sinais nervosos como agressividade, andar em círculos e alterações no comportamento. Os principais achados de necropsia e histopatológicos estão concentrados no fígado, incluindo alteração na coloração, presença de nódulos de regeneração hepática e degeneração gordurosa com áreas de fibrose. No encéfalo, é observada degeneração esponjosa da substância branca. O aumento das atividades séricas das enzimas hepáticas GGT e AST são achados comuns (Panziera *et al.*, 2017)

A aflatoxicose é causada pelos metabólitos hepatotóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Os ruminantes estão entre as espécies mais resistentes, já que parte das aflatoxinas são degradadas pela microbiota ruminal. Desse modo, acredita-se que os animais jovens sejam mais susceptíveis à intoxicação (Pierezan *et al.*, 2012). Os efeitos da intoxicação são hepatotoxicidade, hepatocarcinogenicidade, nefrotoxicidade e imunossupressão.

Os sinais clínicos incluem depreciação no estado nutricional geral, pelos ásperos, anorexia, baixa na produção de leite, imunossupressão, icterícia, bruxismo, andar em círculo, tenesmo, prolapso retal e diarreia. É observado aumento na atividade sérica das enzimas de origem hepática GGT, AST e FA. À necropsia, observa-se fígado aumentado de volume e coloração amarelo clara, vesícula biliar distendida, icterícia e ascite. A histopatologia hepática revela fibrose, esteatose hepática e proliferação dos ductos biliares (Pierezan *et al.*, 2012).

3.11.1 Etiopatogenia da encefalopatia hepática

A encefalopatia hepática é consequência do aumento dos níveis plasmáticos da amônia por falência do ciclo da ureia, devido a falência hepática. É causada pela incapacidade do fígado em metabolizar substâncias que atingirão o cérebro e causarão lesão ao parênquima, sendo a amônia o principal fator responsável pela patogênese da encefalopatia (Córdoba; Mínguez, 2008; Daminiani *et al.*, 2013). A amônia é gerada no rúmen de diferentes formas: pelos componentes nitrogenados da dieta, pela deaminação da glutamina e pela quebra da ureia pela urease na microbiota ruminal.

Em animais saudáveis, a amônia é convertida em ureia pelo ciclo da ornitina-citrulina-arginina-ureia (ciclo da ureia) nos hepatócitos (Daminiani *et al.*, 2013; Wouters *et al.*, 2013). A amônia presente no plasma atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, atingindo as células do SNC. Em concentrações suficientemente elevadas, a amônia causa danos severos. As principais hipóteses para os mecanismos destes danos são: anormalidades no metabolismo dos neurotransmissores e neurotoxicidade induzida por stress oxidativo (Córdoba; Mínguez, 2008).

Há o envolvimento de astrócitos, que são as primeiras células lesadas em agressões ao SNC, afetando o equilíbrio de fluidos e eletrólitos (Wouters *et al.*, 2013). Nos astrócitos, o glutamato é transformado em glutamina, que incorpora uma molécula de amônia e é transportada para o neurônio pré-sináptico, onde a glutamina será novamente transformada em glutamato. Este ciclo é afetado pela amônia e, provavelmente, a neurotransmissão glutamatérgica prejudicada, induz parte das manifestações neurológicas apresentadas na encefalopatia hepática (Córdoba; Mínguez, 2008).

Outra via de neurotransmissão afetada pelo excesso de amônia é a gabaérgica, responsável por alguns sinais clínicos apresentados na encefalopatia hepática (Daminiani

et al., 2013). Também foi demonstrado que a amônia induz stress oxidativo, gerando radicais livres e nitrotirosina proteica no encéfalo. Este processo é crítico para a função mitocondrial e secundariamente pode causar falência na neurotransmissão normal (Córdoba; Mínguez, 2008).

3.11.2 Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos

Os alcaloides pirrolizidínicos (APs) são fitoquímicos de ocorrência natural em cerca de 600 espécies de plantas de diversos gêneros e famílias. Os gêneros *Senecio*, *Crotalaria*, *Heliotopium* e *Echium* abrigam as principais espécies envolvidas na intoxicação espontânea por APs em herbívoros e humanos (Lucena *et al.*, 2010).

A hepatotoxicidade dos APs está associada à insaturação entre os carbonos 1 e 2 que, na presença de oxidases, leva a formação de pirróis. Estes se associam a grupos nucleofílicos de macromoléculas, como sulfidril, hidroxila e grupos amino de enzimas, globulinas, hemoglobinas, bem como purinas e pirimidinas, formando ligações cruzadas irreversíveis com o ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), e acarretando efeitos citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Nobre *et al.*, 2004).

Nos hepatócitos, é gerada megalocitose, por um efeito de inibição da mitose. Essa inibição ocorre principalmente devido aos pirróis éster no retículo endoplasmático. Os APs induzem a megalocitose devido a danos no DNA, conduzindo uma mutação nos genes reguladores do ciclo celular. Como os núcleos das células não se dividem e continuam a sintetizar DNA, aumentam de tamanho e morrem, desta forma são substituídos por tecido fibroso ou por nódulos regenerativos (Krabbe, 2014).

3.11.3 *Senecio*

O gênero *Senecio* pertence à família Asteraceae e é cosmopolita, mas a maior distribuição do gênero é na América do Sul, com cerca de 500 espécies. No Brasil, há 128 espécies deste gênero, embora algumas delas sejam pouco comuns. A intoxicação em bovinos é mais comum, apesar de que também ocorra em caprinos e ovinos (Karam *et al.*, 2011). A intoxicação em ovinos é menos frequente devido à maior resistência dessa espécie animal, no entanto é comum o pastejo por ovinos em áreas com grande prevalência da planta para depois os bovinos serem introduzidos. Embora, a intoxicação

possa ocorrer quando a lotação é menor que 0,2 ovinos por hectare e há carência acentuada de forragens (Tokarnia *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado por Lucena e colaboradores (2010), a intoxicação por *Senecio* spp. foi responsável por 23% de todas as causas de morte confirmadas em bovinos necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Segundo Tokarnia *et al.*, 2012, a intoxicação por plantas do gênero *Senecio* são responsáveis por mais de 50% das mortes causadas por plantas tóxicas em bovinos no Rio Grande do Sul.

O curso clínico da intoxicação pode variar da forma aguda, na qual bezerros morreram 1 a 2 dias após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos, até a crônica, caracterizada por vacas que resistiram por 2 a 3 semanas. Os animais apresentam inapetência, depressão, diarreia com fezes verde-escuras, líquidas, acompanhadas de tenesmo (contrações abdominais, gemidos de dor, e alguns poucos, apresentaram prolapso de reto). Sinais nervosos caracterizaram-se pelo andar cambaleante ou em círculos, agressividade, apoio da cabeça em qualquer obstáculo e paraplegia dos membros posteriores (Basile *et al.*, 2005).

Panziera e colaboradores (2017) observaram emagrecimento, fraqueza, pelos arrepiados, diarreia e edema na região submandibular, e a evolução até a morte ocorreu com 15 dias após a ingestão da planta. Alguns destes bovinos apresentavam alterações no comportamento, agressividade e sinais neurológicos. Os achados de necropsia mais frequentes são a firmeza acentuada e difusa do fígado, com cápsula cinzenta, e presença de nódulos de regeneração de vários tamanhos no parênquima hepático, que podem ser vermelhos ou amarelo-alaranjados (degeneração gordurosa). Outras lesões frequentes são edema das dobras do abomaso, edema do mesentério, distensão da vesícula biliar, com edema da parede e, às vezes, com hiperplasia polipoide, ascite, hidrotórax, edema dos linfonodos mesentéricos e hemorragias nas serosas da cavidade abdominal (Lucena *et al.*, 2010).

Histologicamente, são encontradas fibrose periportal, marcada proliferação de ductos biliares, moderada megalocitose e algumas áreas de fibrose intensa (fibrose em ponte). Áreas multifocais de moderada a acentuada necrose de hepatócitos, hemorragia e numerosas veias centrolobulares circundadas por abundante tecido conjuntivo fibroso (lesão veno-oclusiva) (Panziera *et al.*, 2017). No encéfalo, foi observada acentuada vacuolização (*status spongiosus*) principalmente na junção entre a substância cinzenta e a substância branca subcortical do telencéfalo frontal parietal e occipital e na substância

branca dos pedúnculos cerebelares (Riet-Correa *et al.*, 2002; Lucena *et al.*, 2010; Wouters *et al.*, 2013; Krabbe, 2014; Panziera *et al.*, 2017). Os exames bioquímicos são muito importantes para ajudar no diagnóstico da seneciose, mas não confirmam a intoxicação. As alterações nas atividades de GGT e AST são frequentes em casos de lesão hepática (Krabbe, 2014; Panziera *et al.*, 2017).

3.11.4 *Crotalaria*

A intoxicação por plantas do gênero *Crotalaria* já foi relatada em bovinos, ovinos, caprinos e equinos. São descritas intoxicações naturais e experimentais nas diversas espécies (Boghossian *et al.*, 2007; Lacerda *et al.*, 2021). No Brasil já foi registrada a ocorrência de, pelo menos, 40 espécies de *Crotalaria*. As espécies mais comuns são *Crotalaria mucronata* Desv. (= *C. striata* DC), *C. pallida*, *C. saltiana*, *C. vitelina* Kerr, *C. anagyroides* H.B.K. e *C. retusa* L. (Tokarnia *et al.*, 2000). Recebem comumente nomes como “xique-xique”, “guizo-de-cascavel”, “chocalho-de-cascavel” e possuem vagens secas que quando tocadas se assemelham ao som emitido pela cauda da cascavel (Honório Junior *et al.*, 2009).

As crotalárias são importantes na agricultura pela capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico no solo, por produzir húmus e fornecer cobertura vegetal para plantio direto, contudo quando ingeridas, podem intoxicar animais devido aos alcaloides pirrolizidínicos (Boghossian *et al.*, 2007). A monocrotalina é o principal AP encontrado nas plantas do gênero *Crotalaria* e, embora seja um alcaloide primariamente hepatotóxico, efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotóxicos, teratogênicos e carcinogênicos também estão relacionados a ele (Honório Júnior *et al.*, 2009).

Em um rebanho de ovinos no Rio Grande do Norte, 22,6% dos ovinos intoxicados morreram com evolução clínica de 2 a 5 dias. Já em caprinos no estado da Paraíba, 13,3% dos caprinos intoxicados morreram. Um rebanho de 20 bovinos, que ingeriram *C. retusa* cinco animais adoeceram e dois morreram (Lucena *et al.*, 2010). Os sinais clínicos encontrados em bovinos foram andar sem rumo, andar cambaleante, colidir contra obstáculos, cegueira, agressividade ou depressão, fotossensibilização, perda de peso, incoordenação e decúbito (Lucena *et al.*, 2010, Queiroz *et al.*, 2013).

Em ovinos, os sinais clínicos foram anorexia, apatia, icterícia, ascite e incoordenação. Em caprinos, estes sinais também ocorreram além de cólicas, bruxismo e o não desenvolvimento de icterícia. Já os bovinos, todos manifestaram

fotosensibilização, perda de peso, incoordenação e decúbito (Lucena *et al.*, 2010). Os principais achados de necropsia são congestão hepática acentuada com padrão lobular evidente ao corte, vesícula biliar repleta, nódulos de regeneração de vários tamanhos no parênquima hepático, edema em mesentério próximo à vesícula biliar, rins com áreas pálidas na cortical, mucosa do duodeno espessada discretamente, edema das dobras do abomaso, edema do mesentério, petéquias na serosa do rúmen e do retículo e no tecido subcutâneo da região do tórax, ascite, hidrotórax, edema dos linfonodos mesentéricos e hemorragias nas serosas da cavidade abdominal (Lucena *et al.*, 2010; Queiroz *et al.*, 2013).

Bovinos intoxicados pelas sementes de *C. mucronata*, apresentaram diminuição no consumo de alimentos, pulso venoso positivo, decúbito externo-abdominal, taquicardia, taquipneia, fezes ressequidas, dificuldade em levantar-se, extremidades frias, ranger de dentes, diminuição dos movimentos ruminais e nos períodos antecedentes a morte observaram nistagmo, midríase e palidez das mucosas (Boghossian *et al.*, 2007).

Os achados histológicos encontrados por Boghossian e colaboradores (2007) foram principalmente no pulmão, fígado e coração. No pulmão foi encontrado espessamento da parede alveolar pela proliferação de células mesenquimais e fibrose intersticial. No fígado verificaram-se congestão centrolobular e necrose coagulativa e, às vezes, lise de hepatócitos. E no miocárdio foram observados miócitos grandes e com núcleos algo bizarros, “*caterpillar cells*” e miócitos com núcleos enfileirados (“*Kernreihen*”). Ainda se constatou vacuolização de miócitos e pequenas áreas de necrose, congestão e edema.

No entanto, Queiroz e colaboradores (2013) não observaram lesões pulmonares em bovinos intoxicados naturalmente por *Crotalaria incana*. Embora tenha sido relatado no fígado necrose hemorrágica centrolobular, megalocitose dos hepatócitos foi observada nas áreas onde não havia necrose, focos de fibrose hepática na região centrolobular. Nos rins observou-se congestão medular e tumefação das células do epitélio tubular. E no sistema nervoso central encontrados edema e espongiose no tálamo e na substância branca do cerebelo e hemorragia perivascular no colículo rostral.

3.11.5 Aflatoxinas

A aflatoxicose é o resultado da micotoxicose causada pelos metabólitos hepatotóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A doença já foi relatada em humanos, primatas não

humanos, gatos, cães, roedores, aves, bovinos e búfalos após a ingestão de alimento contaminado pela aflatoxina. Os ruminantes estão entre as espécies mais resistentes, uma vez que as aflatoxinas são parcialmente degradadas pela microbiota ruminal.

Assim, os bovinos são classificados como medianamente sensíveis e os ovinos como resistentes (Pierezan *et al.*, 2012). Os bovinos jovens são mais susceptíveis a doença do que os adultos (Pierezan *et al.*, 2010). Foram identificados vários tipos de aflatoxinas, sendo os principais AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. A AFB₁ é considerada a forma mais tóxica. As aflatoxinas são consideradas potentes agentes carcinogênicos e possuem atividades hepatotóxica, nefrotóxica e imunossupressora (Hennemann *et al.*, 1996; Coelho, 2010).

Devido ao baixo peso molecular, as aflatoxinas são facilmente absorvidas quando ingeridas por via oral. A absorção ocorre por difusão passiva no intestino delgado, principalmente no duodeno. Após a absorção, as aflatoxinas chegam ao fígado através do sistema porta hepático, onde são concentradas devido a sua elevada permeabilidade na membrana dos hepatócitos. No fígado, elas são ativadas pelo citocromo P450, etapa importante para o potencial carcinogênico que essas moléculas apresentam (Domingues, 2015). A excreção pode ocorrer pela bile, fezes, urina, leite e ovos. Na maioria das espécies animais, a excreção inicia 24 horas após a exposição (Dal Pozzo, 2015).

Os sinais clínicos incluem deterioração no estado nutricional geral, pelos ásperos, anorexia, perda gradual do apetite, perda de peso, baixa na produção de leite, imunossupressão, icterícia, apatia severa, bruxismo, andar em círculo, tenesmo, prolapso retal e diarreia que pode ser tingida de sangue (Pierezan *et al.*, 2010; Pierezan *et al.*, 2012). Garrett e colaboradores (1968) administraram diferentes doses de aflatoxina a bovinos de 6 a 8 meses de idade e em diferentes concentrações. Nas doses de 700 e 1000ppb, os animais apresentaram decréscimo no ganho de peso e aumento no peso do fígado e rins.

As atividades das enzimas de origem hepática estão constantemente elevadas em casos de aflatoxicose. É mais comum encontrar aumento de GGT, AST, ALT e sorbitol desidrogenase. Elevação nos níveis de bilirrubina também podem ocorrer (Coppock *et al.*, 2018). Em um estudo realizado em bezerros, em que a aflatoxina foi administrada diariamente aos animais, houve o aumento da atividade da FA (Lynch, 1972). Em concordância com este estudo, Pierezan e colaboradores (2012), em um estudo experimental em bezerros, encontraram valores aumentados da enzima FA a partir do 14º dia de experimento, o que também ocorreu para a atividade da enzima GGT. O nível da albumina sérica permaneceu inalterado em todos os animais deste experimento, exceto

no animal que recebeu 5000 ppb de aflatoxina, que demonstrou queda acentuada após o 49º dia de experimento.

Os achados de necropsia incluem baixo escore corporal, fígado aumentado de volume, de coloração amarelo-clara e firme, ascite, edema de mesentério e da submucosa do abomaso, além de vesícula biliar distendida (Pierezan *et al.*, 2010; Pierezan *et al.*, 2012; Coppock *et al.*, 2018). Na histopatologia, são observados graus variáveis de proliferação do epitélio dos ductos biliares, fibrose, endoflebite obliterante (lesão veno-oclusiva) da veia centrolobular (veia hepática terminal), variação considerável no tamanho e forma dos hepatócitos e graus variáveis de esteatose hepatocelular (Pierezan *et al.*, 2010; Pierezan *et al.*, 2012).

3.12 Parâmetros para validação de métodos analíticos

Validar um método analítico engloba parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Essas ferramentas são avaliadas para confirmar ou excluir a adequabilidade do método desenvolvido (Giudice, 2016). No Brasil, há duas agências que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos baseados nesse tipo de calibração: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (RE nº 899, de 29/05/2003) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO (DOQ-CGCRE-008, de março/2003) (Valderrama; Braga; Poppi, *et al.*, 2009).

3.12.1 Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (Brasil, 2017).

3.12.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de um determinado intervalo de concentrações onde o método será aplicado (Valderrama;

Braga; Poppi, *et al.*, 2009). Para que essa forma de quantificação seja confiável, é de extrema importância que o método analítico utilizado apresente linearidade no intervalo determinado para cada método (Brito *et al.*, 2003).

Para isso, é necessário obter uma curva analítica usando diferentes concentrações de analito, sob a forma de padrões, de modo a determinar a linearidade, demonstrando a representação gráfica das respostas em função da concentração, gráfico de dispersão de resíduos, equação da reta de regressão de y em x , coeficientes de correlação e determinação e homocedasticidade dos dados. Para os testes estatísticos, deve-se utilizar um nível de significância de 5% (Brasil, 2017).

3.12.3 Precisão

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três maneiras mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (INMETRO, 2020). Segundo a Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, a precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula " $DPR=(DP/CMD) \times 100$ ", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

3.12.4 Limite de detecção

Limite de detecção (LD) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como, por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2020).

3.12.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais

estabelecidas. O limite de quantificação deve ser coerente com o limite de especificação da impureza (Brasil, 2017). O capítulo a seguir trata dos materiais e métodos desta pesquisa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas folhas das seguintes espécies de plantas nesta pesquisa:

- *Cestrum axillare* Vell. (anteriormente *C. laevigatum*);
- *Cestrum mariquitense* Kenth. (anteriormente *C. sendtnerianum* e *C. laevigatum* subsp. *flaviflora*).

Um exemplar de cada planta foi depositado no herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob os códigos BHCB 182694 (*C. axillare* - UFMG), BHCB 182693 (*C. mariquitense* - Esmeraldas) e BHCB 182698 (*C. mariquitense* - UFMG).

Uma amostra de cada uma destas espécies foi coletada, no volume mínimo de 100g, no período de julho/2018 até janeiro/2020. As amostras foram coletadas mensalmente, na primeira semana do mês. As coletas foram realizadas no município de Esmeraldas, comunidade Vinhático (19°55'58.9"S 44°19'53.5"W) e Belo Horizonte, dentro do campus da UFMG-Escola de Veterinária (19°52'11.8"S 43°58'18.7"W). As coletas foram em diferentes épocas do ano (primavera, outono, verão, inverno) e nas várias fases do desenvolvimento vegetal (floração, frutificação e somente a presença de folhas).

Em cada coleta foi anotado o estágio vegetativo das plantas. Os dados meteorológicos (pluviosidade) foram coletados no site do Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet). Após a coleta, as amostras foram secas em estufa a 50 °C, embaladas em sacos herméticos, identificadas e armazenadas em freezer a -20 °C.

4.2 Extração dos compostos presentes nas plantas (extração padrão)

As folhas foram secas em estufa a 50°C e em seguida submetidas ao processo de extração. A 100g da planta triturada, foram adicionados 1000 ml de acetona, e a mistura foi filtrada em seguida. O resíduo foi passado duas vezes em solução acetona/água 9:1 e seco em evaporador rotativo a 60°C. Hexano (100ml) foi adicionado para limpar a clorofila do extrato, e o extrato foi novamente seco em evaporador rotativo a 60°C.

Adicionou-se 100 ml de clorofórmio e 5,6g de cloreto de potássio, seguido por congelamento a -20°C por 48 horas. Descongelado, o extrato foi filtrado à vácuo e o precipitado acumulado no filtro, ressuspenso adicionando álcool a 85% e novamente filtrado à vácuo. Ao precipitado foi adicionado hexano, a solução foi novamente filtrada

e ao precipitado foi adicionado metanol. O restante do extrato foi colocado em Becker e congelado a -20°C . A solução com metanol foi injetada no HPLC (Cole *et al.* 1980).

4.3 Quantificação dos compostos presentes nas plantas

As amostras foram descongeladas, pesadas e submetidas ao processo de extração. A extração dos possíveis princípios tóxicos foi realizada segundo a metodologia proposta por Carlier *et al.* (2014). As amostras das plantas secas foram pesadas e 0,5g foram misturados com 10,0 ml de solução de acetonitrila e água deionizada (Ultra purificador de água Master System, Gehaka[®]) (50:50, v/v), em tubo de centrifugação de 15ml. A mistura foi colocada em banho sonicador por 30 minutos, e depois foi centrifugada por 10 minutos a 4.000 g (Centrífuga para tubos Basic Sislab[®]). O sobrenadante foi colocado em microtubos identificados e submetidos a identificação e quantificação utilizando sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos-HPLC-DAD (Shimadzu[®] DGU-20A 5).

A determinação por HPLC-DAD foi feita utilizando coluna Agilent ZORBAX SB-phenyl (4.6 mm×250 mm, 5 μm). A fase móvel foi em gradiente de acetonitrila e 0,01 mol/L de NaH_2PO_4 , pH 6,0, com fluxo de 0,2 ml/minuto. A detecção foi feita em 254 nm, associado a varredura entre 200 e 750 nm para confirmação da identidade dos picos. O espectro obtido, foi comparado ao espectro do padrão advindo do composto purificado (extrato padrão). O tempo de corrida cromatográfica foi de 35 minutos.

4.4 Coleta das amostras de fígado

A extração das amostras de fígado bovino foi realizada após a necropsia dos animais possivelmente intoxicados pelas espécies de *Cestrum* sp. A coleta foi realizada durante o procedimento de necropsia. Também foram adquiridos fragmentos de fígado bovino em estabelecimentos comerciais, para serem usadas como amostra branca. Os fragmentos do fígado foram armazenados em tubo Falcon 50ml e armazenados em freezer a -20°C .

Um fragmento de fígado caprino do experimento de Marinho (2017) que estava armazenado em condições ideais para a extração foi incluído nas amostras. O animal evoluiu para morte em 12 horas após a administração de 10g/kg PV da planta seca e triturada.

Outra amostra (bovino 1) foi coletada no município de Esmeraldas em janeiro de 2021 (coordenadas -19.933029,-44.331536), a propriedade tem histórico de intoxicações de bovinos por *Cestrum* sp. A planta é abundante em áreas de grotas e os animais tinham amplo acesso a esses locais. A idade do animal é de aproximadamente 24 meses, não gestante, foi encontrada já em decúbito externo, evoluindo para decúbito lateral e morte em 6 horas.

Em outra propriedade também no município de Esmeraldas (coordenadas 19°50'60.0"S 44°22'44.9"W), lote de 14 animais, bovinos machos e fêmeas de aproximadamente 3 anos. 12 destes animais tiveram sintomas clínicos compatíveis com a intoxicação pela ingestão de *Cestrum* sp. e cinco animais morreram. Destes, dois animais foram necropsiados (bovinos 2 e 3). Um animal evoluiu para morte em 8h após o início dos sinais clínicos. Os animais apresentaram prostração, diarreia com odor pútrido, inapetência e dorso arqueado. Dois animais apresentaram fezes com muco e estrias de sangue, além de odor pútrido. Um animal apresentou hematúria. Somente um animal do lote não apresentou nenhum sinal clínico.

Um animal (bovino 4) proveniente do município de Fortuna de Minas, Minas Gerais, foi necropsiado pelo setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG. A suspeita clínica principal foi intoxicação por plantas do gênero *Cestrum* sp.

O processamento das amostras hepáticas seguiu a metodologia proposta por Carlier *et al.* (2014). As amostras de fígado coletadas após a necropsia dos animais foram descongeladas e uma amostra de 5g foi usada para a extração. A amostra foi pesada em balança analítica e cortada em pequenos pedaços, colocada em um tubo tipo Falcon (50ml) juntamente com 15ml de solução metanol/acetonitrila (5/95). A solução foi agitada em vórtex por 1 minuto e posteriormente colocada em centrífuga para tubos Sislab/Basic[®] por 15 minutos a 5000g.

O sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo (15ml) e deixado em sistema de fluxo de ar contínuo por 72 horas para evaporar os solventes ainda presentes na amostra extraída. O sobrenadante foi colocado em microtubos identificados e submetidos a identificação e quantificação utilizando sistema de HPLC-DAD. Foram usadas as mesmas condições para a quantificação dos compostos.

4.5 Identificação dos compostos em fluido ruminal

Um animal (bovino 2) proveniente do município de Fortuna de Minas, Minas Gerais, foi necropsiado pelo setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG. A suspeita clínica principal foi intoxicação por plantas do gênero *Cestrum* sp. Foram coletadas amostras hepáticas, conservadas em formol à 10% para processamento histológico. Fluido ruminal em tubos Falcon (50ml), que em seguida foram congelados em freezer a -20°C até o processamento da amostra. O animal era mantido em pastagem, que estava seca devido à falta de chuvas na região. A necropsia havia hemorragia cardíaca e o fígado apresentou aspecto de noz moscada. Também foram visualizadas no conteúdo ruminal folhas semelhantes as folhas de *Cestrum* sp. A avaliação histopatológica revelou severa necrose hepática centrolobular.

Após descongeladas, extração dos compostos no fluido ruminal foi realizada seguindo a metodologia proposta por Carlier *et al.* (2014). Uma amostra de 5g foi usada para a extração. A amostra foi pesada em balança analítica, colocada em um tubo Falcon (50ml) juntamente com 15ml de solução metanol/acetonitrila (5/95). A solução foi agitada em vórtex por 1 minuto e posteriormente colocada em centrífuga para tubos Sislab/Basic[®] por 15 minutos a 5000g. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo falcon (15ml) e deixado em sistema de fluxo de ar contínuo por 72 horas para evaporar os solventes ainda presentes na amostra extraída.

O sobrenadante foi colocado em microtubos identificados e submetidos a identificação e quantificação utilizando sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos-HPLC-DAD (Shimadzu[®] DGU-20A 5), seguindo as mesmas condições para a quantificação dos compostos.

4.6 Validação da técnica analítica

4.6.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada comparando os cromatogramas oriundos da análise das amostras brancas com os cromatogramas oriundos da análise da solução padrão. Foi verificada a ocorrência dos compostos de interesse presentes na solução padrão em relação às amostras utilizadas no trabalho.

4.6.2 Linearidade

A linearidade foi realizada por meio da comparação da área dos picos cromatográficos com a concentração do extrato padrão. Para construção da curva analítica foram usadas as seguintes concentrações: 2, 1, 0,5, 0,33 e 0,25 mg/ml.

4.6.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi determinado utilizando uma relação sinal ruído 3/1. Para o limite de quantificação foi utilizado a relação sinal/ruído 10/1, em amostras replicadas.

4.7 Análise estatística

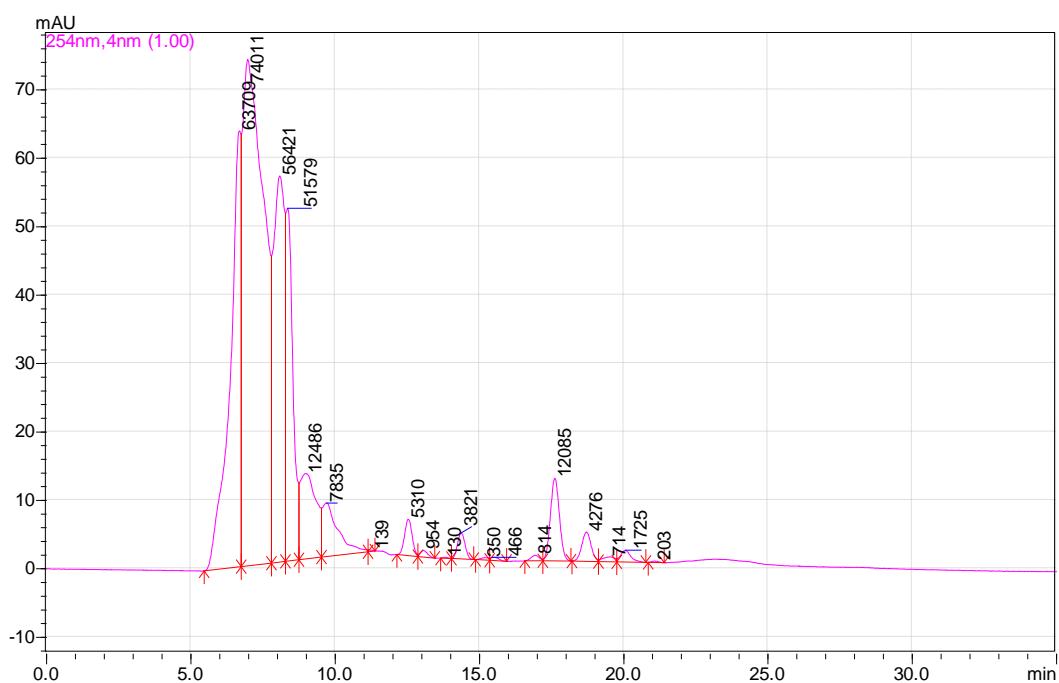
Como os dados obtidos não apresentavam homocedasticidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação de duas variáveis e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para a comparação de três ou mais variáveis. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

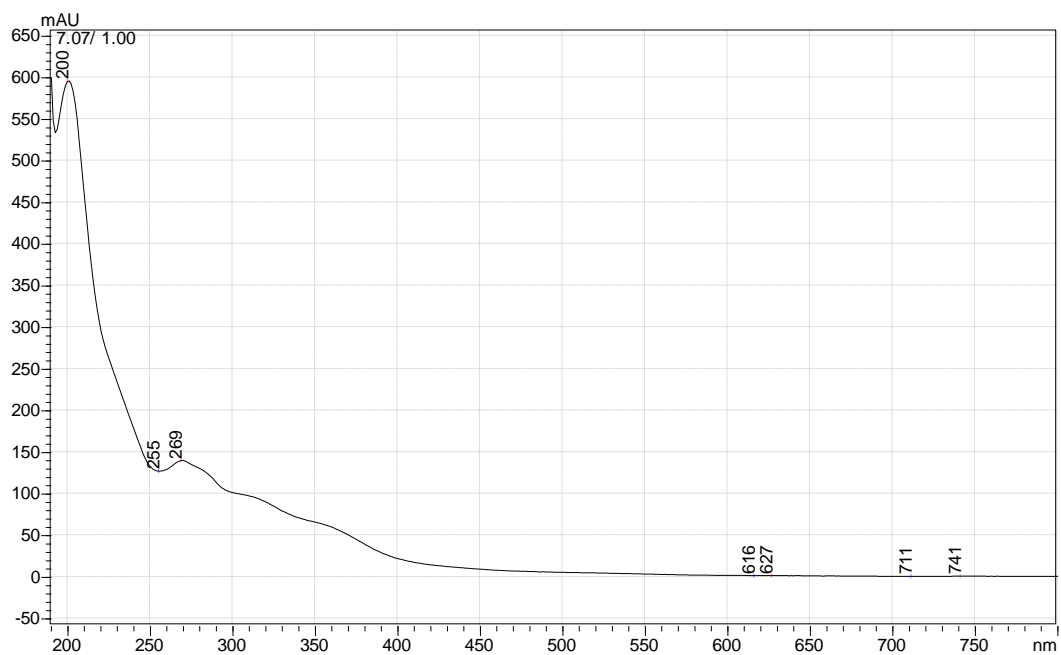
5.1 Identificação dos compostos presentes nas plantas

Foram identificados dois compostos principais no extrato padrão Composto 1 e Composto 2 (Fig. 7). O composto 1 teve tempo de retenção médio de 7,1 minutos, o que correspondeu a 43,9% do volume do extrato purificado (Fig. 8). Já o composto 2 teve tempo de retenção médio de 7,9 minutos, o que correspondeu a 36,54% do volume do extrato purificado (Fig. 6).

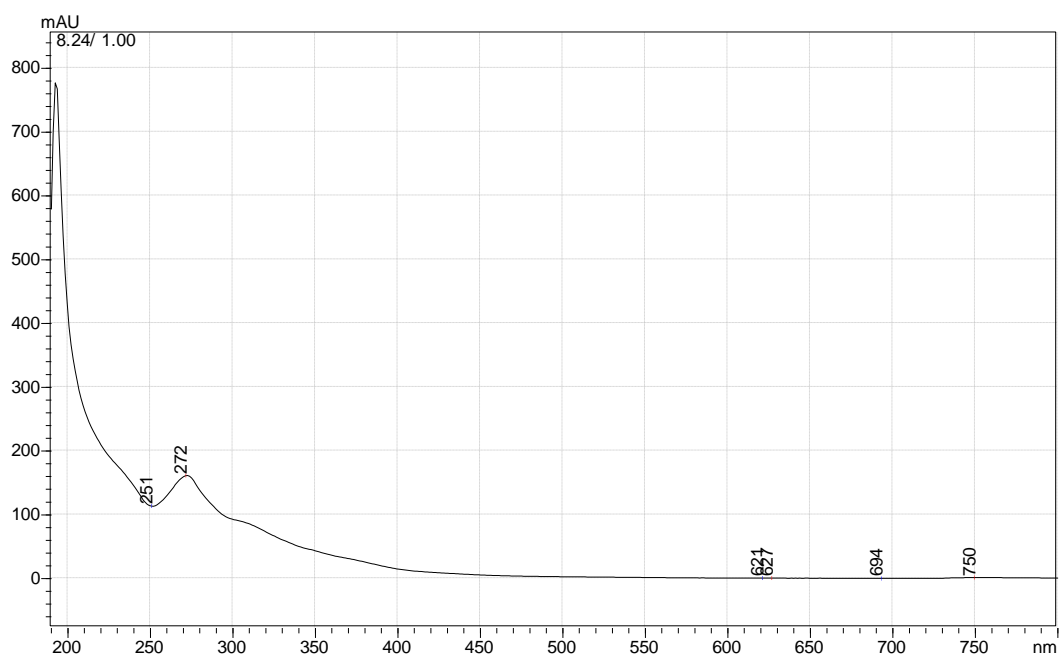
Figura 6: Cromatograma do extrato purificado.



Fonte: a autora.

Figura 7: Espectro UV do Composto 1.

Fonte: a autora.

Figura 8: Espectro UV do Composto 2.

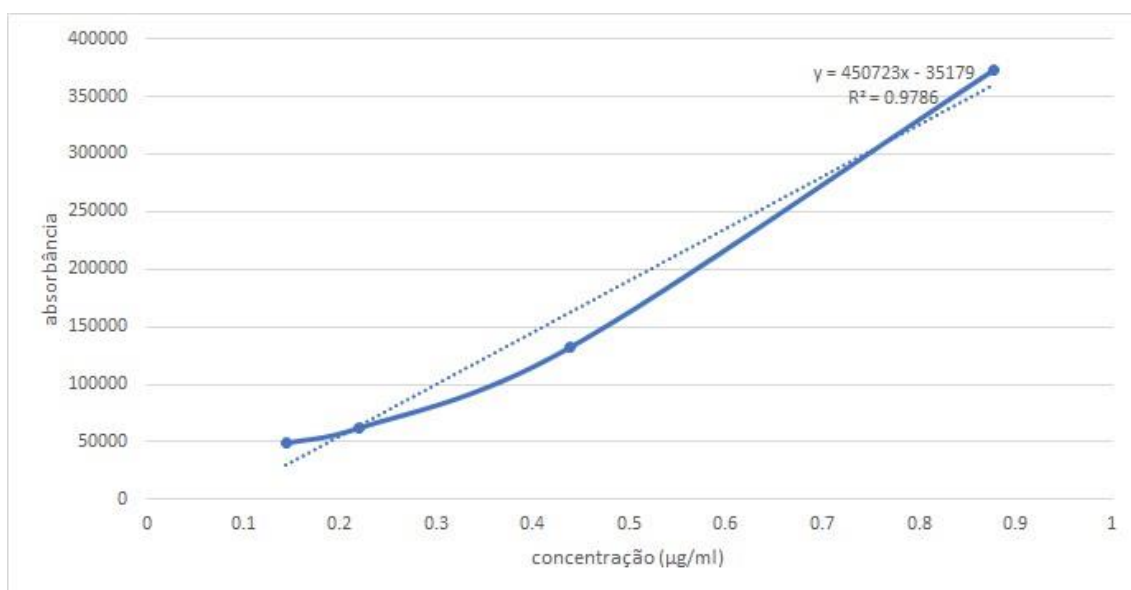
Fonte: a autora.

5.2 Validação da técnica analítica

5.2.1 Linearidade

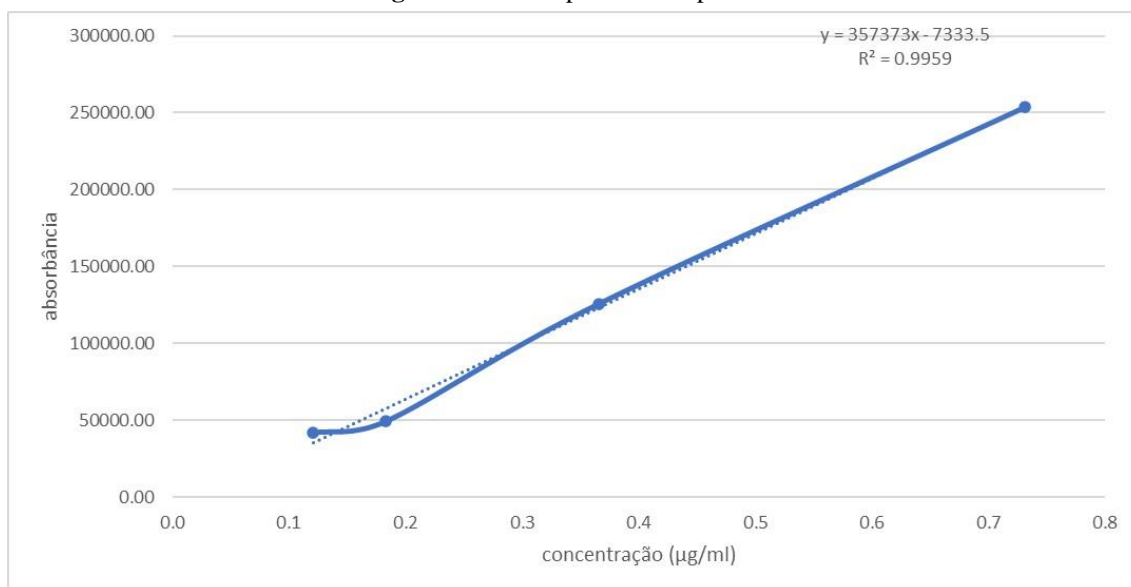
No extrato padrão foram encontrados os Compostos 1 e 2. O Composto 1 apresentou a curva padrão com linearidade ($R^2 = 0,9786$) nas concentrações de 0,14 $\mu\text{g/mL}$ a 0,88 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 9) e o Composto 2 apresentou curva padrão com linearidade ($R^2 = 0,9959$) nas concentrações de 0,12 $\mu\text{g/mL}$ a 0,73 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 10).

Figura 9: Curva padrão Composto 1.



Fonte: a autora.

Figura 10: Curva padrão Composto 2.



Fonte: a autora.

5.2.2 Limite de detecção e quantificação

O Composto 1 apresentou limite de detecção de 0,08 µg/mL e limite de quantificação de 0,12 µg/mL. Já o Composto 2 apresentou limite de detecção de 0,02 µg/mL e limite de quantificação de 0,10 µg/mL.

5.3 Quantificação dos compostos nas plantas

A quantificação dos Compostos 1 e 2 nas plantas coletadas no período de julho de 2018 a janeiro de 2020 foi comparada a pluviosidade no período e ao estágio vegetativo das plantas (frutos e flores, frutos e folhas). Os períodos que apresentaram diferença estatística estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2. Não foi observada relação entre a dosagem dos compostos nas amostras das plantas e a pluviosidade. Considere as Tabelas 1 e 2 a seguir.

Tabela 1: Média e desvio-padrão da quantificação do Composto 1 de acordo com a variação sazonal (mg/kg).

	ago/18	dez/18	mar/19	jul/19	ago/19
Média	226,0 ^a	675,0 ^b	783,5 ^b	833,0 ^b	295,7 ^a
Desvio Padrão	281,2	168,6	253,5	213,4	101,4
Pluviosidade (mm)	39,7	282,8	135,9	0	0,1

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

Fonte: a autora.

Tabela 2: Média e desvio-padrão da quantificação do Composto 2 de acordo com a variação sazonal (mg/kg).

	jul/18	ago/18	dez/18	fev/19	mar/19	ago/19	set/19
Média	557,5 ^a	590,5 ^a	1961,6 ^b	529,0 ^a	3166,8 ^b	581,4 ^a	427,8 ^a
Desvio Padrão	494,5	898,9	1123,4	477,0	1513,2	274,7	236,3
Pluviosidade (mm)	3,1	39,7	282,8	223	135,9	0,1	21,1

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

Fonte: a autora.

O Composto 1 apresentou diferença estatística significativa ($p = 0,0212$) quando comparada a variação geográfica, plantas coletadas na UFMG e plantas coletadas no

município de Esmeraldas, conforme apresentado na Tabela 3. Já o Composto 2, não apresentou diferença significativa ($p=0,1007$).

Tabela 3: Média e desvio padrão da quantificação do Composto 1, comparando a variação geográfica (mg/kg).

	UFMG	Esmeraldas
Média	499,6729846 ^a	610,2037749 ^b
Desvio Padrão	328,0108473	328,4169476

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$, teste de Mann-Whitney).

Fonte: a autora.

Comparando as espécies *C. mariquitense* e *C. axillare*, houve diferença estatística significativa somente na quantificação do Composto 2 ($p=0,0024$), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Média e desvio padrão da quantificação do Composto 2, quando comparadas as espécies de *Cestrum* (mg/kg).

	<i>C. axillare</i>	<i>C. mariquitense</i>
Média	1401,5 ^a	833,5 ^b
Desvio Padrão	1155,6	663,7

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$, teste de Mann-Whitney).

Fonte: a autora.

O estágio vegetativo das plantas, considerando frutos, flores e frutos e somente folhas não interferiu na dosagem dos compostos. Considerando a média das dosagens em cada estágio vegetativo, não houve diferença estatística significante ($p=0,7353$).

5.4 Amostras de fígado

Na amostra do experimento de Marinho (2017), foi encontrada a presença do Composto 2 (Fig. 12). O Composto 2 também foi encontrado na amostra do bovino 1 (Fig. 13) e na amostra do bovino 4 (Fortuna de Minas-MG). O lote de 14 animais que apresentaram sintomas clínicos compatíveis com a intoxicação por *Cestrum* sp. não foram detectadas a presença dos Compostos 1 e 2 (Fig. 14) e também não foram encontradas lesões patológicas compatíveis com a intoxicação. Dessa forma, pode-se descartar a

suspeita clínica de intoxicação por plantas do gênero *Cestrum* nesses animais. Os resultados de forma comparada estão demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1: Resultados de forma comparada para os animais testados.

Animal	Sinais clínicos	Histopatologia	Composto	Fígado	Fluido ruminal
Caprino	Presentes	Necrose hep. centrolobular	2	D	NR
Bovino 1	Presentes	Não realizada	2	D	NR
Bovinos 2 e 3	Presentes	Sem alterações	ND	ND	NR
Bovino 4	Presentes	Necrose hep. centrolobular	2	D	D

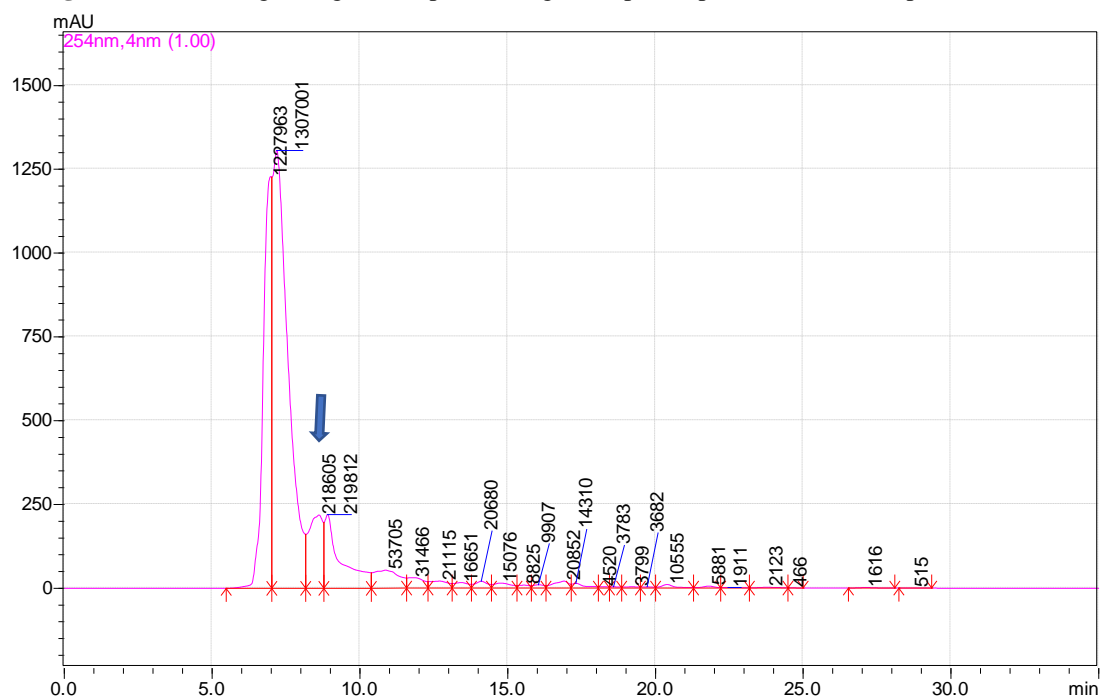
Fonte: a autora.

D: detectado

ND: não detectado.

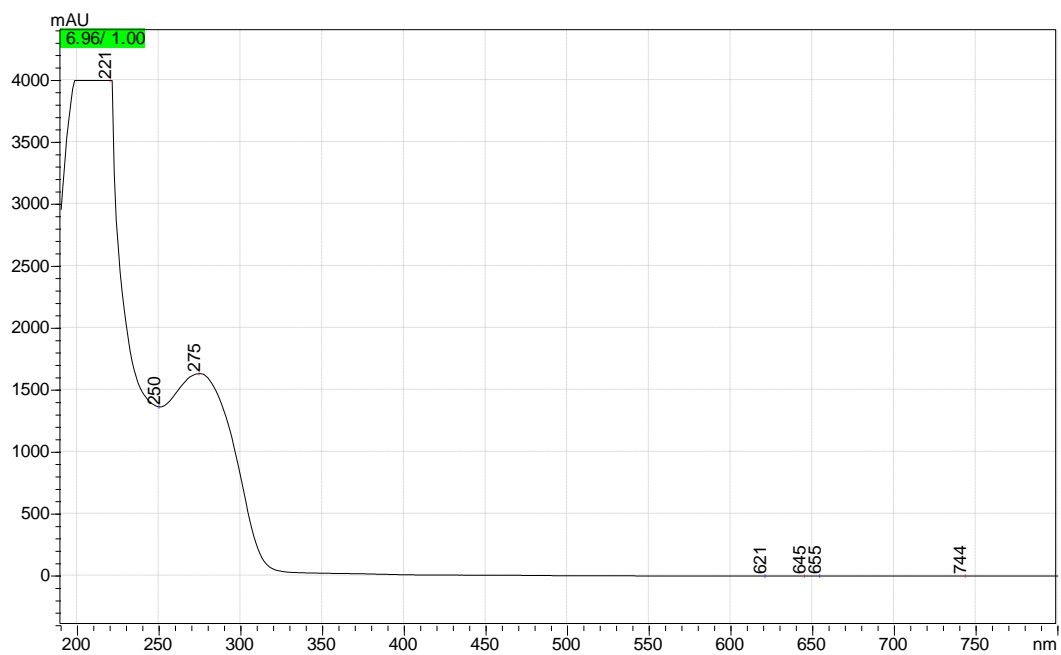
NR: não realizado.

Figura 11: Cromatograma gerado a partir de fígado caprino apresentando o Composto 2 (seta).



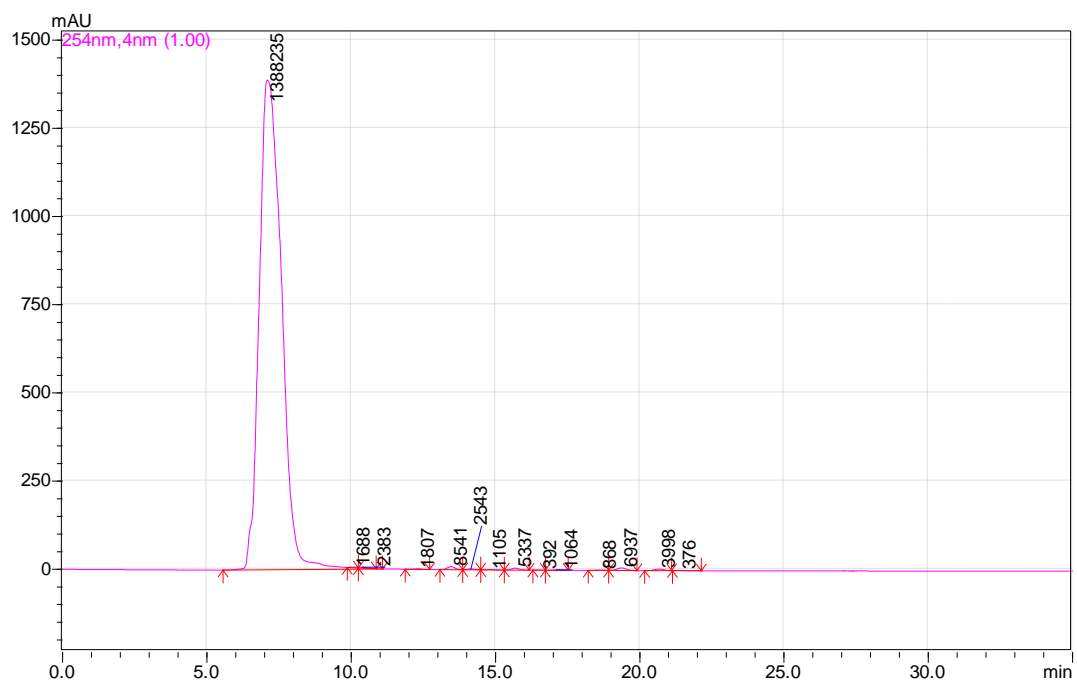
Fonte: a autora.

Figura 12: Espectro UV do Composto 2 em fígado caprino.



Fonte: a autora.

Figura 13: Cromatograma gerado a partir de fígado bovino (amostra branca), não foram encontrados picos compatíveis com os Compostos 1 e 2.

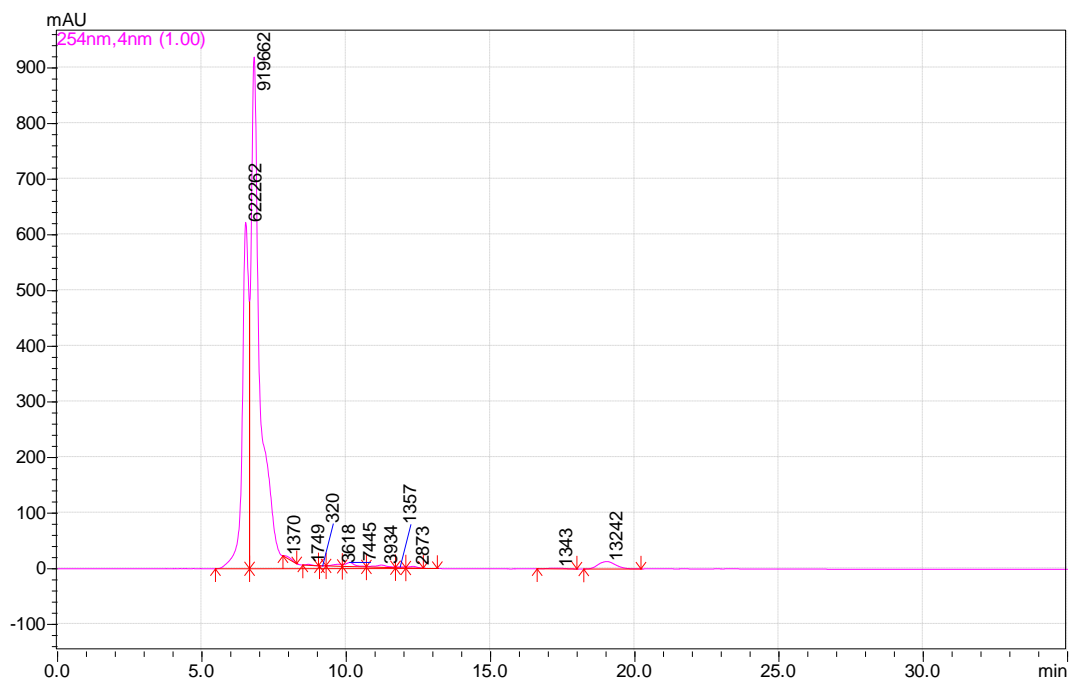


Fonte: a autora.

5.5 Identificação dos compostos em fluido ruminal

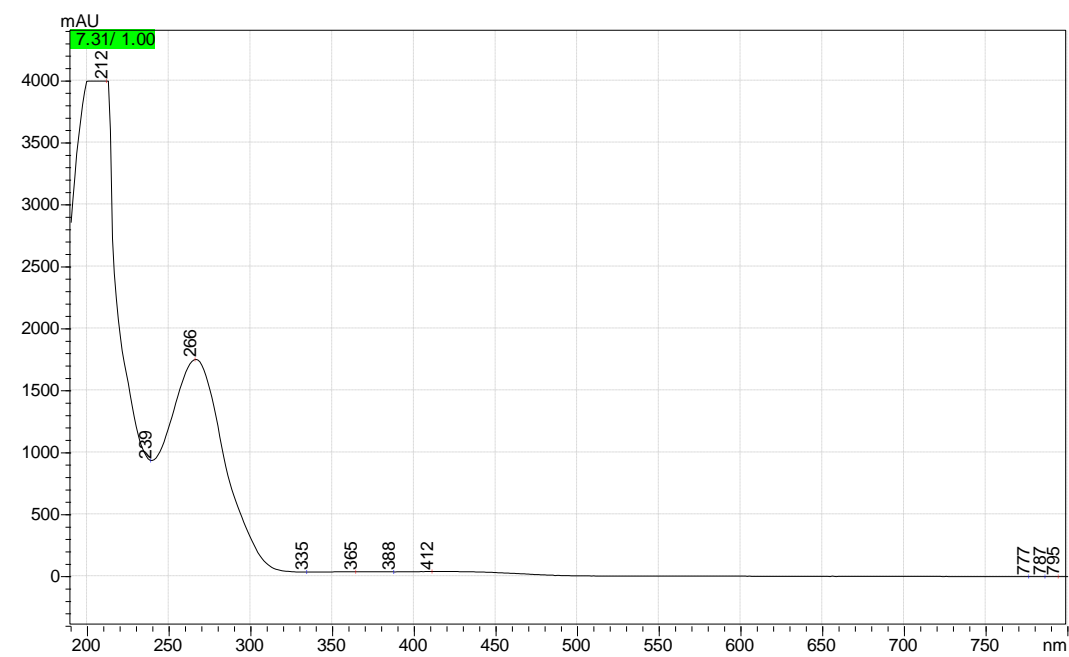
Na análise do fluido ruminal, foi detectado o Composto 2 (Fig. 13), cuja identidade foi confirmado pelo espectro UV (Fig. 14).

Figura 14: Cromatograma indicando a presença do Composto 2 em fluido ruminal bovino.



Fonte: a autora.

Figura 15: Espectro UV confirmando a identidade do Composto 2 em fluido ruminal bovino.



Fonte: a autora.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram identificados dois compostos principais no extrato padrão que foram denominados os Compostos 1 e 2. Na avaliação cromatográfica, o Composto 1 teve tempo de retenção médio de 7,1 minutos, o que correspondeu a 43,9% do volume do extrato purificado. Já o Composto 2 teve tempo de retenção médio de 7,9 minutos, o que correspondeu a 36,54% do volume do extrato purificado. O limite de detecção para o composto 1 foi de 0,08 µg/mL, enquanto para o composto 2 foi de 0,02 µg/mL, o que demonstra a eficácia da técnica cromatográfica utilizada. Carlier *et al.* (2014), encontrou limite de detecção de 0,17 µg/mL para o atractilosídeo e de 0,15 µg/mL para o carboxiatractilosídeo, tendo como matriz sangue humano de um caso de intoxicação por *A. gummifera*.

O princípio tóxico das espécies *C. axillare* e *C. mariquitense* ainda não foi elucidado. Segundo Tokarnia *et al.* (2012), o princípio tóxico do *C. axillare* (*C. laevigatum*) são saponinas denominadas gitogenina e digitogenina. Santos *et al.* 2008, ressalta que o princípio ativo de *C. axillare* é desconhecido. No entanto, Marinho (2017), forneceu o extrato purificado de saponinas a caprinos saudáveis e os animais não apresentaram sintomatologia clínica da intoxicação e não tiveram alterações laboratoriais compatíveis. A presença das saponinas no extrato foi confirmada por cromatografia líquida associada a espectrometria massas (LC-MS/MS). Neste mesmo estudo, também foram administradas folhas de *C. axillare* a um animal que morreu 12 horas após a administração das folhas na dose de 10 g/kg PV. Outro animal do estudo que recebeu a dose de 5 g/kg PV não apresentou sintomatologia clínica da intoxicação, mas teve aumento na atividade da enzima AST e necrose hepática centrolobular.

Van der Lugt *et al.* (1991 e 1992) induziram experimentalmente a intoxicação por *C. axillare* em bovinos e ovinos usando a dose de 10g/kg PV. Os animais morreram no mesmo dia da administração da planta, apresentando dor abdominal, atonia ruminal, taquicardia, taquipneia, perda do apetite, salivação, decúbito lateral e morte. Neste mesmo estudo, quando utilizada a dose de 5g/kg PV, o ovino e o bovino não apresentaram alterações clínicas da intoxicação e foram eutanasiados após 32 dias (bovino) e 48 dias (ovino). Na análise histopatológica do ovino, foram vistas somente dilatação dos sinusoides nas áreas centrolobulares e infiltração de linfócitos na tríade portal. O bovino que recebeu essa dose apresentou necrose hepática centrolobular. Dobereiner *et al.* (1969)

estabeleceram que a dose letal mínima para bovinos era de 10,5 g/kg PV, enquanto a quantidade máxima que não causou sinais clínicos foi de 24,4 g/kg PV. Já em bubalinos a dose letal foi de 40 g/kg PV da planta fresca (Barbosa *et al.* 2010).

A identidade química dos dois compostos encontrados em ambas as espécies de *Cestrum* neste estudo ainda não foi elucidada. Por terem sido isoladas conjuntamente no mesmo extrato e apresentam perfil UV bastante parecido, é provável apresentarem grande semelhança na estrutura química, talvez sejam isômeros. As plantas do gênero *Atractylis* sp., *C. parqui* e *Xantium* spp. apresentam como princípio tóxico um glicosídeo chamado carboxiatractilosídeo (Cole *et al.* 1980; Carlier *et al.* 2014). Os sinais clínicos observados na intoxicação por plantas que possuem esse composto são semelhantes a intoxicação por plantas do gênero *Cestrum*, como apatia, anorexia, parada dos movimentos ruminais, dores abdominais, tenesmo retal com discreto prolapso de reto, sudorese, desidratação progressiva com retração dos globos oculares e sinais nervosos caracterizados por incoordenação motora, tremores musculares generalizados e agressividade. O carboxiatractilosídeo age principalmente em células ricas em mitocôndrias (hepatócitos e células dos túbulos renais), inibindo a fosforilação oxidativa e consequentemente o aporte de energia para as células. A intoxicação é aguda e pode levar a morte em poucas horas (Cole *et al.*, 1989; Driemeier *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2008). Assim, é provável que pelo menos uma destas substâncias apresente estrutura química parecida ao carboxiatractilosídeo.

Em relação a quantificação dos compostos presentes nas plantas coletadas no período de julho de 2018 a janeiro de 2020, foram avaliadas a influência sazonal, da pluviosidade no período e o estágio vegetativo das plantas (frutos e flores, frutos e folhas). Comparando a dosagem dos compostos com a variação sazonal, o composto 1, teve maiores dosagens nos meses de dez/18, mar/19, jul/19, enquanto o composto 2 apresentou maiores concentrações nos meses de dez/18 e mar/19. A dosagem dos compostos 1 e 2 não teve relação direta com a pluviosidade, sendo assim em épocas de seca extrema ou no período chuvoso a produção dos compostos pelas plantas não foi distinta.

As plantas do município de Esmeraldas, tiveram maior concentração do composto 1. O que pode ter influência do tipo solo e localização das plantas. As plantas estudadas ficavam dentro de grotas ou brejos com muita sombra, bem próximo à uma represa de água. Quando comparada as espécies, *C. mariquitense* apresentou maiores concentrações do composto 2. No entanto, esta variação também pode ser atribuída a localização, pois as plantas coletadas no município de Esmeraldas eram todas da espécie *C. mariquitense*

e somente uma planta coletada em Belo Horizonte pertence a essa espécie. Esse exemplar de *C. mariquitense* localizado na UFMG, está em uma área de bastante sombra e muita matéria orgânica. O estágio vegetativo não interferiu na concentração dos dois compostos.

Como os sinais clínicos da intoxicação por *Cestrum* se assemelham aos que ocorrem com várias outras plantas e micotoxinas, deve ser feito o diagnóstico diferencial, podemos citar as plantas do gênero *Xanthium* sp., *Atractylis* sp., *Senecio* sp., *Crotalaria* sp., aflatoxinas e larvas do inseto *Perreya flavipes* (Dutra *et al.*, 1997; Driemeier *et al.* 1999; Lucena *et al.*, 2010; Pierezan *et al.*, 2010; Tokarnia *et al.* 2012). Os dados epidemiológicos são de suma importância no auxílio ao diagnóstico, como a presença da planta nas pastagens dos animais, sinais que as plantas tóxicas estão sendo consumidas pelos animais, curso clínico da intoxicação, animais vindos de outras propriedades em que a planta não ocorria, fase do estágio vegetativo da planta e acesso dos animais ao alimento (escassez de alimentos leva os animais a procurarem outras fontes de alimento). Nas intoxicações por *Xanthium* sp. e *Atractylis* sp., o diagnóstico pode ser confirmado por meio da determinação do carboxiatractilosídeo (Botha *et al.*, 2014).

A última etapa do presente estudo visou determinar a presença dos compostos isolados das folhas de *C. axillare* e *C. mariquitense* em amostras de fígado e fluido ruminal de animais intoxicados, visando o desenvolvimento de metodologia analítica para futura utilização na rotina diagnóstica. Assim, a técnica para determinação dos dois compostos foi adaptada para amostras de fluido ruminal e fígado. Inicialmente, foram utilizadas amostras brancas (de animais sem exposição às plantas pesquisadas), analisadas com e sem adição dos compostos 1 e 2 para confirmar a eficiência do processo de extração e a ausência de interferência da matriz na identificação do composto. A confirmação da eficácia da metodologia foi obtida com amostras de um caprino experimentalmente intoxicado e de casos espontâneos em bovinos. Nas amostras de fígado e fluido ruminal, foi possível identificar a presença do composto 2, cuja similaridade química foi confirmada pelo espectro UV. Ainda, não foi encontrado nenhum dos dois compostos nas amostras dos outros casos de mortes de bovinos que não apresentavam lesões patológicas compatíveis com esta intoxicação. Assim, o composto 2 se mostrou um bom marcador para diagnóstico da intoxicação de ruminantes pelas plantas do gênero *Cestrum*.

Vários autores encontraram necrose hepática centrolubular em estudos com animais naturalmente intoxicados com plantas do gênero *Cestrum* e em ensaios

experimentais (Dobereiner *et al.*, 1969; Afonso; Santos, 1995; Tokarnia *et al.*, 2002; Coutinho *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2010; Tokarnia *et al.*, 2012). Os sinais clínicos e as lesões patológicas são similares aos observados nas intoxicações por plantas que contêm carboxiatractilosídeo (Santos *et al.*, 2008; Carlier *et al.*, 2014; Alberti *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2020). Assim, apesar de ainda não termos a confirmação da identidade química do composto 2, devido à similaridade dos achados macroscópicos e histopatológicos da intoxicação, podemos propor que se tratar do carboxiatractilosídeo ou de alguma de suas variantes.

Carlier *et al.* (2014), validou um método de quantificação e identificação do atractilosídeo e do carboxiatractilosídeo em amostras de sangue e urina de humanos após um caso de intoxicação não fatal por *A. gummifera*. Em uma intoxicação por *X. strumarium* em bovinos, foi detectada a presença de carboxiatractilosídeo no fígado na concentração de 66ng/g, sendo que o limite de detecção encontrado foi de 20ng/kg. O mesmo trabalho também pesquisou a presença do carboxiatractilosídeo em amostras de rim, com concentração de aproximadamente 0,8ng/g (Botha *et al.* 2014). Witte *et al.* (1990) estudou 70 bezerros naturalmente intoxicados por *X. strumarium*, seis animais vieram a óbito e dois foram necropsiados. As concentrações de carboxiatractilosídeo foram: no conteúdo ruminal de 100-200ppm, na urina de 0,1 a 0,05ppm e na planta de 0,1ppm. A detecção do composto foi realizada por cromatografia de camada delgada e confirmada por espectrometria de massas. Botha *et al.* (2014), encontrou carboxiatractilosídeo no conteúdo ruminal de um bovino naturalmente intoxicado por *X. strumarium* na concentração de 2,5 mg/kg.

7 CONCLUSÕES

Foram identificados dois compostos principais nos extratos das folhas de *C. axillare* e *C. mariquitense*. As concentrações destes dois compostos apresentaram variação sazonal, mas não foram afetadas pela pluviosidade. Quando comparada as espécies, *C. mariquitense* teve maior dosagem do Composto 2. A técnica para determinação dos dois compostos foi adaptada para amostras de fluido ruminal e fígado. O Composto 2 foi encontrado nas amostras de fígado e fluido ruminal de animais intoxicados por *Cestrum*, demonstrando ser este composto um bom marcador para diagnóstico da intoxicação.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, E.; SANTOS, H.L. Intoxicação experimental por *coeranea* Mart. Ex. Sendt. (Solanaceae) em bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.30, p.875-883, 1995.
- ALBERTI, T.S.; ZAMBONI, R.; SCHEID, H.V. *et al.* Intoxicação espontânea por brotos de *Xanthium* spp. em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 48, Sup.1, art. 507, 2020.
- ALVARES, A.A.A. 2006. Influência da adição de extrato de *Yucca schidigera* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de cães adultos consumindo duas raças comerciais. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR. 47p.
- BARBOSA, A.A.; SANTOS, E.; KLAUS, R. *et al.* Intoxicação natural por *Xanthium cavanillesii* em bovinos na região sul do estado do Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.48, Sup.1, art.565, 2020.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; PINHEIRO, C.; LOPES, C.T.A. *et al.* Intoxicação por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) em bubalinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, p.1049-1052, 2010.
- BARROS, G.C.; DOBEREINER, J. Experimentos com *Cestrum laevigatum* Schlecht. Em animais de laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.3, p.307-311, 1968.
- BASILE, J.R.; DINIZ, J.M.F.; OKANO, W. *et al.* Intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no sul do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p. 63-68, 2005.
- BOGHOSSIAN, M.R.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F. *et al.* Aspectos clínicos-patológicos da intoxicação experimental pelas sementes de *Crotalaria mucronata* (Fabaceae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.4, p.149-156, 2007.
- BOTHA, C.J.; LESSING, D.; ROSEMANN, M. *et al.* Analytical confirmation of *Xanthium strumarium* poisoning in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.26, p.640-645, 2014.
- Brasil, 2017. ANVISA. Resolução RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Disponível em https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/d01-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412
- Brasil, 2020. Orientação sobre a validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008). INMETRO, revisão 09, JUN 2020. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios
- BRITO, M.F.; FRANÇA, T.N.; OLIVEIRA, L.I.; RAMOS, A.S. Intoxicação espontânea por *Cestrum laevigatum* em um caprino no Rio de Janeiro-Relato de Caso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.21, n.1, p.55-57, 2010.

BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v.13, p.129-148, 2003.

CALMES, M.; CRESPIAN, F.; MAILLARD, C. *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of atractiloside and carboxyatractyloside from *Atractylis gummifera* L. *Journal of Chromatography*, v.163, p.119-122, 1994.

CANHAM, P.A.S.; WARREN, F.L. The saponins: part I. The isolation of gitogenin and digitogenin from *Cestrum laevigatum*. *Journal the South African Chemical Institute*, v.3, n.1, p.9-12, 1950.

CARLIER, J.; ROMEUF, L.; GUITTON, J. *et al.* A validated method for quantifying atractyloside and carboxyatractyloside in blood by HPLC-HRMS/MS, a non-fatal case of intoxication with *Atractylis gummifera* L. *Journal of Analytical Toxicology*, v.38, n.9, p.619-627, 2014.

CHEEKE, P.R. Biological effects of feed and forage saponins. In: WALLER, G.R.; YAMASAKI, K. (Ed.). *Saponins Used in Food and Agriculture*. Plenum Press, New York, 1996. p.377-385.

COELHO, P. O. Microbiota fúngica e aflatoxinas em alimentos destinados a cabras: aflatoxina M1 no leite produzido em diferentes condições climáticas. 2010. 107f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS).

COLE, R.J.; CUTLER, H.G.; STUART, B.P. Carboxyatractyloside. In: CHEEKE, P.R. (Ed.). *Toxicants of Plant Origin, Vol. II, Glycosides*. CRC Press. Boca Raton, 1989. p.253-263.

COLE, R.J.; STUART, B.P.; LANDSEN, J.A.; COX, R.H. Isolation and redefinition of the toxic agent from cocklebur (*Xanthium strumarium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.28, n.6, p.1330-1332, 1980.

COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; PILATI, C. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, n.1, p.31-38, 2000.

COPPOCK, R. W.; CHRISTIAN, R. G.; JACOBSEN, B. J. Aflatoxins. In: GUPTA, R.C. (Ed.). *Veterinary Toxicology, Basic and Clinical Principles*, 3rd ed. Academic Press, Cambridge (MA), 2018. p.983-994.

CÓRDOBA, J.M.D.; MÍNGUEZ, B.M.D. Hepatic encephalopathy. *Seminars in liver disease*, v.28, n.1, p.70-80, 2008.

COUTINHO, L.T.; COSTA, N.A.; MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B. *et al.* Intoxicação natural de bovinos leiteiros por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) no agreste de Pernambuco – Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v.4, n.3, p.352-359, 2013.

CUARTAS, Y.B.; CASTANO E.R. Descripción botánica y fitoquímica del jazmín de noche (*Cestrum nocturnum* L.). *Boletín Científico Centro de Museos*, v.12, n.1, p.17-23, 2008.

- DAL POZZO, M. Impacto da aflatoxina B1, montmorilonita e β -glucana na fermentação ruminal *in vitro*. 2015. 55f. Tese (Doutorado em Produção Animal). Universidade Federal de Santa Maria.
- DAMIANI, D.; LAUDANNA, N.; BARRIL, C. *et al.* Encefalopatias: etiologia, fisiologia e manuseio clínico de algumas das principais formas de apresentação da doença. *Rev Bras Clin Med.*, v.11, n.1, p.67-74, 2013.
- DANIELE, C.; DAHAMA, S.; FIRUZI, O. *et al.* *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, n.97, p.175-181, 2005.
- DOMINGUES, J.M. Fermentação em estado sólido de *Aspergillus parasiticus*, produção de aflatoxinas e sua pesquisa em alimentos consumidos regularmente no Brasil. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná.
- DRIEMEIER, D.; IRIGOYEN, L.F.; LORETTI, A.P. *et al.* Intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.19, n.1, p.12-18, 1999.
- DUTRA, F.; RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C. *et al.* Poisoning of cattle and sheep in Uruguay by sawfly (*Perreya flavipes*) larvae. *Veterinary and Human Toxicology*, v.39, n.5, p. 281-286, 1997.
- GADELHA, I.C.N.; CÂMARA, A.C.L.; PACÍFICO DA SILVA, I. *et al.* Toxic effects of the pericarp of the *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong fruit on chicks. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v.13, p.135-140, 2015.
- GARRETT, W.N.; HEITMAN, H.; BOOTH, A.N. Aflatoxin toxicity in beef cattle. *Experimental Biology and Medicine*, v.127, n.1, p.188-190, 1968.
- GIUDICE, G.H. Parâmetros de uma validação analítica: uma revisão bibliográfica. *Acta de Ciências e Saúde*, n.5, v.1, p.130-134, 2016.
- HENNEMANN, C.R.A.; CUNHA, C.M.S.; LOPES, S.T.A. *et al.* Avaliação da função renal através da densidade urinária e dosagem sérica de ureia e creatinina na aflatoxicose experimental em cães. *Ciência Rural*, v.26, n.1, p.97-102, 1996.
- HONORIO JUNIOR, J.E.R.; SOARES, P.M.; MELO, C.L. *et al.* Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, n.3, p.453-458, 2010.
- KARAN, F.C.; SCHILD, A.L.; MELLO, J.R.B. Intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no Rio Grande do Sul: condições ambientais favoráveis e medidas de controle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.7, p.603-609, 2011.
- KRABBE, A.A. Aspectos epidemiológicos e clinicopatológicos da seneciose crônica em bovinos na mesorregião sudoeste Rio-grandense. 2014. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pampa.

LACERDA, M.; WILSON, T.M.; ARGENTA, V. *et al.* *Crotalaria spectabilis* poisoning in horses fed contaminating oats. *Toxicon*, v.197, p.6-11, 2021.

LORETTI, A.P.; BEZERRA, P.S.; ILHA, M.R.S. *et al.* Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteracea) em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.19, n.2, p.71-78, 1999.

LUCENA, R.B.; RISSI, D.R.; MAIA, L.A. *et al.* Intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos em ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.5, p.447-452, 2010.

LYNCH, G.P. Mycotoxins in feedstuffs and their effect on dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.55, n.9, p.1243-1255, 1972.

MARINHO, J.B.R. Identificação dos princípios tóxicos de *Cestrum axillare* (*Cestrum laevigatum*). 2017. 42f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

MARINHO, J.B.R.; CARVALHO, A.U.; PIEREZAN, F. *et al.* Comparação os efeitos das folhas de *Cestrum axillare* Vell. com saponinas isoladas em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.38, n.5, p. 852-861, 2018.

MARQUES, D.M. Intoxicação experimental por *Cestrum laevigatum* em bubalinos (*Bubalus bubalis*). 2010. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.

MARTIN, T. *Partial characterization of the toxic effects of Xanthium strumarium* in the bovine species. 1983. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade do Estado do Oklahoma.

McLENNAN, M; KELLY, W.R. *Cestrum parqui* (Green cestrum) poisoning in cattle. *Australian Veterinary Journal*, v.61, n.9, p.289-291, 1984.

PANZIERA, W.; GONÇALVES, M.A.; OLIVEIRA, L.G.S. *et al.* Intoxicação por *Senecio brasiliensis* em bezerros: padrão e evolução de lesões hepáticas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.37, n.1, p.8-16, 2017.

PEBAY-PEYROULA, E.; DAHOUT-GONZALEZ, C.; KAHN, R. *et al.* Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier complex with carboxyatractyloside. *Nature*, v.426, p.39-44, 2003.

PEDROSO, P.M.O.; PESCADOR, C.A.; OLIVEIRA, E.C.; SONNE, L. Intoxicações naturais por plantas em ruminantes diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de 1996-2005. *Acta Scientiae Veterinarie*, v.35, p.213-218, 2007.

PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n.6, p.752-758, 2013.

PIEREZAN, F.; OLIVEIRA-FILHO, J.C.; CARMO, P.M. *et al.* Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.7, p.607-618, 2012.

- PIEREZAN, F.; OLIVEIRA-FILHO, J.C.; CARMO, P.M. *et al.* Surto de aflatoxicose em bezerros no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.5, p.418-422, 2010.
- QUEIROZ, G.R.; RIBEIRO, R.C.L.; FLAIBAN, K.K.M.C. *et al.* Intoxicação espontânea por *Crotalaria incana* em bovinos no norte do estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, v.34, n.2, p.823-832, 2013.
- ROSSANIGO, C.E.; FRIGERIO, K. Intoxication of goats with *Cestrum parqui*. 7^o *International Conference on Goats*, France, 15-21 May, 2000.
- SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V.D.; BARROS, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.1, p.1-14, 2008.
- SILVA, S.N.; CARVALHO, A.M.V.; SANTOS, F.A.R. *Cestrum* L. (*Solanaceae*) da mata higrófila do Estado da Bahia, Brasil. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, v.25, n.1, p.157-166, 2003.
- TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J. *Plantas Tóxicas do Brasil*. 2^a Ed. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 2012. 566p.
- TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Poisonous plants affecting livestock in Brasil. *Toxicon*, v.40, p.1635-1660, 2002.
- TURGUT, M.; ALHAN, C.C.; GURGOZE, M. *et al.* Carboxyatractiloside poisoning in humans. *Annals of Tropical Paediatrics*, v.25, p.125-134, 2005.
- VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Química Nova*, v.32, n.5, p.1278-1287, 2009.
- VAN DER LUGT, J.J.; NEL, P.W.; KITCHING, J.P. Experimentally-induced *Cestrum laevigatum* (Schlecht) poisoning in sheep. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.59, p.135-144, 1992.
- VAN DER LUGT, J.J.; NEL, P.W.; KITCHING, J.P. The pathology of *Cestrum laevigatum* (Schlecht) poisoning in cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.58, p.211-221, 1991.
- WITTE, S.T.; OSWEILER, G.D.; STAHR, H.M. *et al.* Cocklebur toxicosis in cattle associated with the consumption of mature *Xanthium strumarium*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.2, n.4, p.263-267, 1990.
- WOUTERS, A.T.B.; BOABAID, F.M.; WATANABE, T.T.N. *et al.* Intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos no Sudoeste do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n.1, p.47-51, 2013.
- XUE, L.M.; ZHANG, Q.Y.; HAN, P. *et al.* Hepatotoxic constituents and toxicological mechanism of *Xanthium strumarium* L. fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, v.152, n.2, p. 272-282, 2014.