

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

**FOTOSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA EM**  
**BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) EM PASTAGENS DE**  
***Brachiaria decumbens* NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

**Cairo Henrique Sousa de Oliveira**

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária da UFMG**  
**2011**

Cairo Henrique Sousa de Oliveira

**FOTOSSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) EM  
PASTAGENS DE *Brachiaria decumbens* NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.  
Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite.

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2011

O48m Oliveira, Cairo Henrique Sousa de, 1987 -  
Fotossensibilização hepátogena em búfalos (*Bubalus bubalis*) em pastagens de *Brachiaria decumbens* no Estado de Minas Gerais / Cairo Henrique Sousa de Oliveira. – 2011.  
44 p. : il.

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

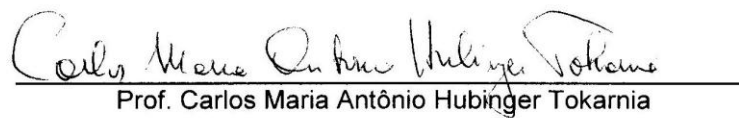
1. Búfalo – Doenças – Teses. 2. *Brachiaria decumbens* – Teses. 3. Plantas tóxicas – Teses. 4. Fígado – Doenças – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.293 089

Dissertação defendida e aprovada em 01 de fevereiro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
Prof. Rômulo Cerqueira Leite  
Orientador

  
Prof. José Diomendes Barbosa Neto

  
Prof. Carlos Maria Antônio Hubinger Tokarnia

  
Prof.ª Marília Martins Melo

Educação, apoio moral e financeiro, incentivo, momentos de diversão, de disciplina também, realização de sonhos e admiração não me faltaram graças a minha família.  
Para aqueles que não falharam, meus pais Neusa Maria Sousa de Oliveira e Ironi Rodrigues de Oliveira.

Pense grande, sonhe alto, mas caminhe sempre, sem parar, a passos curtos.

“— A educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda.”  
(*Paulo Freire*)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Neusa Maria Sousa de Oliveira e Ironi Rodrigues de Oliveira pelo investimento prestado, dedicação, exemplo moral e profissional e pela compreensão dos meus objetivos.

À minha avó Divina Alves Lopes por sempre ter apoiado minhas decisões e ter dedicado tanto tempo de sua vida à minha educação.

Ao meu irmão, Cassio Sousa de Oliveira, que mostra-se indiferente aos acontecimentos mas está sempre preparado para ajudar.

À Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Pará, pela formação profissional, especialmente na pessoa do Prof. José Diomedes Barbosa, que agarrou com entusiasmo a construção de uma escola de veterinária na Amazônia. Nunca hesitou em adquirir cada vez mais material para ensinar seus alunos e nunca faltou energia para planejar e construir o futuro de seus orientados.

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite pela orientação, pela dedicação insaciável ao exercício de sua profissão, por possibilitar a ascensão social e profissional de tantos indivíduos e por não lhe faltar empenho para atender aos pedidos de seus orientados. E a sua esposa Sueli Siqueira Leite, que juntos me acolheram sem medir esforços.

Ao Prof. Carlos Magno e amigos da Clínica de Grandes Animais da UFPA pelos ensinamentos, pelo companheirismo, por estarem sempre dispostos a ajudar e pelos momentos de trabalho e diversão.

Aos amigos do Laboratório de Retrovírus da UFMG pelo acolhimento, ensinamentos e pelos próximos quatro anos de convivência que teremos pela frente.

Ao Prof. Carlos Tokarnia e David Driemeier pelo processamento histológico.

Ao Prof. Marcos Xavier pela análise estatística e Prof<sup>a</sup>. Marília Martins Melo pelas orientações técnicas.

À Dr<sup>a</sup>. Mitsue Haragushi e a aluna Luma G. L. Freitas pela avaliação das saponinas.

Ao Eduardo Bastianetto, Heloísa Maria Falcão Mendes e André Penido Oliveira pela ajuda nas coletas de campo.

Ao Márcio Costa Teixeira e Ronaldo Costa, proprietário das Fazendas Lagoinha e Pacu, por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho que juntamente com seus familiares e funcionários tiveram paciência e contribuíram para viabilizar os experimentos.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Ao INCT – Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira pelo apoio financeiro.

À Deus por todos os anteriores e por tornar oportuna a vida.



---

## SUMÁRIO

---

<b>1.</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>4.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....</b>	<b>15</b>
4.1	FOTOSSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA.....	15
4.2	ESPORODESMINA.....	16
4.3	SAPONINAS.....	17
4.3.1	Classificação das saponinas.....	17
4.3.2	Saponinas esteroidais e suas ações tóxicas.....	18
4.3.3	<i>Brachiaria</i> spp. e fotossensibilização hepatógena.....	19
4.4	FILOERITRINA.....	19
4.5	FOTOSSENSIBILIZAÇÃO EM BÚFALOS.....	20
<b>5.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
5.1	SURTO 01.....	22
5.2	SURTO 02.....	22
5.3	ESTUDO FITOQUÍMICO DAS PASTAGENS.....	23
5.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	24
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
6.1	SURTO 01.....	24
6.2	SURTO 02.....	27
6.3	PERFIL BIOQUÍMICO.....	31
6.4	SAPONINAS ESTEROIDAIAS NAS PASTAGENS.....	34
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>

---

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1. Valores séricos de GGT, AST, BD, BI, BT, uréia e creatinina de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens*, com (animais 01 e 02) e sem (animais 1000 - 1091) dermatopatia por fotossensibilização, Minas Gerais, 2011.....26
- Tabela 2. Valores séricos de GGT, AST, BD, BI, BT, uréia e creatinina de búfalos com dermatopatia (n=7) por fotossensibilização, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens*, Minas Gerais, 2011.....29
- Tabela 3. Valores séricos de GGT, AST, BD, BI, BT, uréia e creatinina de búfalos clinicamente sadios, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens*, município de Inhaúma, Minas Gerais, 2011.....30
- Tabela 4. Intervalo de confiança, valores médios e desvio padrão das variáveis GGT, AST, BD, BI, uréia e creatinina, em animais intoxicados por *B. decumbens* (intoxicados) e animais clinicamente sadios (sadios), Minas Gerais, 2011.....32
- Tabela 5. Níveis da saponina protodioscina (em %) e características das pastagens (altura em cm, folhas verdes – FV e material senescente - MS) de acordo com as datas de amostram ao longo de um ano, no município de Fortuna de Minas, Minas Gerais, 2011.....35
- Tabela 6. Correlação de Spearman para saponina x características das pastagens e precipitação pluviométrica diária de chuva, valores de P e números de pares (n).....36

---

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1. Fígado com aspecto de “noz moscada”, de um bubalino com lesão hepática causada pela ingestão de *B. decumbens*.....26
- Figura 2. Fígado e vesícula biliar aumentados de tamanho, de um bubalino intoxicado por *B. decumbens*.....26
- Figura 3. Secção histológica do fígado de um bubalino com fotossensibilização hepatógena. Necrose incipiente de hepatócitos na região centro-lobular, caracterizada por condensação da cromatina nuclear e citoplasma mais eosinofílico que o normal (seta) e raros hepatócitos necróticos ou que sofreram lise. **A** – HE, obj.10x e **B** – HE, obj.25x.....27
- Figura 4. Bubalinos em pastagem de *Brachiaria decumbens*, piquete no qual animais apresentaram fotossensibilização hepatógena, em uma propriedade rural no município de Fortuna de Minas, Minas Gerais.....28
- Figura 5. Animal apresentando lesões de pele devido a fotossensibilização hepatógena.....29
- Figura 6. Lesão de pele caracterizada por pele ressecada, com aspecto mumificado e desprendendo-se na região da garupa.....29

Figura 7. Secção histológica de biópsia hepática de búfalos intoxicados por <i>B. decumbens</i> . Presença de cristais em ductos biliares (seta), discreta megalocitose (cabeça de seta), macrófagos espumosos (seta branca) e tumefação hepatocelular moderada.....	21
Figura 8. Bubalino apresentando lesões de pele, fase aguda da intoxicação por <i>B. decumbens</i> ..	31
Figura 9. Mesmo animal da Figura 6, 15 dias após, apresentando lesões de pele em fase de cicatrização.....	31
Figura 10. Representação gráfica das médias das variáveis da função hepática e renal de búfalos intoxicados ou não por <i>Brachiaria decumbens</i> , Minas Gerais, 2011.....	33
Figura 11. Curva de calibração da saponina protodioscina pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência usando detector de espalhamento de luz evaporativo (CLAE/DELE).....	34
Figura 12. Cromatograma da protodioscina por CLAE/DELE.....	34
Figura 13. Representação gráfica da média diária de precipitação pluviométrica e níveis da saponina protodioscina em três piquetes de <i>B. decumbens</i> (curral, laranjeira e sinil) por um período de um ano entre 2009 e 2010, Minas Gerais, 2011.....	36

## 1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi relatar o estudo da fotossensibilização hepatógena em búfalos durante dois surtos pela ingestão de *Brachiaria decumbens* no município de Fortuna de Minas, MG. No surto 01 foram atendidos dois búfalos jovens com fotossensibilização e outros oito animais sem sinais clínicos pertencentes ao mesmo lote dos enfermos. No surto 02 foram atendidos sete animais com lesões de pele e outros nove, clinicamente saudáveis, criados sob as mesmas condições em município vizinho. Todos os animais foram submetidos ao exame clínico e foi coletado soro para determinação dos níveis séricos de gama-glutamil-transpeptidase (GGT), aspartatoamino-transferase (AST), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), bilirrubina total (BT), indicadores da função hepática e de uréia e creatinina, indicadores da função renal. Realizou-se histopatologia de fragmentos do fígado de cinco animais. Durante os surtos e a cada dois meses ao longo de um ano, foram coletadas amostras de capim dos piquetes onde os animais adoeceram para avaliação quantitativa da saponina protodioscina, aliado a observações das características das pastagens e dados diários de pluviosidade. Os sinais clínicos observados foram apatia, perda de peso, inquietação, retração cicatricial das orelhas e prurido intenso nos locais das lesões de pele, principalmente, na região da garupa, inserção da cauda, pescoço e membros posteriores. Semelhantes aos observados em outros ruminantes, porém sem a presença marcada de icterícia. Apenas a enzima GGT apresentou níveis aumentados ( $P < 0,01$ ) nos animais intoxicados ( $n=17$ ) quando comparado aos animais saudáveis ( $n=9$ ), sendo indicada para diagnosticar lesão hepática em búfalos criados em pastos de *B. decumbens*. Na microscopia do fígado verificou-se macrófagos espumosos e lesões de hepatopatia associado à presença de cristais em ductos biliares. Durante os surtos os níveis de protodioscina estavam acima de 3% e logo após reduziram para níveis inferiores a 0,80%, comprovando a etiologia da lesão hepática. Os surtos ocorreram no início do período chuvoso e houve correlação positiva entre saponina e quantidade de precipitação pluviométrica, bem como quantidade de folhas verdes na pastagem, concluindo que a gramínea esteve mais tóxica neste período.

Palavras-Chaves: Búfalos, fotossensibilização, *Brachiaria* spp., saponina, protodioscina

## 2. ABSTRACT

*The objective of this research was report the hepatogenous photosensitization in buffalos during two outbreaks caused by the ingestion of Brachiaria decumbens in the Fortuna de Minas town, Brazil. Two young buffalos were checked in the outbreak 01 with photosensitization along with another eight animals without clinical signs belonging to the same sick group. In the outbreak 02 seven animals were checked with skin injuries and another nine, clinically healthy, raised under the same conditions in a neighbor county. All the animals were submitted through clinical exam and in order to determine the serum levels of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), aspartate transaminase (AST), direct bilirubin (BD), indirect bilirubin (BI), and total bilirubin (BT) which all are indicators of liver functions as well as urea and creatinina, which are indicators of kidney functions, serum was collected. Was performed histopathology of liver fragments from five animals. During the outbreaks and in every two months along the year, samples from the paddock's grass were collected where the animals got sick in order to evaluate the quantity of protodioscin saponin, along with observations of the pasture characteristics and daily data of rainfall. The clinical signs observed were apathy, weight loss, unquiet, scar retraction of the ears and intensive rash, intensive itch on the skin injuries, mainly, in the croup area, tail, neck and back limbs. The sings were very similar to the ones observed in other ruminants, but without the marking presence of icterus. Only the GGT enzyme presented levels statistically different ( $P < 0.01$ ) between intoxicated ( $n=17$ ) and healthy animals ( $n=9$ ) and this enzyme can be indicated for the liver injury evaluation in buffalos grazing B. decumbens. On microscopy the liver was observed foamy macrophages and hepatopathy injuries associated with the presence of crystals in bile ducts, found both in sheep and cattle intoxicated by grass from the gender Brachiaria spp. During the outbreaks the levels of protodioscin were above 3% and right after they were reduced to inferior levels below 0.80%, assuring the etiology of the liver injury. The outbreaks occurred in the beginning of the rainy season and there was positive correlation between saponin versus the quantity of rainfall as well as the quantity of green leaves in the pasture, concluding that the grass was more toxic in this period.*

*Key-words: Buffaloes, photosensitization, Brachiaria spp., saponin, protodioscin.*

### 3. INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino brasileiro apresentou crescimento de 129,48% da década de 1980 para a atual. Dados oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística apontam um rebanho nacional de 1.135.191 cabeças, porém dados mais otimistas das associações de criadores afirmam existir um rebanho superior a três milhões de animais. Em termos econômicos a atividade cresce 12% ao ano, impulsionado pelo aumento do número de criadores e abertura de novos mercados.

O preço pago pelo litro do leite e a exportação de animais de reprodução para a Venezuela, Colômbia e Filipinas tem aquecido a bubalinocultura nos últimos três anos, além do investimento em estratégias de marketing que provocou maior divulgação e aumento do consumo de produtos lácteos produzidos a partir do leite de búfala. A atividade está passando por um pico de expansão, e tem potencial para tal, pois trata-se de animais rústicos, adaptados ao sistema de criação brasileiro, dóceis e fáceis para trabalhar na rotina quando são manejados de maneira adequada. Além disso, o leite apresenta de 7 a 8% de gordura e 4,5% de proteína que fornece um rendimento muito grande na indústria de laticínios, fato que tem levado a algumas transformações na cadeia produtiva, como o investimento em melhoramento genético, produção leiteira, nutrição, sanidade e estruturação do mercado. É dever da academia participar deste processo, apoiar e fornecer subsídios técnicos a esta atividade que está sendo estabelecida ao longo dos anos.

Do ponto de vista sanitário os bubalinos são suscetíveis as mesmas doenças que acometem os bovinos, com variações relativas à resistência, manifestação de sinais clínicos e resposta imunológica, o que torna necessário o estudo do comportamento das enfermidades nesta

espécie animal, motivando assim, o desenvolvimento de programas nacionais e estratégias de controle e profilaxia específicos aos bubalinos. Fotossensibilização hepatógena pela ingestão de gramíneas do gênero *Brachiaria* spp., é comumente observada e relatada no Brasil e em outras partes do mundo afetando as espécies bovina, ovina e equina, porém em relação aos bubalinos poucos dados estão disponíveis na literatura.

Este trabalho tem como objetivo relatar a ocorrência, caracterizar o quadro clínico-patológico, avaliar a saponina protodioscina nas pastagens e a bioquímica sérica hepática e renal em búfalos durante dois surtos de fotossensibilização hepatógena pela ingestão de *Brachiaria decumbens* no estado de Minas Gerais.

### 4. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

#### 4.1 FOTOSSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA

A fotossensibilização hepatógena é uma enfermidade que ocorre quando substâncias hepatotóxicas, plantas tóxicas ou agentes infecciosos lesionam o fígado de forma suficiente para impedir a excreção da filoeitrina, um metabólito produzido no rúmen como resultado do metabolismo da clorofila. A filoeitrina é um agente fotodinâmico que ao não ser eliminada pelo fígado lesionado acumula-se na corrente circulatória, absorvendo certos comprimentos de onda de luz ultravioleta (UV), tornando-se ativa e transmitindo esta energia extra para as células circunjacentes, resultando em lesão celular (Scheie et al., 2002).

Desta forma, a incidência dos raios solares pode levar ao aparecimento dos sinais clínicos da fotossensibilização, caracterizados por enrugamento e formação de crostas em grandes extensões da pele, sobretudo nas áreas não pigmentadas e

menos protegidas da irradiação solar, inapetência, excitabilidade, prurido, lacrimejamento, edema de barbeta, dos flancos e da prega caudal, edema e retração cicatricial das orelhas, poliúria, ceratite e cegueira, icterícia, enfraquecimento, desidratação e morte, causando grandes prejuízos econômicos (Stannard, 1994).

No Brasil, casos de fotossensibilização hepatogena em bovinos, ovinos, caprinos e equinos estão associados, principalmente, às gramíneas do gênero *Brachiaria* spp. (Barbosa et al., 2006; Camargo et al., 1976; Döbereiner et al., 1976; Driemeier et al., 2002; Lemos et al., 1996, 1997 e 1998; Motta et al., 2000; Schenk et al., 1991; Stiegelmeier, 2002).

Por muitos anos a toxicidade da *Brachiaria* spp. foi atribuída ao fungo *Phytomyces chartarum*, que pode produzir a toxina esporodesmina causadora de lesão hepática. Porém estudos mais recentes demonstraram a presença de saponinas esteroidais nestas gramíneas, produtos do metabolismo vegetal secundário e apontadas como agente causador de lesão hepática nos animais, resultando em fotossensibilização (Brum, 2006).

#### 4.2 ESPORODESMINA

A esporodesmina é uma micotoxina produzida pelo fungo saprófita chamado *Phitomyces chartarum*. Pertence ao grupo de compostos tóxicos epipolitiadioxipiperazina e está associada a uma doença que ocorre principalmente em ovinos na Nova Zelândia, mas também em bovinos, conhecida inicialmente como eczema facial (Richard, 1973).

Esta micotoxina é hepatotóxica e sua ingestão provoca lesão oclusiva dos ductos biliares seguido por fotossensibilização. Na Nova Zelândia, a doença é mais observada no outono, podendo ocorrer em qualquer outra estação do ano que proporcione rápido crescimento da pastagem com

acúmulo de material vegetal morto. Clima com temperaturas por volta de 24°C e umidade acima de 90%, o que favorece o crescimento do fungo, esporulação e produção da esporodesmina (Lancashire e Keogh, 1968).

O eczema facial é comumente observado em pastagens de *Lolium perenne* e foi assim denominado, pois os ovinos lanados apresentam a face como área mais exposta à irradiação solar, local onde eram observadas as principais manifestações da doença. Simth (2000) conduziu um experimento com a administração oral de esporodesmina em ovelhas confirmando a patogênese dos surtos de fotossensibilização neste país, o que também tinha sido observado na Austrália (Dent e Rofe, 1967).

Existe associação entre quantidade de toxina produzida e número de esporos em culturas do fungo *P. chartarum*. Baseado nestas observações desenvolveu-se um método para estimar a toxicidade das pastagens, de forma que contagens de esporos no pasto por volta ou acima de 250.000 esporos/g de folhas estão associadas com a ocorrência de surtos de eczema facial ou fotossensibilização na Nova Zelândia (Menna e Bailey, 1973).

No Brasil trabalhos de diversos autores apontaram o fungo *P. chartarum* como o responsável por surtos de fotossensibilização em pastagens de *Brachiaria* spp. (Camargo et al., 1976; Döbereiner et al., 1976; Fagliari et al., 1993; Alessi et al., 1994), porém em nenhum deles foi analisado a produção da esporodesmina pelo fungo.

Brum (2006) cita que em um estudo feito, no ano de 1997, com 51 isolados do fungo *P. chartarum* de amostras de pastagens brasileiras formadas de *Brachiaria* sp. que produziram casos de fotossensibilização, sendo 21 do estado de Goiás e 30 do Mato Grosso, somente um dos isolados desse

último estado produziu esporodesmina. E Meagher et al. (1996) observaram que amostras de *B. decumbens* que causaram surto de fotossensibilização hepatógena no Brasil, continham menos que 5.500 esporos de *P. chartarum* por grama de pasto seco e nenhum dos 21 isolados do fungo produziram esporodesmina.

Portanto, no Brasil, não existem dados de que os casos de fotossensibilização hepatógena estão diretamente relacionados à micotoxina esporodesmina.

### 4.3 SAPONINAS

As saponinas são glicosídeos amplamente distribuídos nos vegetais, produzidas durante o metabolismo vegetal secundário. Incluem uma diversidade de compostos que são caracterizados pela estrutura da aglicona, podendo ser esteroidal ou triterpênica.

Apresentam diversas propriedades biológicas e físicoquímicas, como a formação de espuma, propriedades detergentes, emulsificante e surfactante, efeito tóxico para determinadas espécies e efeito benéfico em algumas situações, sendo inclusive, empregadas em atividades industriais e na alimentação humana (Güçlü-Ustündağ e Mazza, 2007).

Na alimentação humana, as saponinas tem sido foco de estudo nos últimos anos devido a sua ação benéfica sobre a saúde, como na redução do colesterol e pela propriedade anticancerígena (Gurfinkel e Rao, 2003)

As saponinas estão presentes em mais de 100 famílias de plantas e em algumas espécies marinhas, como a estrela e o pepino do mar ( Güçlü-Ustündağ e Mazza, 2007).

Nos vegetais, as saponinas estão presentes em mais de 400 espécies de plantas, das quais algumas são utilizadas como fonte de alimentação ou aditivos na nutrição de

ruminantes. As saponinas possuem efeitos benéficos como promotores de crescimento, podem apresentar atividade antifúngica, antiinflamatória, antibacteriana, antiviral, antihelmíntica, moluscida e inseticida, porém, podem apresentar efeito tóxico para ruminantes em alguns vegetais (Wina et al., 2005; Güçlü-Ustündağ e Mazza, 2007).

As gramíneas do gênero *Brachiaria* são as de maior importância na intoxicação por saponinas em ruminantes, devido à presença de saponinas esteroidais que podem provocar lesão hepática, o que impede a excreção da filioeritrina produzida no rúmen a partir da clorofila, que se acumula na pele dos animais, levando a um quadro de fotossensibilização hepatógena, como descrito em bovinos, ovinos, caprinos e equinos (Graydon et al., 1991; Schenk et al., 1991; Smith e Miles, 1993; Meagher et al., 1996; Lemos et al., 2002).

#### 4.3.1 Classificação das saponinas

As saponinas podem ser glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, possuindo uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide), denominada aglicona ou sapogenina, e outra parte hidrofílica que é formada por cadeias de açúcares (Schenkel et al., 2007).

Podem ser classificadas de acordo com o núcleo da aglicona, pelo seu caráter ácido, básico ou neutro e pelo número de cadeias de açúcares ligadas na aglicona. Quanto à aglicona ou sapogenina, são divididas em saponinas esteroidais e triterpênicas. O caráter básico decorre da presença de nitrogênio, já o caráter ácido pode ser devido à presença de um grupamento carboxila na aglicona, na cadeia de açúcares ou em ambos. (Schenkel et al., 2007; Lima et al., 2009). As saponinas esteroidais são encontradas principalmente nas monocotiledôneas, como é o caso das gramíneas e as triterpênicas predominantemente nas dicotiledôneas,



como a soja, feijão, alfafa, entre outras (Saparg et al., 2004)

Em relação ao número de cadeias de açúcares ligadas na aglicona, as saponinas podem ser monodesmosídicas ou bidesmosídicas.

Saponinas monodesmosídicas possuem uma cadeia de açúcar, normalmente ligada ao C-3, enquanto que as bidesmosídicas têm duas cadeias de açúcares, uma ligada no C-3 e outra no C-22. Os açúcares glicose, galactose, xilose, arabinose, ramnose e ácido glicurônico são os principais constituintes destas cadeias (Wina et al., 2005; Schenkel et al., 2007).

#### 4.3.2 Saponinas esteroidais e suas ações tóxicas

As saponinas esteroidais presentes principalmente nas monocotiledôneas, categoria que abrange as gramíneas, produtos do metabolismo vegetal secundário, apesar de não serem essenciais para a vida da planta produtora, garantem vantagens para sua sobrevivência no ecossistema a que pertence (Santos, 2007). Geralmente são encontradas nas partes dos tecidos vegetais mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos, estando relacionadas com o sistema de defesa da planta por atuar como barreira química e protetora (Wina et al. (2005).

Por apresentarem ação antimicrobiana e antifúngica, prevenindo o crescimento de fungos, são indicadas como fitoprotetoras (Pizarro, 1999). O mecanismo principal sugerido para esta atividade é a interação com esteróides da membrana (Alvares, 2006).

Pires et al. (2002), apontam a existência de quatro saponinas esteroidais e três sapogeninas das partes aéreas de *B. decumbens*. A gramínea pertence ao grupo de plantas capazes de induzir fotossensibilização hepatógena semelhantes ao mesmo efeito descrito em *Panicum* spp.,

*Tribulus terrestris*, *Agave lecheguilla* e *Nartheccium ossifragum*.

Estas espécies são conhecidas por conterem saponinas esteroidais e tem sido associadas com a deposição de material cristalóide no sistema biliar e fotossensibilização.

Nas folhas de *B. decumbens* foi isolada pela primeira vez no ano de 2003 a saponina esteroidal protodioscina. A protodioscina difere da dicotomina, uma saponina esteroidal isolada de *Panicum dichotomiflorum*, pela ausência de uma molécula de ramnose (Haraguchi et al., 2003).

Em estudo realizado por Meagher et al. (1996), verificou-se que as saponinas de *Brachiaria decumbens* são derivadas das sapogeninas diosgenina e yamogenina, as quais passam pelo metabolismo microbiano do trato gastrointestinal dos ruminantes e resultam nas sapogeninas epismilagenina e episarsasapogenina, respectivamente, responsáveis pela formação de cristais em ductos biliares e encontradas no conteúdo ruminal de ovinos experimentalmente intoxicados por *B. decumbens* (Cruz et al., 2000).

O estudo da natureza química dos cristais biliares possibilitou identificá-los como sais de cálcio de glicuronídeos de epismilagenina e episarsasapogenina, que tornam-se insolúveis e depositam-se nos ductos biliares, o que demonstra o papel das saponinas na formação desse produto e fotossensibilização (Miles et al., 1991)

Do rúmen de ovinos que recebiam alimentação a base de *B. decumbens*, foram isolados metabólitos de saponinas esteroidais derivadas de diosgenina e yamogenina identificadas na gramínea (Salam Abdullah et al., 1992).

#### 4.3.3 *Brachiaria* spp. e fotossensibilização hepatógena

No Brasil casos de fotossensibilização hepatógena em bovinos, ovinos, caprinos e equinos estão associados, principalmente, às gramíneas do gênero *Brachiaria* spp. (Tokarnia et al., 2002), que representam as principais espécies forrageiras do país, existindo, segundo Ferraz (2003), aproximadamente 95 milhões de hectares (ha) cultivados com espécies de *Brachiaria*, sendo constituídos, principalmente de *Brachiaria brizantha* (60 milhões de ha), *Brachiaria decumbens* (25 milhões de ha), *Brachiaria humidicola* e outras (10 milhões de ha).

Ruminantes que desenvolvem fotossensibilização hepatógena por *Brachiaria* spp., apresentam lesões histológicas de colangiohepatopatia, caracterizada pela presença de cristais birrefringentes em ductos biliares e hepatócitos (Meagher et al., 2001).

Por meio do estudo químico dos cristais é indicado que, para sua formação, é necessária uma fonte de saponina esteroidal na dieta, porém foram relatadas dificuldades na reprodução da doença pela administração de saponinas (Flayoen et al., 1991).

Experimentalmente, houve a reprodução de sinais clínicos de colangiopatia associada a cristais em uma ovelha que ingeriu *B. decumbens* por 89 dias e lesões histológicas compatíveis com a enfermidade em outros ovinos que ingeriram a planta por 77 e 150 dias, mas não manifestaram sinais clínicos de fotossensibilização (Driemeier et al., 2002).

Colangiohepatopatia, com proliferação de ductos biliares e presença de cristais, mudanças ruminais, e presença de macrófagos espumosos no fígado e linfonodos também tem sido associado a

toxicidade induzida por *B. decumbens* (Driemeier et al., 2002).

A presença e a quantidade de saponinas esteroidais nas pastagens ainda não estão completamente elucidadas. Em estudo realizado por Brum et al. (2009), verificou-se que os níveis de protodioscina detectados em pastagens de *Brachiaria brizantha* e *B. decumbens*, aumentaram durante a fase de maturação da planta, sugerindo que a planta é mais tóxica durante este estágio.

Por outro lado, Meagher et al. (1996), encontraram maiores quantidades de diosgenina e yamogenina, em plantas mais jovens de *B. decumbens* do que em plantas mais maduras.

Durante dois surtos de fotossensibilização hepatógena em ovinos por *Brachiaria brizantha* no estado do Pará, os níveis de saponinas na pastagem foram de 0,92 e 0,88%, respectivamente. Os surtos ocorreram durante época de seca na região e início do período chuvoso, onde a pastagem encontrava-se com massa residual reduzida e senescente (Albernaz et al., 2010)

Na bioquímica sérica da função hepática nos ruminantes que desenvolvem fotossensibilização pode-se verificar aumento das enzimas aspartatoamino-transferase (AST) e gama-glutamil-transpeptidase GGT, da bilirrubina total e suas frações, confirmando a lesão hepática induzida pela *Brachiaria* spp. e em alguns casos, principalmente nos ovinos pode ser observada lesão renal, com aumento sérico da uréia e creatinina (Riet-Correa et al., 2007).

#### 4.4 FILOERITRINA

A filoeritrina é uma fitoporfirina produto do metabolismo da clorofila, produzida durante a fermentação anaeróbica pelos microorganismos do rúmen (Quin et al, 1935).

Normalmente a filoteritina é conjugada pelo fígado e excretada com a bile. Entretanto, lesão ou disfunção hepática pode resultar em diminuição ou cessação da eliminação de filoteritina, que cai na corrente circulatória, acumula-se e atinge as células da pele (Scheie et al., 2002).

Resposta inflamatória aguda na pele pode ser induzida quando a filoteritina é excitada pela luz solar. As moléculas de filoteritina excitadas reagem com o oxigênio, resultando em oxigênio livre (O<sub>2</sub>) e possivelmente outras espécies reativas de oxigênio. Acredita-se que O<sub>2</sub> é o principal produto citotóxico formado durante o tratamento fotoquímico de células (Moan e Sommer, 1985).

O oxigênio livre tem curta duração nas células, mas o efeito primário de fotossensibilidade depois da exposição à luz, ocorre no sítio de formação de O<sub>2</sub> (Moan e Berg, 1991).

A eficiência do fotossensibilizante, neste caso a filoteritina, na sensibilização das células depende da sua capacidade de ser absorvido pelas células bem como das suas propriedades fotoquímicas, sendo influenciado por fatores como sua estrutura molecular, tempo de exposição a luz, linhagem celular e temperatura.

Scheie et al. (2002), conduziram um experimento *in vitro* com fibroblastos para analisar a absorção e capacidade fotossensibilizante da filoteritina. Verificaram que ela se localiza principalmente no citoplasma em organelas como o complexo de golgi e mitocôndrias, é um composto lipofílico que penetra nas células por um processo de difusão controlada, sendo melhor absorvida a 37°C e que são necessários poucos segundos de exposição a luz para inativar células cultivadas com filoteritina, o que pode explicar a severa lesão na pele de ruminantes com acúmulo deste composto.

Existem transportadores presente nos hepatócitos que estão relacionados com o transporte de fitoporfirinas e outros metabólitos. Robey et al. (2006), verificaram que o transportador ABCG2 presente nos hepatócitos, promove o transporte e excreção de fitoporfirinas da dieta e hipotetizaram que animais que possuem menor expressão desse transportador ou que são expostos a inibidores podem apresentar predisposição ao desenvolvimento de fotossensibilização. E ainda que, trauma hepático pode diminuir a expressão do ABCG2 de forma que a ingestão de compostos hepatotóxicos pode diminuir a excreção de fitoporfirinas pelos hepatócitos.

#### 4.5 FOTOSSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA EM BÚFALOS

Nos bubalinos poucos relatos de fotossensibilização hepatógena foram encontrados na literatura.

No ano de 1983, em um relatório de viagem a Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Manaus (atualmente Embrapa Amazônia Ocidental) para estudo de uma doença de etiologia obscura em búfalos, assim mencionado pelos autores Carlos Maria Antônio Hubinger Tokarnia e Jerome Langenegger, observou-se animais criados em pastagens de *Brachiaria humidicula* que foram a óbito. A doença ocorria desde o ano de 1980 e os principais sinais clínicos relatados caracterizavam-se por emagrecimento progressivo, anorexia, icterícia, urina amarelada e pele com áreas sem pelos e avermelhada na parte inferior da barbela, axilas e nas virilhas, com áreas de descamação. Os autores suspeitaram de fotossensibilização hepatógena por *Phitomyces chartarum* ou outro fungo saprófita de ação tóxica semelhante, já que a pastagem encontrava-se alta com grande massa de capim, grande parte acamada e com abundantes folhas mortas, e verificaram que a grande maioria dos casos

ocorria na primeira metade do ano, que correspondia à maior precipitação pluviométrica na região. A histopatologia do fígado de um animal, por eles necrosado, mostrou células hepáticas tumefeitas, em grau variável, seus núcleos apresentavam membrana muitas vezes hiper cromática, e os núcleos bem evidentes. Em numerosas áreas sem localização certa dentro do lóbulo hepático, verificou-se grupos de células hepáticas, também tumefeitas, com citoplasma mais claro, espumoso e muitas delas com núcleos coma a cromatina condensada. Em uma amostra de *B. humidicula* foram encontrados os fungos: *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Ulocladium* sp., *Murogenella* sp., *Monacrosporium* sp. e *Spegazzinia* sp. (Tokarnia e Langenegger<sup>1</sup>).

No estado de Minas Gerais foi relatada a ocorrência de fotossensibilização hepatógena em dois bubalinos jovens, criados em pastagens de *Brachiaria* spp. em uma propriedade localizada no município de Inhaúma. Exames bioquímicos revelaram intoxicação subclínica em outros animais clinicamente sadios pertencentes ao mesmo lote dos animais com sintomatologia. A contagem de esporos do fungo *P. chartarum* na pastagem variou de 10.000 a 30.000 esporos/g da forragem, de forma que os autores atribuíram a etiologia da intoxicação a outros fatores como, por exemplo, a presença de saponinas esteroidais no capim (Melo et al., 2009).

Em outro trabalho realizado neste Estado, município de Santa Rosa da Serra, observou-se a ocorrência de cinco bubalinos com idade entre três a cinco

meses, criados em pastagem de *B. decumbens* apresentando lesões de pele compatíveis com fotossensibilização, porém os autores atribuíram a etiologia da enfermidade a intoxicação por *Lantana* spp., planta hepatotóxica que foi encontrada na pastagem (Bastianetto et al., 2005).

Cinco bubalinos de 1,5 anos de idade, da raça Murrah que participaram previamente de um experimento para estudar o acúmulo de cobre hepático, desenvolveram fotossensibilização após quatro dias de introdução em piquetes de *Brachiaria brizantha*. A etiologia neste caso foi a toxicidade hepática induzida pelo cobre durante o experimento, quando os animais receberam doses diárias crescentes de cobre (0,3 a 2 g por animal) administradas por fístula ruminal durante três meses (Minervino et al., 2010).

No estado do Pará, lesões histológicas de fotossensibilização tais como macrófagos espumosos em fígado e linfonodos mesentéricos, hepatócitos da região centrolobular aumentados de volume, com citoplasma pálido e vacuolizado, membrana irregular e núcleo pequeno, foram observados em búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp., porém nenhum dos animais apresentavam quadro clínico da enfermidade (Riet-Correa et al., 2010).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados dois surtos de fotossensibilização hepatógena em bubalinos (surto 01 e surto 02), em duas propriedades rurais vizinhas (propriedade A e propriedade B), localizadas na região central do estado de Minas Gerais, pertencentes ao mesmo proprietário e com animais do mesmo padrão racial e grupo genético.

---

<sup>1</sup>TOKARNIA, C.M.A.H.; LANGENEGGER, J. Relatório de viagem realizada pelos med. vet. Carlos Maria Antônio Hubinger Tokarnia e Jerome Langenegger, no período de 1º a 10.2.83, para estudar doença de etiologia obscura em búfalos, na UEPAE de Manaus. Rio de Janeiro, 1983, 8f. Não publicado.

## 5.1 SURTO 01

Durante visita técnica realizada no dia 21 de outubro de 2009 à propriedade A com o objetivo de coletar sangue em búfalas para exame de brucelose, foram identificados dois búfalos jovens com idade de quatro meses apresentando lesões de pele na região da garupa, membros e pescoço, clinicamente compatível com fotossensibilização. Devido à gravidade dos quadros clínicos apresentados pelos animais despertou-se o interesse em estudá-los.

Os animais foram submetidos ao exame clínico geral segundo Dirksen et al. (1993). Dados epidemiológicos foram obtidos por questionário aplicado ao proprietário e funcionários da propriedade, e observação *in loco*. Os dados coletados foram referentes à raça e idade dos animais, manejo, época e locais onde ocorreram a enfermidade, número de animais do lote, espécie da gramínea e características das pastagens, presença de plantas tóxicas nas pastagens, ocorrência de surtos em outras épocas e espécies animais envolvidas.

Amostras de sangue sem anticoagulante foram coletadas através de venopunção da jugular utilizando sistema de coleta a vácuo, para obtenção de soro, dos dois animais atendidos e de outros oito animais sem sinais clínicos pertencentes ao mesmo lote dos enfermos para realização de provas bioquímicas de função hepática e renal.

As amostras de soro foram armazenadas em tubos do tipo eppendorf, congeladas a -20°C e enviadas ao Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal do Pará, onde foram determinados os níveis séricos de GGT (gamaglutamil-transpeptidase), AST (aspartato-aminotransferase), BD (bilirrubina direta), BI (bilirrubina indireta) e BT (bilirrubina total) para avaliação da função hepática e de uréia e creatinina para avaliação da função renal.

Para as dosagens de GGT, AST, uréia e creatinina, foram empregados Kits comerciais Cepa (Mbiolog Diagnósticos, Minas Gerais, Brasil). Para as bilirrubinas Kits Doles (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios, Goiânia, Brasil). Ambas dosagens foram lidas em analisador bioquímico semi-automático BIOPLUS-2000.

Devido à gravidade do quadro clínico apresentado por um dos animais optou-se pela eutanásia do mesmo para estudo das alterações macroscópicas e microscópicas. Fragmentos de diversos órgãos foram coletados, fixados em formalina a 10% e enviados ao Setor de Patologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para avaliação das alterações microscópicas, onde foram processados pelos métodos rotineiros de histopatologia e corados com hematoxilina e eosina - HE (Luna, 1968).

Capim do piquete onde os animais adoeceram (piquete curral) foi coletado. Para coleta tentou-se simular o pastejo de um bubalino, de forma que, a parte superior da gramínea (folhas) foi agarrada e arrancada manualmente. Aproximadamente 3kg de capim de vários pontos aleatórios do piquete foram coletados, secos a sombra, moídos a 1mm em moinho do tipo Willey e enviados ao Laboratório de Farmacologia do Instituto Biológico de São Paulo para determinação da presença e nível da saponina protodioscina. O método de avaliação da saponina está descrito no item 7.3.

## 5.2 SURTO 02

Quinze dias após o surto 01, observou-se nova ocorrência de fotossensibilização na propriedade B, onde nova visita técnica (06 de novembro de 2009) foi conduzida.

Da mesma forma que no surto 01 descrito anteriormente, foi coletado sangue para obtenção do soro de sete animais que

apresentavam lesões de pele para avaliação da função hepática e renal, e para fins de comparação, foi coletado sangue de outros nove animais, de mesma faixa etária e grupo genético, criados em outra fazenda localizada no município de Inhaúma (também do mesmo proprietário), manejados no mesmo tipo de pastagem, mas que apresentavam-se aparentemente saudáveis e segundo o proprietário, nunca havia sido observado animais apresentando quadro clínico semelhante na propriedade (propriedade C).

Os animais foram submetidos ao exame clínico segundo Dirksen et al. (1993). Dados epidemiológicos foram obtidos por questionário aplicado ao proprietário e funcionários das propriedades e observação *in loco*, semelhante ao surto 01.

Capim dos piquetes onde os animais adoeceram (piquete laranjeira e sinil) e dos animais pertencentes à propriedade localizada em Inhaúma (piquete pacu) foi coletado de acordo com o descrito anteriormente, secos a sombra, moídos a 1mm em moinho do tipo Willey e enviados ao Laboratório de Farmacologia do Instituto Biológico de São Paulo, para determinação dos níveis de protodioscina.

Com o auxílio de uma agulha modelo Tru-Cut, foi realizada biópsia hepática de quatro animais com lesões de pele, de acordo com a técnica descrita para bovinos (Dirksen et al., 1993). Os fragmentos de fígado foram fixados em formalina a 10% e enviados ao Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para avaliação das alterações microscópicas, onde foram processados pelos métodos rotineiros de histopatologia e corados com HE (Luna, 1968).

### 5.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS PASTAGENS

A partir da ocorrência de cada um dos surtos capim dos piquetes envolvidos nos

surtos, isto é, piquete curral (surto 01) e piquetes sinil e laranjeira (surto 02), foram coletados com intervalo aproximado de dois meses durante o período de um ano, secos a sombra, moídos a 1 mm em moinho do tipo Willey e enviados ao Laboratório de Farmacologia do Instituto Biológico de São Paulo.

Estimou-se semiquantitativamente a altura e condições das pastagens de cada piquete adotando-se um escore de +, ++, +++, respectivamente pouco, moderado e muito, para características de quantidade de folhas verdes (FV) e material senescente (MS) dos piquetes no momento de cada coleta.

Para análise quantitativa de protodioscina por cromatógrafo de alta eficiência (CLAE) usando detector de espalhamento de luz evaporativo (DELE) [High-Performance Liquid Chromatography/Evaporative Light Scattering Detection = HPLC/ELSD] foram realizadas as seguintes etapas:

#### a) Curva de calibração

O padrão de protodioscina pesando 5 mg foi dissolvido em 5 mL de acetonitrila aquosa 50% (solução estoque) e realizadas as diluições nas faixas de 125 a 1000 mg/mL para obtenção de curva de calibração no CLAE/DELE.

#### b) Condição do CLAE/DELE

O equipamento CLAE marca Shimadzu modelo LC-10AD acoplado com detector de espalhamento de luz evaporativo da marca Shimadzu modelo ELSD-LTs foi empregado para análise quantitativa de protodioscina. A coluna usada foi Shim-Pack CLC-ODS (4,6x150mm, 5,0µL), com sistema gradiente empregando acetonitrila (B)/água (A), iniciando com 20% B; 5 min, 35% B; 12,5 min 35%; 5min, 20% B, fluxo 1mL/min, injetado 10 µL, usando loop de 10 µL.

### c) Extração

As amostras de folhas, secas e moídas, previamente colocadas em estufa por uma hora para obter material isento de umidade, foram processadas em duplicata. Um grama do pó da planta seca foi colocado em um béquer de 25 mL.

Para extração adicionou-se 8 mL de solução de acetonitrila e água 50% sob agitação com sonicador por 30 minutos e em seguida o conteúdo líquido foi transferido para um tubo de ensaio. Procedeu-se uma segunda extração, a planta remanescente no béquer foi acrescida de 5 mL da solução de acetonitrila e água 50% sendo também sonicado por 30 minutos.

O conteúdo extraído foi transferido para o mesmo tubo de ensaio da primeira extração. A terceira extração prosseguiu com o acréscimo de 3 mL da solução de acetonitrila e água 50% sonicado por 20 minutos. A solução extraída foi novamente transferida para o tubo de ensaio.

O tubo de ensaio contendo as soluções extraídas foi centrifugado por 30 minutos, a 5000rpm e 13°C. Após a centrifugação, as amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 10 mL, completado com a solução de acetonitrila e água 50%.

A solução do balão foi filtrada com filtro Millex e transferida para um novo tubo de ensaio. Cada solução do tubo de ensaio foi injetada no CLAE/DELE, técnica modificada de Ganzera et al. (2001).

A média diária de precipitação pluviométrica em mm, foi calculada a partir de dados diários do índice pluviométrico, recuperados da Estação Meteorológica de Sete Lagoas, distante 42 Km das propriedades estudadas (INMET, 2010), durante todo o período experimental, isto é, setembro de 2009 a setembro de 2010.

## 5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de todas as variáveis estudadas foram submetidos à análise estatística descritiva, com cálculo de médias, desvio padrão e para o cálculo do intervalo de confiança da média, foi considerado erro de 5%. Para comparação de médias foi utilizado o teste de Mann-Whitney com margem de erro de 5% ( $P < 0,05$ ) para distinção dos grupos avaliados nas diferentes variáveis estudadas (Sampaio, 2010).

Para estudo de correlações, a variável saponina teve seus valores correlacionados com média diária de chuva e características da pastagem, tais como altura, quantidade de folhas verdes e quantidade de material senescente, por meio do teste de correlação de Spearman (Sampaio, 2010), considerando o valor de  $P < 0,05$  como significativo.

Todas as análises foram realizadas no programa SAEG-D versão 9.1.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 SURTO 01

Dois búfalos jovens, da raça Murrah, com idade de quatro meses apresentaram no dia 21 de outubro de 2009, lesões de pele na região da garupa, membros e pescoço, clinicamente compatível com fotossensibilização.

Os sinais clínicos apresentados por um dos animais (Animal 01) consistiam em apatia acentuada, anorexia, emaciação, prurido intenso no local das lesões de pele, desidratação, mucosas oculares moderadamente amareladas, secreção ocular, retração cicatricial das orelhas e desprendimento de grandes áreas de pele em diferentes partes do corpo. O animal foi eutanasiado para estudo das alterações macro e microscópicas. O outro animal (Animal 02) apresentava-se clinicamente

melhor, porém com estado nutricional ruim e lesões de pele em estágio de cicatrização.

Segundo dados fornecidos pelo proprietário, estes animais pertenciam a um lote de 62 bubalinos, com idade variando de três a cinco meses, os quais eram manejados em pastagem de *Brachiaria decumbens* e recebiam suplementação mineral *ad libitum*. Deste lote, há duas semanas, dois animais haviam apresentado sintomas semelhantes aos atendidos na ocasião da visita, de modo que um se recuperou e o outro foi a óbito.

Foi informado também, que em anos anteriores casos semelhantes ocorreram nas espécies ovina e bovina quando criadas nestas pastagens, levando vários animais à morte.

A propriedade está localizada na região de Fortuna de Minas, estado de Minas Gerais e atualmente, possui um rebanho de 800 bubalinos em exploração leiteira a pasto, cuja principal gramínea cultivada é da espécie *Brachiaria decumbens*. Na inspeção da pastagem não foi observada nenhuma planta tóxica capaz de provocar fotossensibilização.

Os dois animais (01 e 02) que se encontravam com sinais clínicos da enfermidade, apresentaram níveis elevados das enzimas hepáticas, sendo que no animal 01 estes níveis estavam extremamente aumentados, 174 e 618 U/L, para GGT e AST, respectivamente, quando comparado aos valores de referência para bovinos estabelecidos por Kaneko et al. (2008), 6,1-

17,4 U/L para GGT e 78-132 U/L para AST.

Todas as variáveis bioquímicas estudadas foram comparadas com o padrão de normalidade para bovinos, uma vez que não foi encontrado na literatura valores de referência para bubalinos.

Os valores das bilirrubinas, tanto no animal 01 como no 02, apresentaram-se acima dos valores de referência, já os de uréia e creatinina, indicando lesão renal, apresentaram-se bastante elevados apenas no animal 01 (Tabela 1).

Nos oito bubalinos pertencentes ao mesmo lote dos animais enfermos, porém sem sinais clínicos de fotossensibilização, os níveis de AST apresentaram-se acima da normalidade em todos os animais, já os níveis de GGT apresentaram-se dentro da normalidade para três animais (1064, 1086 e 1091) e acima do padrão para os demais. Os níveis de bilirrubina também se apresentaram elevados para a maioria dos animais. Os indicadores da função renal apresentaram-se dentro da normalidade.

Na necropsia do animal com doença clínica aguda, evidenciou-se carcaça discretamente amarelada, fígado com consistência endurecida, aumentado de volume com bordos arredondados e superfície de corte com aspecto de “noz moscada”, que foi mais evidente no material fixado em formalina a 10% (Figura 1). A vesícula biliar apresentou-se bastante distendida (Figura 2) com conteúdo espesso e presença de grumos.



Tabela 1. Valores séricos de GGT, AST, BD, BI, BT, uréia e creatinina de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens*, com (animais 01 e 02) e sem (animais 1000 - 1091) dermatopatia por fotossensibilização, Minas Gerais, 2011.

PARÂMETROS (*) / ANIMAIS	GGT U/L (6,1-17,4)	AST U/L (78-132)	BD mg/dL (0,04-0,44)	BI mg/dL (0-0,3)	BT mg/dL (0,01-0,5)	Ureia mg/dL (23-58)	Creatinina mg/dL (1-2)
<b>01</b>	174,00	619,00	4,71	2,56	7,27	118	3
<b>02</b>	96,00	168,00	0,26	0,68	0,94	21	0,7
<b>1000</b>	99,00	170,00	0,26	0,54	0,80	20	0,6
<b>1064</b>	13,00	186,00	0,67	0,13	0,80	26	0,8
<b>1068</b>	218,00	180,00	0,67	0,13	0,80	42	1,4
<b>1075</b>	41,00	193,00	0,26	0,68	0,94	48	1,6
<b>1076</b>	117,00	211,00	0,67	0,13	0,80	38	1,3
<b>1086</b>	16,00	173,00	0,53	0,00	0,53	27	0,9
<b>1087</b>	100,00	200,00	0,26	0,54	0,80	45	1,5
<b>1091</b>	12,00	143,00	0,80	1,08	1,88	37	1,2
<b>Média</b>	88,60	224,30	0,91	0,65	1,56	42,20	1,30
<b>Desvio padrão</b>	70,12	139,97	1,35	0,75	2,04	28,42	0,69

(\*)Valores de referência para bovinos segundo Kaneko et al. (2008).



Figura 1. Fígado com aspecto de “noz moscada”, de um bubalino com lesão hepática causada pela ingestão de *B. decumbens*.



Figura 2. Fígado e vesícula biliar aumentados de tamanho, de um bubalino intoxicado por *B. decumbens*.

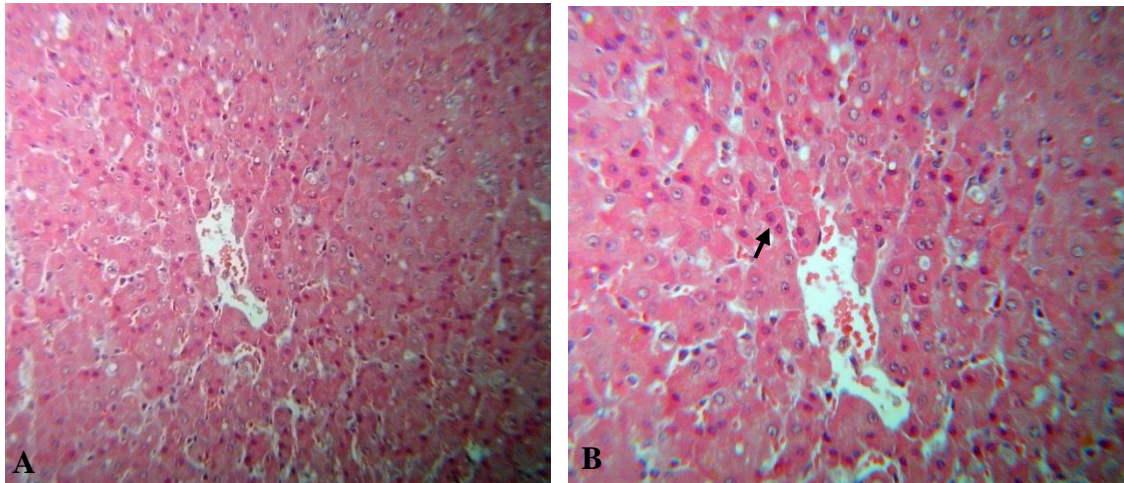


Figura 3. Secção histológica do fígado de um bupalino com sinais clínicos de fotossensibilização hepatógena. Necrose incipiente de hepatócitos na região centro-lobular, caracterizada por condensação da cromatina nuclear e citoplasma mais eosinofílico que o normal (seta) e raros hepatócitos necróticos ou que sofreram lise. **A** – HE, obj.10x e **B** – HE, obj.25x.

A histopatologia do fígado revelou leve estase biliar, hipertrofia dos vasos arteriais, necrose incipiente de hepatócitos na região centro-lobular, caracterizada por condensação da cromatina nuclear e citoplasma mais eosinofílico que o normal e raros hepatócitos necróticos ou que sofreram lise (Figura 3 A e B).

Não foi observada a presença de macrófagos espumosos, nem a presença de cristais nos ductos biliares.

O nível da saponina protodioscina na pastagem na época do surto foi de 3,24%.

A pastagem tinha como características grande quantidade de folhas verdes, moderada de material senescente e altura de 25 cm. Trata-se de um piquete para bezerros estando sempre com carga animal elevada o que mantém a pastagem numa altura mais baixa.

## 6.2 SURTO 02

Um lote de 226 bupalinos, de ambos os sexos, com idade variando de 6 a 8 meses, recém desmamados estavam sendo criados na propriedade A. Os animais eram manejados em um piquete de *B. decumbens*. Devido ao longo período de estiagem nos meses de julho e agosto, a pastagem encontrava-se seca e com pouca matéria vegetal, logo, os animais estavam sendo suplementados com cevada no cocho e recebendo sal mineral *ad libitum*.

No dia 29 de setembro de 2009, coincidindo com o início das chuvas e recuperação das pastagens, os bezerros foram transferidos para três piquetes de *Brachiaria decumbens*, em uma propriedade arrendada, vizinha a propriedade A. Estes piquetes encontravam-se em descanso por um período superior a trinta dias, a altura da pastagem era de aproximadamente 50 cm e apresentava grande quantidade de brotos e folhas verdes (Figura 4).



Figura 4. Bubalinos em pastagem de *Brachiaria decumbens*, piquete no qual animais apresentaram fotossensibilização hepatógena, em uma propriedade rural no município de Fortuna de Minas, Minas Gerais.

Vinte e cinco dias após a introdução desses animais na pastagem, o proprietário informou que observou seis bezerros apresentando apatia, porém não soube informar ao certo o que havia ocorrido. Dois dias após este fato, começou a observar animais mortos em todos os três piquetes, alguns apresentavam lesões de pele, de forma que até o dia da visita técnica (06 de novembro de 2009), seis animais já haviam morrido e outros sete apresentavam lesões de pele (Figura 5).

Ao exame clínico da pele destes sete animais evidenciaram-se extensas áreas ressecadas, com aspecto mumificado, com

rachaduras e ulcerações, desprendendo-se principalmente na região da garupa (Figura 6), lesões crostosas na região da inserção da cauda, membros posteriores, orelhas e dorso dos animais. Outros sintomas observados foram inquietação, prurido intenso, apatia, perda de peso, secreção ocular, retração cicatricial das orelhas e desidratação.

Os valores séricos de GGT, AST, BD, BI, BT, uréia e creatinina dos búfalos com sinais clínicos de fotossensibilização criados nas pastagens de *B. decumbens* do surto 02, são apresentados na tabela 2.





Figura 5. Animal apresentando lesões de pele devido a fotossensibilização hepatógena.



Figura 6. Animal apresentando lesão de pele caracterizada por pele ressecada, com aspecto mumificado e desprendendo-se na região da garupa.

Tabela 2. Valores séricos de GGT, AST, BD, BI, BT, uréia e creatinina de búfalos com dermatopatia (n=7) por fotossensibilização, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens*, Minas Gerais, 2011.

PARÂMETROS (*)/ ANIMAIS	GGT U/L (6,1-17,4)	AST U/L (78-132)	BD mg/dL (0,04-0,44)	BI mg/dL (0-0,3)	BT mg/dL (0,01-0,5)	Uréia mg/dL (23-58)	Creatinina mg/dL (1-2)
9	345,30	320,00	0,39	1,30	1,69	38,00	0,95
13	82,50	200,00	0,20	0,26	0,46	30,00	0,91
1511	79,20	238,00	0,13	0,24	0,37	38,00	0,77
1051	111,60	223,00	0,12	0,23	0,35	38,50	1,02
90	112,30	240,00	0,16	0,23	0,39	34,40	1,22
1520	116,40	227,00	0,51	0,32	0,83	33,50	1,34
1503	14,00	215,00	0,60	0,30	0,90	50,00	0,90
<b>Média</b>	123,04	237,57	0,30	0,41	0,71	37,49	1,02
<b>Desvio padrão</b>	104,20	38,83	0,20	0,39	0,49	6,32	0,20

(\*)Valores de referência para bovinos segundo Kaneko et al. (2008).

Nos animais com lesão de pele os resultados evidenciaram aumento bastante acentuado das enzimas hepáticas, especialmente da GGT, discreta alteração nas bilirrubinas e níveis normais dos indicadores da função renal, como pode ser observado na Tabela 2.

Na Tabela 3, são apresentados os valores séricos dos parâmetros de avaliação da função hepática e renal nos animais que apresentavam-se aparentemente normais e pertenciam a propriedade na qual, segundo o proprietário, nunca havia sido observado casos de fotossensibilização (propriedade C).

Tabela 3. Valores séricos de GGT, AST, BD, BI, BT, uréia e creatinina de búfalos clinicamente saudáveis, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens*, município de Inhaúma, Minas Gerais, 2011.

PARÂMETROS (*) / ANIMAIS	GGT U/L (6,1-17,4)	AST U/L (78-132)	BD mg/dL (0,04-0,44)	BI mg/dL (0-0,3)	BT mg/dL (0,01-0,5)	Uréia mg/dL (23-58)	Creatinina mg/dL (1-2)
77	14,80	123,00	0,70	0,62	1,32	36,00	1,45
144	15,20	215,00	0,26	0,23	0,49	36,60	1,30
906	6,70	123,00	0,12	0,15	0,27	63,90	1,39
1523	17,70	254,00	0,67	0,63	1,30	32,00	0,51
1524	14,50	255,00	0,44	0,39	0,83	54,30	1,40
1530	15,90	242,00	0,57	0,46	1,03	44,00	1,20
1532	17,30	217,00	0,06	0,13	0,19	44,80	1,44
1534	12,00	245,00	0,40	0,60	1,00	37,10	1,53
1536	13,60	250,00	0,50	0,70	1,20	40,00	1,00
<b>Média</b>	14,19	213,78	0,41	0,43	0,85	43,19	1,25
<b>Desvio padrão</b>	3,31	53,49	0,23	0,22	0,43	10,14	0,32

(\*)Valores de referência para bovinos segundo Kaneko et al. (2008).

Os níveis de GGT apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade para bovinos (Kaneko et al., 2008), porém os níveis de AST apresentaram-se elevados, observando-se também discreta alteração nos padrões biliares e normalidade dos níveis de uréia e creatinina.

As alterações microscópicas observadas nos fragmentos de biópsia hepática de quatro animais com sinais clínicos consistiram de tumefação hepatocelular difusa de moderada a acentuada, discreta megalocitose, com necrose individual de

hepatócitos e com glóbulos eosinofílicos intracitoplasmáticos. Presença de macrófagos espumosos em dois animais e cristais nos ductos biliares de um animal (Figura 7). A quantidade da saponina esteroidal protodioscina nos piquetes laranjeira e sinil na época do surto foram 3,26 e 3,54% respectivamente. Estes valores estavam bastante elevados em comparação ao piquete pacu, 1,6% da fazenda Inhaúma onde não foi observada a ocorrência de fotossensibilização hepatógena.

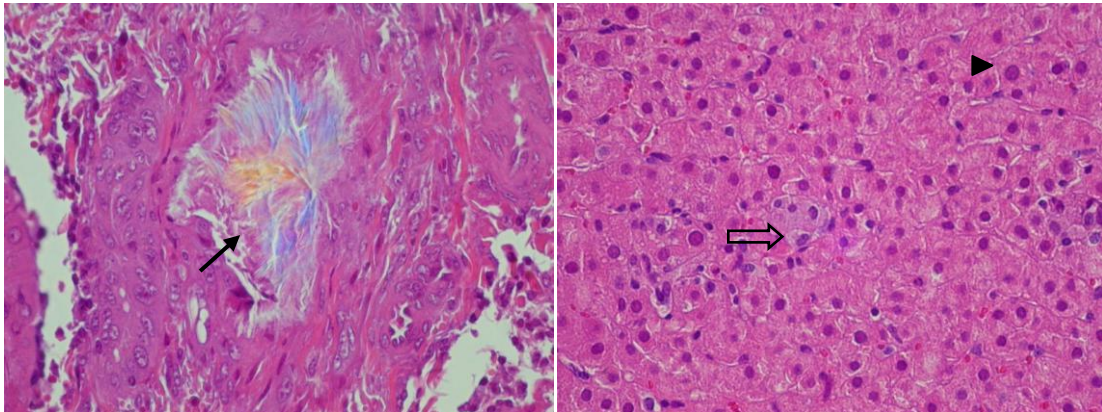


Figura 7. Secção histológica de biópsia hepática de búfalos intoxicados por *B. decumbens*. Presença de cristais em ductos biliares (seta), discreta megalocitose (cabeça de seta), macrófagos espumosos (seta branca) e tumefação hepatocelular moderada. HE, obj. 40x.

Os bubalinos enfermos foram retirados das pastagens onde manifestaram os sinais clínicos de fotossensibilização, permanecendo em curral com sombra, recebendo alimentação a base de cevada durante o dia e durante a noite eram soltos em piquetes de *Brachiaria decumbens*.

Após 15 dias submetidos a este sistema de manejo, os animais apresentaram melhora significativa do quadro clínico geral, onde as lesões de pele apresentavam-se em avançado grau de cicatrização e os sinais de debilidade corporal e apatia estavam diminuídos (Figura 8 e 9).



Figura 8. Bubalino apresentando lesões de pele, fase aguda da intoxicação por *B. decumbens*.



Figura 9. Bubalino da Figura 6, 15 dias após, apresentando lesões de pele em fase de cicatrização

### 6.3 PERFIL BIOQUÍMICO

Para a análise estatística do perfil hepático e renal, os animais sem sinais clínicos (n=8) pertencentes ao surto 01 e os animais com sinais clínicos de ambos os surtos (n=9), foram agrupados no mesmo grupo uma vez que não foi observada diferença estatística entre as médias dos parâmetros bioquímicos entre eles ( $P < 0,05$ ). Este grupo foi nomeado

como animais intoxicados por *Brachiaria decumbens* (n=17) e foram comparados aos animais clinicamente saudáveis criados na propriedade onde não foi observada manifestação da enfermidade (n=9).

A Tabela 4 apresenta os valores médios das variáveis GGT, AST, BD, BI, BT, uréia e creatinina e seus respectivos intervalos de confiança para o grupo de animais

intoxicados (n=17) por *B. decumbens* e o grupo de animais clinicamente sadios (n=9), criados na propriedade onde não foi

observada e/ou relatada a ocorrência de fotossensibilização.

Tabela 4. Intervalo de confiança, valores médios e desvio padrão das variáveis GGT, AST, BD, BI, uréia e creatinina, em animais intoxicados por *B. decumbens* (intoxicados) e animais clinicamente sadios (sadios), Minas Gerais, 2011.

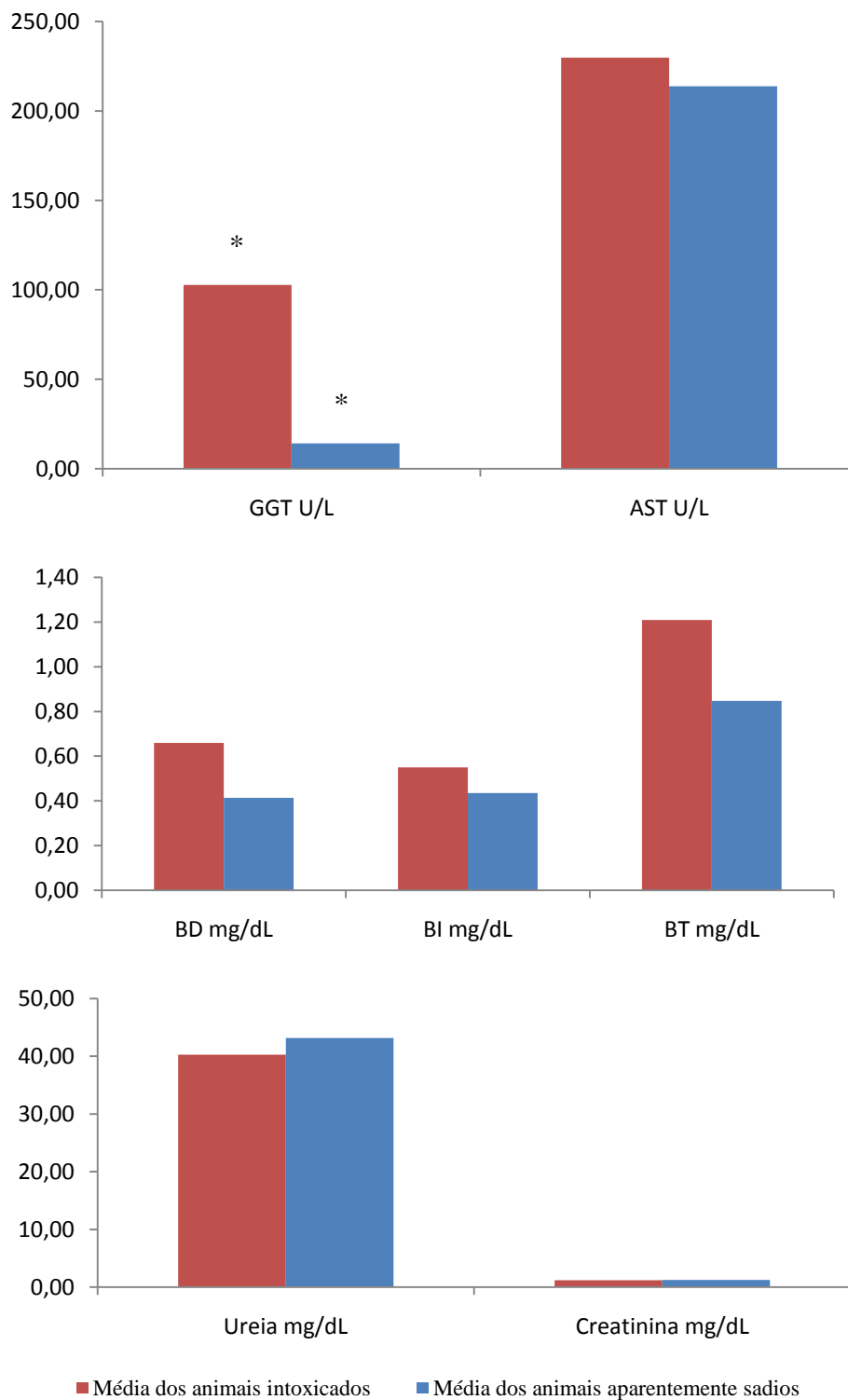
Parâmetros	Grupos	Média	Desvio padrão	Intervalo de confiança
GGT U/L	Intoxicados	102,78*	84,52	59,33 - 146,24
	Sadios	14,19*	3,31	11,64 - 16,73
AST U/L	Intoxicados	229,76	107,85	174,32 - 285,21
	Sadios	213,78	53,49	172,66 - 254,90
BD mg/dL	Intoxicados	0,66	1,07	0,11 - 1,21
	Sadios	0,41	0,23	0,24 - 0,59
BI mg/dL	Intoxicados	0,55	0,62	0,23 - 0,87
	Sadios	0,43	0,22	0,27 - 0,60
BT mg/dL	Intoxicados	1,21	1,62	0,38 - 2,04
	Sadios	0,85	0,43	0,51 - 1,18
Ureia mg/dL	Intoxicados	40,26	21,79	29,05 - 51,46
	Sadios	43,19	10,14	35,39 - 50,39
Creatinina mg/dL	Intoxicados	1,18	0,55	0,90 - 1,47
	Sadios	1,25	0,32	1,00 - 1,49

\*Diferença estatística entre grupos pelo teste de Mann-Whitney ( $P < 0,01$ ).

Para a enzima GGT, os valores séricos foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos avaliados, estando bastante aumentada nos animais intoxicados ( $P < 0,01$ ). Porém, para os demais parâmetros bioquímicos, apesar das

variáveis da função hepática mostrarem-se mais elevados nos animais intoxicados em comparação aos sadios, esta diferença apresentou igualdade estatística ( $P > 0,05$ ), o que pode ser melhor visualizado na figura 10.

Figura 10. Representação gráfica das médias das variáveis da função hepática e renal de búfalos intoxicados ou não por *Brachiaria decumbens*, Minas Gerais, 2011.



\*Diferença estatística entre grupos pelo teste de Mann-Whitney ( $P < 0,01$ ).



#### 6.4 SAPONINAS ESTEROIDAIS NAS PASTAGENS

A curva de calibração para PTD foi linear de 125 a 1000 µg/mL com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0.998 (Figura 11).

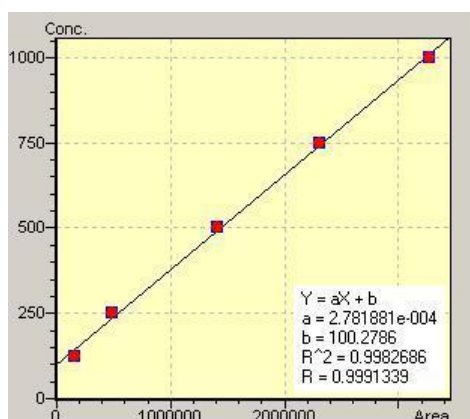


Figura 11. Curva de calibração da saponina protodioscina pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência usando detector de espalhamento de luz evaporativo (CLAE/DELE).

A quantidade de protodioscina nas pastagens de *Brachiaria decumbens* em ambos os surtos de fotossensibilização em bubalinos apresentou valores semelhantes, 3,24% para o piquete Curral no surto 01, 3,26 e 3,54% para os piquetes Laranjeira e Sinil, respectivamente, no surto 02 e no piquete Pacu adotado como comparativo para o segundo surto o nível da saponina na pastagem foi de 1,60% (Tabela 5). A análise da média diária de chuva na região estudada revelou que no ano de 2009 durante o mês de setembro quase não ocorreu a presença de precipitação pluviométrica com média diária de 1,83mm, de forma que uma precipitação

A Figura 12 apresenta o cromatograma em CLAE/DELE da saponina protodioscina.

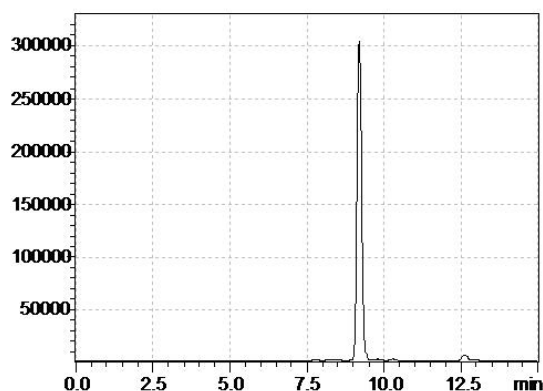


Figura 12. Cromatograma da protodioscina por CLAE/DELE.

bem mais alta foi observada no mês de outubro, 5,69mm, coincidindo com o desenvolvimento dos surtos de fotossensibilização hepática nos bubalinos e níveis aumentados da saponina protodioscina nas pastagens (Figura 13).

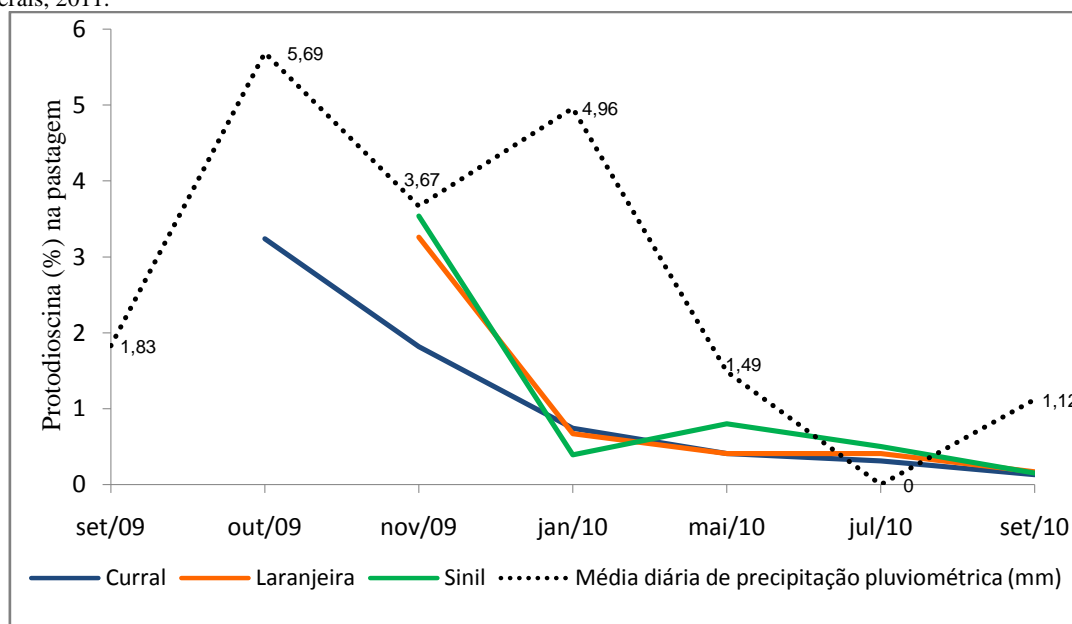
Precipitação pluviométrica teve valores altos até o mês de março do próximo ano (2010), quando então, iniciou-se o período seco. Durante este período, os níveis da saponina em todos os três piquetes avaliados permaneceram baixos (menor do que 0,80%) e também não apresentou elevação durante o período seco compreendido entre os meses de abril a setembro de 2010 (Figura 13).

Tabela 5: Níveis da saponina protodioscina (em %) e características das pastagens (altura em cm, folhas verdes – FV e material senescente - MS) de acordo com as datas de amostragem ao longo de um ano, no município de Fortuna de Minas, Minas Gerais, 2011.

Piquetes	21/10/2009				06/11/2009				26/01/2010			
	Pastagem			Protodioscina	Pastagem			Protodioscina	Pastagem			Protodioscina
	Altura	FV	MS		Altura	FV	MS		Altura	FV	MS	
Curral	25	+++	++	3,24*	25	+++	+	1,82	30	+++	++	0,74
Laranjeira				nd	50	+++	+	3,26**	45	+++	+	0,67
Sinil				nd	50	+++	+	3,54**	40	+++	+	0,39
Pacu				nd	17	+++	+	1,60				nd
Piquetes	25/05/2010				01/07/2010				23/09/2010			
	Pastagem			Protodioscina	Pastagem			Protodioscina	Pastagem			Protodioscina
	Altura	FV	MS		Altura	FV	MS		Altura	FV	MS	
Curral	20	++	++	0,41	25	+	+++	0,31	17	++	+++	0,13
Laranjeira	40	++	++	0,41	40	+	+++	0,41	22	++	+++	0,17
Sinil	45	++	++	0,80	50	++	+++	0,50	25	++	+++	0,15
Pacu				nd				nd				nd

\*Período de ocorrência do surto 01. \*\*Período de ocorrência do surto 02.

Figura 13. Representação gráfica da média diária de precipitação pluviométrica e níveis da saponina protodioscina em três piquetes de *B. decumbens* (curral, laranjeira e sinil) por um período de um ano entre 2009 e 2010, Minas Gerais, 2011.



O teste de correlação de Spearman detectou correlação positiva entre precipitação pluviométrica diária e nível de saponina na pastagem com coeficiente de 0,5893 e nível de significância  $P < 0,05$ .

Em relação às características das pastagens, não foi verificado correlação significativa

entre saponina e altura da pastagem, mas para as demais variáveis a correlação foi detectada, sendo positiva para saponina e quantidade de folhas verdes e negativa para saponina e quantidade de material senescente. A tabela 6 apresenta tais correlações com seus respectivos coeficientes e valores de P.

Tabela 6. Correlação de Spearman para saponina x características das pastagens e precipitação pluviométrica diária de chuva, valores de P e números de pares (n).

Correlação	Coefficiente de Spearman	P	n
Saponina x folhas verdes	0,6727	0,0031*	17
Saponina x material senescente	-0,7020	0,0017**	17
Saponina x altura	0,4515	0,0688 <sup>ns</sup>	17
Saponina x precipitação pluviométrica	0,5893	0,0128*	17

<sup>ns</sup>Não significativo para  $P < 0,05$ . \*Significativo para  $P < 0,01$ . \*\*Significativo para  $P < 0,05$ .

## 7. DISCUSSÃO

A intoxicação por *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. brizantha*, é relatada no Brasil e em outras regiões do mundo afetando bovinos, ovinos, caprinos e equinos (Graydon et al., 1991; Schenk et al., 1991; Smith e Miles, 1993; Meagher et al., 1996; Lemos et al., 1998; Motta et al., 2000; Driemeier et al., 2002; Stegelmeier, 2002).

Nos surtos relatados observou-se fotossensibilização por *B. decumbens* afetando bubalinos, a qual era a única espécie animal presente nas propriedades. Porém o proprietário da fazenda relatou que há sete anos, época em que havia criação de ovinos e caprinos na propriedade, ocorreu surtos de fotossensibilização que afetou grande parte dos animais, principalmente os jovens.

Segundo Lemos et al. (1996), a intoxicação afeta principalmente animais jovens (cordeiros e bezerros). Pode ocorrer em animais lactentes e inclusive, com menos de 30 dias de idade, o que está de acordo com o observado neste estudo, quando a faixa etária dos animais acometidos variou de 3 a 8 meses.

Os sinais clínicos observados em ambos os surtos são semelhantes aos observado em bovinos (Motta et al., 2000; Riet-Correa et al., 2007), porém a icterícia, sinal bastante frequente na fotossensibilização em bovinos, ovinos e caprinos, não foi um achado de grande expressividade nos animais acometidos neste estudo.

Os sinais observados em búfalos que desenvolveram fotossensibilização hepatógena pela intoxicação por cobre (Minervino et al., 2010), foram parecidos aos observados nos bubalinos intoxicados por *B. decumbens*, inclusive em relação a localização das lesões, que foram principalmente observadas nos membros

posteriores, cauda, pescoço e parte dorsal do tronco.

Edema nas orelhas, ao redor dos olhos, na região mandibular, ceratite e cegueira não foi observado nos búfalos com sinais clínicos da intoxicação por *B. decumbens* o que difere do encontrado por Albernaz et al. (2010) em ovinos intoxicados por *B. brizantha* no estado do Pará.

O aumento nos níveis das enzimas hepáticas é descrito em doenças que cursam com lesão hepática (Lemos et al., 1997). Este achado é de grande valor no diagnóstico da lesão hepática em animais intoxicados por gramíneas do gênero *Brachiaria* spp.

Segundo Dirksen et al. (1993), a GGT é uma enzima que apresenta atividade aumentada em doenças hepáticas associadas com colestase, como é observado nos casos de fotossensibilização por *Brachiaria* spp. Comparando a bioquímica sérica dos animais intoxicados e dos animais aparentemente sadios, foi possível verificar o expressivo aumento da enzima GGT, única variável que apresentou diferença estatística entre os dois grupos, sendo então indicada para a avaliação do risco de desenvolvimento de fotossensibilização hepatógena em pastagens de *B. decumbens*.

A GGT está ligada a membrana das células e localiza-se principalmente em canalículos, ductos biliares e em menor grau nos hepatócitos. Níveis elevados no soro durante doenças hepáticas que cursam com colestase, ocorrem devido à solubilização da membrana provocada pelos sais biliares que se acumulam no fígado e ductos (Kaneko et al., 2008)

Já em relação à enzima AST e padrões de bilirrubinas, quando os resultados do grupo de animais intoxicados foram comparados aos do grupo de animais clinicamente sadios não observou-se diferença estatística entre eles, apesar de mostrarem-se mais

elevados no primeiro grupo. Porém quando se compara os resultados aos parâmetros de normalidade para bovinos, ambos os grupos apresentaram-se fora do padrão, o que mostra a necessidade do estabelecimento de parâmetros bioquímicos normais para búfalos criados no sistema de criação brasileiro.

Minervino et al. (2010) citam que a enzima AST nos bubalinos pode apresentar níveis mais elevados em relação a bovinos. Aumento dos níveis séricos de AST não deve ser totalmente associado com lesão hepática, pois a enzima apresenta elevada atividade nos rins, músculos esqueléticos e coração (Kaneko et al., 2008).

Igualdade estatística da bilirrubina total e suas frações entre os grupos estudados pode explicar a ausência de icterícia nos bubalinos intoxicados por *B. decumbens*, contrário ao observado em outros ruminantes (Stannard et al., 1994).

Lesão renal foi observada em ovinos intoxicados por *Brachiaria* spp. (Albernaz et al., 2010), fato não observado nos bubalinos deste estudo, com exceção do animal necropsiado que apresentava-se em estágio avançado da doença e alto grau de desidratação o que pode ter induzido lesão neste órgão.

As lesões histológicas observadas nos fígados dos bubalinos com fotossensibilização hepatógena foram semelhantes às observadas em outros ruminantes, inclusive a presença de estase biliar e cristais nos ductos biliares reafirmam os achados de que a fotossensibilização em animais que ingerem *Brachiaria* spp. está associada com a deposição de material cristalóide nos ductos biliares e colestase (Lemos et al., 1997; Cruz et al., 2000; Meagher et al., 2001; Pires et al., 2002).

Macrófagos espumosos e tumefação hepatoceleular foram observados em

bubalinos sem sinais clínicos de fotossensibilização criados em pastos de *Brachiaria* spp. no estado do Pará (Riet-Correa et al., 2010), o que também foi observado nos bubalinos com sinais clínicos deste estudo. A presença de macrófagos espumosos em fígado, linfonodo e baço de bovinos e bubalinos, mantidos em pastos *Brachiaria* spp. tem sido observada no Brasil, porém ainda não está completamente esclarecida a importância desta lesão na patogênese da fotossensibilização hepatógena (Driemeier et al., 1998; Tokarnia et al. 2000).

Quanto aos níveis de protodioscina nas pastagens foi observado que, durante o período dos surtos, seus níveis encontraram-se aumentados. Enquanto nos demais períodos estes níveis foram menores que 0,80%, no período dos surtos eles variaram de 3,24 a 3,54%. Tal achado confirma a hipótese de que a etiologia da lesão hepática dos casos de fotossensibilização diagnosticados nos animais deste estudo é causada pela ingestão de saponinas esteroidais presentes na gramínea *B. decumbens*.

Brum et al. (2009), analisaram as concentrações de saponinas esteroidais em *B. decumbens* e *B. brizantha* em diferentes fases de desenvolvimento das plantas, verificando que os teores variaram de 0,5 a 2,1 %, estando mais elevados nas plantas mais desenvolvidas, sugerindo que as gramíneas são mais tóxicas durante a maturação da planta. E que surtos de fotossensibilização na região Centro-Oeste, ocorrem em pastagens vedadas por mais de 30 dias. As pastagens envolvidas no segundo surto relatado encontravam-se em descanso por mais de 30 dias e apresentavam plantas em avançado estágio de desenvolvimento.

Os dados de precipitação pluviométrica diários confirmaram as observações do proprietário, que afirmou verificar a

ocorrência da enfermidade no início do período chuvoso, que coincidiu com os níveis aumentados da saponina protodioscina na pastagem. A ocorrência de surtos durante o crescimento das pastagens no início da estação chuvosa também é relatada para outros ruminantes (Riet-Correa et al., 2007).

O conteúdo de saponinas e sapogeninas nos vegetais pode variar de acordo com o local de cultivo, estando relacionado com fatores ambientais, idade e estágio de desenvolvimento da planta (Meagher et al., 1996, Brum et al., 2009). Neste trabalho, apesar de ter sido detectado correlação entre quantidade de chuva, folhas verdes e material senescente, tais variáveis não são suficientes para explicar o aumento dos níveis de saponinas na pastagem. Um estudo mais detalhado, incluindo outras variáveis aliado com avaliações da fisiologia vegetal seria necessário para compreender o comportamento dessas substâncias.

É de conhecimento que as saponinas são produtos do metabolismo secundário das plantas, atuam nos processos de defesa dos vegetais, podendo ser produzida em maior quantidade quando ocorrem situações de estresse, como ataque fúngico e bacteriano, garantindo vantagens para sua sobrevivência no ecossistema a que pertence (Wina et al., 2005; Santos, 2007).

As primeiras chuvas poderiam provocar algum tipo de estresse no capim capaz de provocar o aumento dos níveis das saponinas? A grande quantidade de material senescente acumulado durante o período seco associado a umidade elevada, neste caso provocada pela chuva, é uma condição que favorece o crescimento de fungos no capim, como é relatado para o *P. chartarum* (Lancashire e Keogh, 1968; Alessi et al. 1994).

Por outro lado, surto de fotossensibilização em ovinos no estado do Pará, ocorreu

durante a época menos chuvosa na região e a pastagem (*Brachiaria brizantha*) encontrava-se com massa residual reduzida e senescente (Albernaz et al., 2010). Porém, os níveis das saponinas metilprotodioscina e protodioscina encontrados por estes autores na pastagem (0,92% e 0,88 % durante os surtos) foram semelhantes aos níveis de protodioscina observados na *B. decumbens* deste estudo quando apresentou características semelhantes às observadas por Albernaz et al (2010). Estes dados podem indicar que os bubalinos são mais resistentes do que os ovinos à intoxicação por saponinas.

O acometimento de animais jovens nos surtos estudados nos remete a propor algum mecanismo de adaptação às saponinas presentes no capim, aliado ao relato do proprietário e funcionários das propriedades que afirmam observar a enfermidade somente nesta categoria animal.

É conhecido que as saponinas podem matar ou provocar danos aos protozoários ruminais pela formação de complexos com esteróis da membrana. Porém este efeito é transitório, de forma que o número de protozoários no rúmen de ovinos retornou ao normal após 14 dias de alimentação com *Enterolobium cyclocarpum*, uma planta que também contém saponinas esteroidais [Ivan et al. (2004), citado por Wina et al. (2005)].

Albernaz et al. (2010) verificaram que cordeiros que receberam suco ruminal de ovelhas adultas antes de serem introduzidos em pastagens de *Brachiaria brizantha*, apresentaram menores valores de bioquímica hepática e menor taxa de morbidade para o desenvolvimento de fotossensibilização em comparação com animais controle. Os mecanismos de adaptação dos animais às saponinas esteroidais ainda não são totalmente esclarecidos e merecem melhor investigação.

No primeiro surto descrito, a morbidade observada foi de 6,45% e a mortalidade de 1,61%, no segundo a morbidade foi de 5,75% e a mortalidade de 2,65%. Riet-Correa (2007) e Motta (2000) citam que a morbidade dos surtos em bovinos pode variar de 0,11 a 64% e a mortalidade pode chegar a 14%, o que está de acordo com os achados deste estudo.

O acometimento de poucos animais do lote durante os surtos de fotossensibilização, apesar de estarem expostos às mesmas condições epidemiológicas e ingerindo altas concentrações da saponina protodioscina, demonstra a variação individual de susceptibilidade entre os animais, fato que merece atenção.

Aliado a lesão hepática nos animais sem sinais clínicos durante o surto 01 que foi diagnosticada pela elevação da enzima GGT, demonstra a necessidade de outros fatores para o desenvolvimento da enfermidade. De acordo com o levantado por Robey et al. (2006), a menor expressão dos transportadores ABCG2 nos hepatócitos, associados com a excreção de fitoporfirinas ingeridas na dieta como é o caso da filoeritrina, pode estar envolvido na manifestação dos sinais clínicos.

Estudos imunohistoquímicos examinando a expressão deste transportador no fígado de animais saudáveis e em animais com fotossensibilização pode contribuir para validar esta hipótese.

## 8. CONCLUSÕES

Búfalos jovens são susceptíveis ao desenvolvimento de fotossensibilização hepatógena pela intoxicação por *B. decumbens*.

A mensuração dos níveis séricos da enzima GGT, nas condições estudadas, é suficiente para diagnosticar a presença de lesão hepática em búfalos criados em pastagens de *B. decumbens*.

É necessário a padronização de níveis normais de AST, BD, BI e BT para bubalinos no Brasil.

Lesão renal não foi observada em bubalinos intoxicados por *B. decumbens*.

Na região central de Minas Gerais, o início do período chuvoso corresponde ao período de maior risco para o desenvolvimento de fotossensibilização hepatógena, uma vez que os níveis da saponina protodioscina estão mais elevados.

A saponina protodioscina é responsável pela lesão hepática nos surtos de fotossensibilização em bubalinos e está presente mais em folhas verdes do que em folhas senescente de *B. decumbens*.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albernaz, T. T.; Silveira, J. A. S.; Silva, N. S. et al. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(9):741-748, 2010.

Alessi, A. C.; Fagliari, J. J.; Okuda, H. T. et al. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. 4 – Lesões hepáticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 46(4):319-328, 1994.

Alvares, A. A. A. *Influência da adição de extrato de Yucca schidigera nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de cães adultos consumindo duas rações comerciais*. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Barbosa, J. D.; Oliveira, C. M. C.; Tokarnia, C. H.; et al. Fotossensibilização hepatógena em equinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 26(3):147-153, 2006.

- Bastianetto, E. ; Cunha, A. P. ; Bello, A. C. P. P. et al. Intoxicação de bezerros búfalos por *Lantana* spp.: relato de caso. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 29(2):57-59, 2005.
- Brum, K. B. *Papel das saponinas e do Pithomyces chartarum como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistemas de pastejo*. 2006. 93f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.
- Brum, K.; Haraguchi, M.; Garutti M. B. et al. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. *Ciência Rural* 39(1):279-281, 2009.
- Camargo, W. V. A.; Nazário, W.; Fernandes, N. S. et al. Fotossensibilização em bovinos de corte. Provável participação do fungo *Pithomyces chartarum* na etiologia do processo. *Biológico* 42:259-261, 1976.
- Cruz, C.; Driemeier, D.; Pires, V. S. et al. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Veterinary and Human Toxicology* 42(3):142-145, 2000.
- Dent, C. H. e Rofe, J. C. A condition resembling facial eczema in sheep in New Wales. *Australian Veterinary Journal* 43(2):71, 1967.
- Dirksen, G.; Gründer, H. D.; Stöber, M. *Exame Clínico dos Bovinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1993, 419p.
- Döbereiner, J.; Tokarnia, C. H.; Monteiro, M. C. C. et al. Intoxicação de bovinos e ovinos em pastos de *Brachiaria decumbens* contaminados por *Pithomyces chartarum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* 11(9):87-94, 1976.
- Driemeier, D.; Barros, S. S.; Peixoto, P. V. et al. Estudo histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos (foam cells). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 18(1):29-34, 1998.
- Driemeier, D.; Colodel, E. M.; Seitz, A. L. et al. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. *Toxicon*, 40:1027-1031, 2002.
- Fagliari, J. J.; Passipieri, M.; Kuchembuck, M. R. G. et al. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. II. Aspectos clínicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 45:275-282, 1993.
- Ferraz, F. M. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. In: *Anualpec 2003 – Anuário da Pecuária Brasileira*, 10ª ed., São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2003, p.55-56.
- Flayoen, A.; Hjørth Tønnesen, H.; Grønstøl, H. et al. Failure to induce toxicity in lambs by administering saponins from *Nartheicum assifragum*. *Veterinary Research Communications*. 15:483-487, 1991.
- Ganzera, M.; Bedir, E.; Khan, I.A. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scatterind detection. *Journal of Pharmaceutical Sciencis* 90:1752-1758, 2001.
- Graydon, R. J.; Hamid, H.; Zaha, R. I. P. et al. Photosensitization and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. *Australian Veterinary Journal, Queensland* 68(7): 234-236, 1991.
- Güçlü-Ustündağ, O. E Mazza, G. Saponins: properties, applications and processing.



*Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(3):231-58, 2007.

Gurfinkel, S. e Rao, A. V. Sayasaponins: The relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutrition and Cancer* 47(1):24-33, 2003.

Haraguchi, M.; Cunha, H. A.; Mimaki, Y. et al. Furostanol glicosídicos nas folhas de *Brachiaria decumbens*. In: Annual meeting of the chemical brazilian society, 2003, Águas de Lindoia, *Proceedings...* Águas de Lindoia: Chemical Brazilian Society, 2003, p.66.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br> Acesso em: 02/12/2010.

Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6ª ed. Burlington: Academic Press. 2008, 916p.

Lancashire, J. A. e Keogh, R. G. Facial eczema and grazing management. *Sheepfarming Annual*. 29-35, 1968.

Lemos, R. A. A.; Ferreira, L. C. L.; Silva, S. M. et al. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural* 26:109-113, 1996.

Lemos, R. A. A.; Salvador, S. C.; Nakazato, L. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Veterinary and Human Toxicology* 39:376-377, 1997.

Lemos, R. A. A.; Nakazato, L.; Herrero Jr., G. O. et al. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural* 28:507-510, 1998.

Lemos, R. A. A.; Purisco, E. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena. In: Lemos, R. A. A.; Barros, N.; Brum, K. B. (Org.). *Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte: perguntas e respostas*, Campo Grande: UFMS, 2002. p.147-155.

Lima, F. G. *Ações biológicas das saponinas esteroidais em ruminantes: Revisão de literatura*. 2009, 22f. Seminário apresentado a disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

Luna, L.G. *Manual of histological staining methods of the armed force institute of pathology*. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968. 258p.

Meagher, L. P.; Miles, C. O.; Fagliari, J. J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. *Veterinary and Human Toxicology*, 38(4):271-274, 1996.

Meagher, L. P.; Smith, B. L.; Wilkins, A. L. Metabolism of diosgenin-derived saponins: implications for hepatogenous photosensitization diseases in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91:157-170, 2001.

Melo, M. M., Pinto, C. M.; Bastianetto, E. Buffaloes photosensitization diagnosed in Minas Gerais State. In: Simpósio de Búfalos das Américas, 5; Europe and America's Buffalo Symposium, 4, 2009, Pedro Leopoldo, MG, Brazil. *Anais/Proceedings ...* Belo Horizonte: CBRA, 2009. p.116.

Menna, M. E. e Bailey, J. R. *Pithomyces chartarum* spore counts in pasture. *New*

- Zealand Veterinary Journal of Agricultural Research* 16:343-351, 1973.
- Miles, C. O.; Munday, S. C.; Holland, P. T. et al. Identification of a sapogenin glucoronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. *New Zealand Veterinary Journal*, 39:150-152, 1991.
- Minervino, A. H. H.; Barrêto Júnior, R. A.; Rodrigues, F. A. M. L. et al. Hepatogenous photosensitization associated with liver copper accumulation in buffalos. *Research in Veterinary Science* 88:519-522, 2010.
- Moan, J. e Berg, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology* 53:549-553, 1991.
- Moan, J. e Sommer, S. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHK 3025 cells. *Cancer Research* 45:1608-1610, 1985.
- Motta, A. C.; Rivero, G. R.; Schild, A. L. et al. Fotossensibilização hepatógena em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural* 30(1):143-149, 2000.
- Pires, V. S.; Taketa, A. T. C.; Gosmann, G.; Schenkel, E. P. Saponins and sapogenins from *Brachiaria decumbens* Stapf. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13(2):135-139, 2002.
- Pizarro, A. P. B.; Filho, A. M. O.; Parente, J. P. et al. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32(1):23-29, 1999.
- Quin, J. I.; Rimington, C.; Roets, G. C. S. Studies on the photosensitization of animals in South Africa. VIII. The formation of phylloerythrins in the digestive tracts of various domesticated animals. *Journal of Veterinary Science and Animal Industry* 4:463-471, 1935.
- Richard, J. L. Mycotoxin photosensitivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 163(11):1298-1299, 1973.
- Riet-Correa, B.; Riet-Correa, F.; Oliveira Junior, C. A. et al. Alterações histológicas em fígados e linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(9):705-711, 2010.
- Riet-Correa, F.; Schild, A. L.; Lemos, R. A. A. et al. *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. vol. 2, 3ª ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. 684p.
- Robey, R. W.; Fetshc, P. A.; Polgar, O. et al. The livestock photosensitizer, phytoporphyrin (phylloerythrin), is a substrate of the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Research in Veterinary Science* 81:3545-349, 2006.
- Sampaio, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3ªed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2010, 264p.
- Salam Abdullah, A.; Lajis, N. H.; Bremner, J.B . et al. Hepatotoxic constituents in the rumen of *Brachiaria decumbens* intoxicated sheep. *Veterinary and Human Toxicology* 34(2):154-155, 1992.
- Santos, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. p.323-354.
- Saparg, S. G.; Ligth, M. E.; Van Staden, J. Biological activities and distribution of

- plant saponinas. *Journal of ethnopharmacology* 94:219-243, 2004.
- Schenk, M. A. M.; Nunes, S. G.; Silva, J. M. Ocorrência de fotossensibilização em equinos mantidos em pastagens de *Brachiaria humidicola*. *Comunicado Técnico*, EMBRAPA-CNPQC, Campo Grande, 40:1-4, 1991.
- Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Athayde, M. L. Saponinas. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. p. 711-740.
- Scheie, E.; Flaoyen A.; Moan, J. et al. Phylloeritrin: Mechanisms for cellular uptake and location, photosensitization and spectroscopic evaluation. *New Zealand Veterinary Journal* 50(3):104-110, 2002.
- Smith, B. L. e Miles, C. O. A letter to the editor: a role for *Brachiaria decumbens* in hepato-genous photosensitization of ruminants? *Veterinary and Human Toxicology* 35(3), 1993.
- Smith, B. L. Effects of low dose rates of sporodesmin given orally to sheep. *New Zealand Veterinary Journal* 48:176-181, 2000.
- Stannard, A. A. Moléstias da pele - dermatopatias. In: Smith, B. P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, 1994, v.2, cap.35, p.1061-1117.
- Stegelmeier, B. L. Equine photosensitization. *Clinical Techniques in Equine Practice* 1(2):81-88, 2002.
- Tokarnia, C. H.; Döbereiner, J.; Peixoto, P.V. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320p.
- Tokarnia, C. H.; Döbereiner, J.; Peixoto, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon* 40:1635-1660, 2002.
- Wina, E.; Muetzel, S.; Becker, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant productions: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:8093-8105, 2005.