

Jéssica Baeça Rezende Marinho

IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS TÓXICOS DE *Cestrum axillare* (*Cestrum laevigatum*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Benito Soto-Blanco
Co-orientadora: Marília Martins Melo

M338i Marinho, Jéssica Baeça Rezende, 1990-
Identificação dos princípios tóxicos de *Cestrum axillare* (*Cestrum laevigatum*) / Jéssica
Baeça Rezende Marinho. – 2017.
41 p. : il.

Orientador: Benito Soto-Blanco
Co-orientadora: Marília Martins Melo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

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

CDD – 581.69

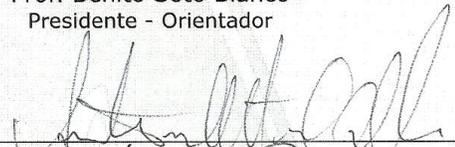
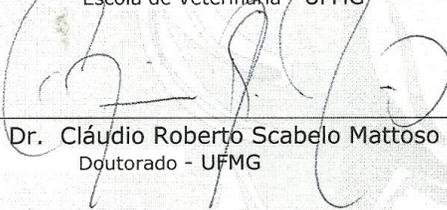
FOLHA DE APROVAÇÃO**JÉSSICA BAEÇA REZENDE MARINHO**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 01 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Benito Soto Blanco
Presidente - Orientador


Prof. Antônio Último de Carvalho
Escola de Veterinária - UFMG
Dr. Cláudio Roberto Scabelo Mattoso
Doutorado - UFMG

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Aos meus amigos pelo companheirismo.

Ao aluno de Iniciação Científica Daniel que nunca mediu esforços para sempre me ajudar.

À escola de Veterinária da UFMG, que me acolheu.

À todos os meus professores da PUC que sempre me apoiaram.

SUMÁRIO

	RESUMO	06
1.	INTRODUÇÃO	08
2.	OBJETIVOS	10
3.	REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1	Plantas tóxicas no Brasil	11
3.2	Plantas hepatotóxicas.....	11
3.3	<i>Cestrum axillare</i>	12
3.4	Sinais clínicos.....	13
3.5	Achados patológicos.....	14
3.6	Diagnóstico.....	15
3.7	Tratamento.....	16
3.8	Princípios tóxicos.....	16
3.9	Saponinas.....	17
3.10	Carboxiatractilosídeos.....	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Material vegetal.....	20
4.2	Extrato de saponinas de <i>C. axillare</i>	20
4.3	Administração das folhas e do extrato de saponinas de <i>C. axillare</i> a caprinos.....	20
4.4	Avaliação clínica e bioquímica sérica.....	21
4.5	Estudo patológico.....	21
4.6	Pesquisa de carboxiatractilosídeo em folhas de <i>C. axillare</i>	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Extrato saponina.....	25
5.2	Efeitos das folhas e do extrato de saponinas de <i>C. axillare</i> a caprinos.....	26
5.3	Avaliação bioquímica sérica.....	27
5.4	Achados patológicos.....	32
5.3	Pesquisa de carboxiatractilosídeos em folhas de <i>C. axillare</i>	35
6.	CONCLUSÕES	38
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência de intoxicação por <i>C. axillare</i> em brotação após administração experimental em bovinos.....	27
Tabela 2	Níveis de AST (U/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1e C2) e folhas (A1 e A2).....	28
Tabela 3	Níveis de GGT (U/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1e C2) e folhas (A1 e A2).....	29
Tabela 4	Níveis de proteínas totais (g/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1e C2) e folhas (A1 e A2).....	30
Tabela 5	Níveis de albumina (g/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1e C2) e folhas (A1 e A2).....	30
Tabela 6	Níveis de colesterol (mg/dL) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1e C2) e folhas (A1 e A2).....	31
Tabela 7	Níveis de glicose (mg/dL) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1e C2) e folhas (A1 e A2).....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Flores, frutos e folhas de <i>Cestrum axillare</i> , no município de Esmeraldas-MG.....	12
Figura 2	Fígado apresentando superfície de corte com aspecto de “noz moscada”. B: Fígado após ser fixado em formol à 10%.....	14
Figura 3	Hemorragias no epicárdio. B: Hemorragias no endocárdio. C: Mucosa da bexiga apresentando áreas de hemorragia.....	15
Figura 4	A: Área centrolobular de necrose hemorrágica confluindo para outras áreas adjacentes de necrose centrolobular. HE, obj 20X. B: Área de necrose hemorrágica centrolobular rodeada por hepatócitos vacuolizados e muitos hepatócitos com glóbulos hialinos no citoplasma (setas). HE, obj 40x.....	15
Figura 5	Estrutura molecular da gitogenina (A) e digitogenina (B).....	17
Figura 6	Estrutura molecular do carboxiatractilosídeo.....	18
Figura 7	Agulha Tru-cut semi-automática.....	22
Figura 8	Posicionamento do animal e local para realização da biópsia hepática percutânea.....	22
Figura 9	Biópsia hepática em caprino guiada por ultrassom modelo Mindray DP 2200 VT com transdutor de 5 MHz.....	23
Figura 10	Cromatograma total do extrato saponinas, tempo de retenção 8,96 (digitogenina).....	25
Figura 11	Gitogenina (massa 433,3318) combinada com fase móvel formando aduto com amônio de massa 466,4253.....	26
Figura 12	Superfície de corte do fígado caprino (A1), mostrando aspecto de noz moscada.....	29
Figura 13	Histopatologia hepática de caprino, que recebeu folhas de <i>C. axillare</i> na dose de 10g/kgPv (A1). A. Necrose nas áreas no entorno da veia centrolubular, vacuolização dos hepatócitos ao redor das áreas de necrose (coloração HE, objetiva de 10x). B. Neutrófilos entre as células necróticas (seta vermelha), picnose (seta verde), diferenciação entre as células necróticas e hepatócitos normais (coloração HE, objetiva de 20x).....	33
Figura 14	Biópsia hepática de caprino que recebeu folhas de <i>C. axillare</i> na dose de 5g/kgPv (A2). A. Necrose centrolubular aguda (coloração HE, objetiva de 10x). B. Vacuolização das células ao redor das áreas de necrose (seta verde), picnose e cariorrexia (seta vermelha) e citoplasma eosinofílico (coloração HE, objetiva de 20x).....	33
Figura 15	Biópsia hepática de caprino que recebeu folhas de <i>C. axillare</i> na dose de 5g/kgPv. Área de necrose centrolubular (seta verde), hepatócitos ainda íntegros (seta azul) e discreta hemorragia (seta vermelha) (coloração HE, objetiva de 40x).....	34
Figura 16	Biópsia hepática de caprino que recebeu folhas de <i>C. axillare</i> na dose de 5g/kgPv, 15 dias após a primeira biospia. A. Hepatócitos da região centrolubular sem alterações (coloração HE, objetiva de 10x). B. Áreas de extravasamento de hemácias (hemorragia) (coloração HE, objetiva de 20x).....	34
Figura 17	Biópsia hepática de caprino que recebeu folhas de <i>C. axillare</i> na dose de 5g/kgPv, 15 dias após a administração. Veia centrolubular sem alteração morfológica, mas com áreas de extravasamento de hemácias.....	34

Figura 18 Espectro de massas (LC-MS/MS), evidenciando a massa molar do carboxiatractilosídeo (769,4023)..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alaninaaminotransferase
AST	Aspartatoaminotransferase
<i>C. axillare</i>	<i>Cestrum axillare</i>
<i>C. laevigatum</i>	<i>Cestrum laevigatum</i>
FA	Fosfatase alcalina
Fig.	Figura
GGT	Gama-glutamiltransferase
HE	Hematoxilina eosina
PV	Peso vivo
SDH	Sorbitol desidrogenase
Tab.	Tabela

RESUMO

Cestrum axillare (anteriormente *C. laevigatum*) família Solanaceae, é a mais importante planta hepatotóxica do Brasil que causa intoxicação aguda. Tem ocorrência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e em áreas litorâneas do Nordeste. A intoxicação natural foi descrita em bovinos, caprinos e ovinos, com sinais clínicos evidenciados em até 24 horas após a ingestão das folhas e morte em até 48 horas após o início da sintomatologia. Os sinais clínicos observados na intoxicação aguda são apatia, anorexia, parada ruminal, dorso arqueado, constipação com fezes em formas de pequenas esferas, por vezes recobertas com muco e com estrias de sangue, tremores musculares, andar cambaleante e, às vezes, sialorreia. Podem ser observados sinais neurológicos, devido a interferência no ciclo da ureia pela insuficiência hepática resultando em hiperamonemia (encefalopatia hepática). O principal achado patológico é a necrose hepática centrolobular. O princípio tóxico presente no *C. axillare* ainda não está definitivamente comprovado, mas alguns autores atribuem a toxicidade da planta à presença das saponinas gitogenina e digitogenina. No entanto, a intoxicação por *C. axillare* é caracterizada por necrose hepática centrolobular, similar às observadas das intoxicações por plantas que contêm os compostos carboxiatractilosídeos, como *Atractylis grummifera*, *Cestrum parqui* e *Xanthium* spp. Desta forma, é necessário determinar se os efeitos tóxicos decorrentes da ingestão das folhas de *C. axillare* são produzidos pelas saponinas ou pelos carboxiatractilosídeos. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar quais são os compostos responsáveis pelos efeitos tóxicos produzidos pela ingestão das folhas de *C. axillare*. Para isto, foram comparados os efeitos da administração das folhas com os produzidos pelas saponinas isoladas destas folhas em caprinos. Posteriormente, foi determinado por meio de cromatografia se as folhas de *C. axillare* contêm o composto carboxiatractilosídeos. Foram utilizados seis caprinos, distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais que receberam [1] folhas secas de *C. axillare*, [2] extrato de saponinas das folhas ou [3] água (grupo controle). Para os caprinos que receberam as folhas secas a dose administrada de planta foi de 10g/kg para um animal (A1) e de 5g/kg para outro (A2). Para os animais que receberam o extrato de saponinas, a administração foi feita na dose equivalente a 20 g/kg, repetida após 24 horas. Foi verificado que as folhas secas, quando administradas na dose de 10 g/kg a um caprino, produziram efeitos tóxicos, com alterações na bioquímica (indicando lesão hepática) e histopatológica apresentando necrose hepática centrolobular. Na dose de 5 g/kg de folhas secas, não foi observado sintomatologia clínica da intoxicação, mas houve necrose hepática; após 15 dias após da última administração, o parênquima hepático deste animal já se encontrava normal, apenas com áreas hemorrágicas, demonstrando plena regeneração. A administração do extrato de saponinas contendo gitogenina e digitogenina a caprinos não produziu efeitos tóxicos significantes, comprovando não serem estes compostos os responsáveis pela intoxicação. O estudo fitoquímico das folhas da planta demonstrou a presença de carboxiatractilosídeos, compostos que são responsáveis pelos mesmos efeitos tóxicos observados na intoxicação por *C. axillare*. Assim, o princípio tóxico responsável pelos casos de intoxicação por *C. axillare* é o carboxiatractilosídeo. Além disto, a espécie caprina é um bom modelo experimental para estudos desta intoxicação.

Palavras-Chave: *Cestrum laevigatum*, plantas tóxicas, plantas hepatotóxicas, necrose hepática, saponinas, carboxiatractilosídeos

ABSTRACT

Cestrum axillare (formerly *C. laevigatum*) family *Solanaceae*, is the most important hepatotoxic plant in Brazil that causes acute poisoning. It occurs in the Southeast and Center-West regions and in coastal areas of the Northeast Brazil. Spontaneous poisoning was described in cattle, goats and sheep, with clinical signs evidenced within 24 hours after ingestion of the leaves and death within 48 hours after signs onset. The clinical signs observed in acute poisoning are apathy, anorexia, ruminal arrest, arched back, constipation with feces in small spheres, sometimes covered with mucus and blood streaks, muscle tremors, staggering gait and sometimes sialorrhoea. Neurological signs may be observed, due to interference in the urea cycle due to hepatic insufficiency resulting in hyperammonemia (hepatic encephalopathy). The main pathological finding is centrilobular hepatic necrosis. The toxic principle present in *C. axillare* was not yet definitively proven, but some authors attribute the toxicity of the plant to the presence of saponins gitogenin and digitogenin. However, *C. axillare* poisoning is characterized by centrilobular hepatic necrosis, similar to those observed in plants poisoning containing carboxyatractyloside compounds, such as *Atractylis grummifera*, *Cestrum parqui* and *Xantium* spp. Therefore, it is necessary to determine if the toxic effects resulting from the ingestion of the *C. axillare* leaves are produced by saponins or carboxyatractylosides. Thus, the objective of this work was to determine which are the compounds responsible for the toxic effects produced by the ingestion of the leaves of *C. axillare*. For this, the effects of the administration of the leaves were compared with those produced by the saponins isolated from the leaves in goats. Subsequently, it was determined by chromatography whether the leaves of *C. axillare* contain carboxyatractylosides. Six goats were randomly assigned to three experimental groups that received [1] dry leaves of *C. axillare*, [2] saponins extract from leaves or [3] water (control group). For goats receiving the dry leaves the administered dose of plant was 10 g/kg for one animal (A1) and 5 g/kg for the other one (A2). For animals receiving the saponins extract, administration was done at a dose equivalent to 20 g/kg repeated after 24 hours. The dry leaves administered at a dose of 10 g/kg to a goat produced toxic effects, with alterations in biochemistry (indicating hepatic lesion) and histopathology showing centrilobular hepatic necrosis. At the dose of 5 g/kg of dry leaves, clinical signs of poisoning were not observed, but hepatic necrosis was found; after 15 days after the last administration, the hepatic parenchyma of this animal was already normal, with only hemorrhagic areas, demonstrating full regeneration. The administration of extracts of saponins containing gitogenin and digitogenin to goats did not produce significant toxic effects, proving that these compounds are not responsible for intoxication. The phytochemical study of the leaves of the plant demonstrated the presence of carboxyatractylosides, compounds that are responsible for the same toxic effects observed in *C. axillare* poisoning. Thus, the toxic principle responsible for cases of *C. axillare* poisoning is carboxyatractyloside. In addition, goats are a good experimental model for studies of this intoxication.

Keywords: *Cestrum laevigatum*, poisonous plants, hepatotoxic plants, hepatic necrosis, saponins, carboxyatractyloside.

1. INTRODUÇÃO

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

Em um estudo retrospectivo, o Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período de 1996-2005, as intoxicações por plantas representaram 7,58% (43/567) das mortes de bovinos, 11,46% (25/218) de ovinos e 7,69% (16/208) de caprinos. Das mortes dos bovinos, 62,79% foram atribuídas à lesão hepática crônica (Pedroso *et al.*, 2007). O gênero *Cestrum* é o terceiro maior da família Solanaceae, com ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. Essas plantas são popularmente chamadas de “coeranea”, “mata boi”, “pimenteira”, “dama da noite” e “canema”. As plantas deste gênero são responsáveis por causar necrose hepática aguda em ruminantes (Tokarnia *et al.*, 2012).

Cestrum axillare, anteriormente *C. laevigatum*, é a mais importante planta hepatotóxica do Brasil que causa intoxicação aguda. Tem ocorrência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e em áreas litorâneas do Nordeste. Bovinos, caprinos e ovinos se intoxicam naturalmente devido a longos períodos de escassez de forragem, já que as folhas não possuem boa palatabilidade. Os sinais clínicos da intoxicação são evidenciados em até 24 horas após a ingestão das folhas e a morte ocorre em até 48 horas após o início da sintomatologia (Tokarnia *et al.*, 2002)

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

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

O princípio tóxico presente no *C. axillare* ainda não está definitivamente comprovado, mas alguns autores atribuem a toxicidade da planta à presença das saponinas gitogenina e digitogenina (Canham, 1950; Tokarnia *et al.*, 2012). Em animais de produção, as saponinas podem interferir com o crescimento, o ganho de peso, na ingestão de alimentos e a reprodução (Cheeke, 1996). Algumas saponinas, como por exemplo as presentes no pericarpo dos frutos do *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril, timbaúva, orelha-de-macaco), podem promover efeito hepatotóxico caracterizado por necrose hepatocelular difusa (Gadelha *et al.*, 2015). No entanto, a intoxicação por *C. axillare* é caracterizada por necrose hepática centrolobular, similar às observadas das intoxicações por plantas que contém os compostos carboxiatractilosídeos, como *Atractylis grummifera*, *Cestrum parqui* e *Xantium* spp (Cole *et al.*, 1989).

Desta forma, é necessário determinar se os efeitos tóxicos decorrentes da ingestão das folhas de *C. axillare* são produzidos pelas saponinas ou pelos carboxiatractilosídeos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é determinar quais são os compostos responsáveis pelos efeitos tóxicos produzidos pela ingestão das folhas de *Cestrum axillare* (*C. laevigatum*).

2.2. Objetivos específicos

- Comparar os efeitos da administração das folhas de *C. axillare* com os produzidos pelas saponinas isoladas destas folhas em caprinos.
- Determinar o conteúdo e perfil cromatográfico das saponinas isoladas das folhas de *C. axillare*.
- Determinar se as folhas de *C. axillare* contêm o composto carboxiatractilosídeos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas tóxicas no Brasil

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

A ingestão de plantas tóxicas representa uma importante fonte de prejuízos econômicos para a produção animal. No Brasil, de uma população de 221.827.299 bovinos, pelo menos 5% (11.091.365) morre anualmente por diferentes causas e do total de mortes estima-se que entre 7,4% e 15,83% (entre 820.761 e 1.755.763 bovinos) sejam causadas por plantas tóxicas (Pessoa *et al.*, 2013). O consumo dessas plantas por animais domésticos é determinado por diversos fatores que incluem palatabilidade, carência de forragens, fome, longos períodos de privação hídrica e introdução de animais (mantidos em locais onde não ocorre a planta) em pastagens desconhecidas, planta em brotação após as primeiras chuvas, acesso às plantas tóxicas, período de ingestão, variações de toxicidade, susceptibilidade/resistência, transporte (Pedroso *et al.*, 2007; Tokarnia *et al.*, 2012; Pessoa *et al.*, 2013).

3.2. Plantas hepatotóxicas

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

A insuficiência hepática ocorre somente em lesões difusas, com comprometimento de pelo menos 75% do parênquima hepático. Os principais sinais clínicos causados pela insuficiência hepática são icterícia, edema, hemorragias, fotossensibilização e encefalopatia hepática. Outros sinais clínicos da insuficiência hepática aguda incluem sinais de dor (como escoicear o abdômen, gemidos, dorso arqueado), constipação com fezes ressecadas ocasionalmente recobertas por muco e estrias de sangue, e hipotonia ou atonia ruminal (Santos *et al.*, 2008)

3.3. *Cestrum axillare*

A família Solanaceae está incluída na subclasse Asteridae, ordem Solanales. Compreende cerca de 3.000 espécies e 90 gêneros de ampla distribuição, principalmente em regiões tropicais e sub tropicais da América do Sul. O gênero *Cestrum* pode ser encontrado como arbusto ou árvore (Silva *et al.*, 2003).

C. axillare (Fig. 1), anteriormente *C. laevigatum*, é a mais importante planta hepatotóxica do Brasil que causa intoxicação aguda (Tokarnia *et al.*, 2002). A descoberta da toxidez dessa planta, que é originária das Américas, se deu quando a planta foi introduzida na África do Sul, onde foi utilizada como cerca viva em fazendas, sendo responsável por uma doença de bovinos denominada “Chase Valley Disease”, que ocorria no vale do rio Chase (Tokarnia *et al.*, 2012).



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

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

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

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

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

3.4. Sinais clínicos

Em bovinos, os primeiros sinais clínicos da intoxicação aguda são observados 15 a 24 horas após a ingestão da planta, e a morte ocorre entre 6 e 48 horas após o aparecimento das primeiras manifestações clínicas (Tokarnia *et al.*, 2012). Coutinho *et al.* (2013) descreveram um surto de intoxicação natural na região Agreste de Pernambuco afetando oito bovinos leiteiros, dos quais quatro vieram a óbito, com evolução de 12 a 48 horas após o início da sintomatologia clínica. Os sinais clínicos observados na intoxicação aguda são apatia, anorexia, parada ruminal, dorso arqueado, constipação com fezes em formas de pequenas esferas, por vezes recobertas com muco e com estrias de sangue, tremores musculares, andar cambaleante e, às vezes, sialorreia (Tokarnia *et al.*, 2012). Sinais nervosos como excitação e agressividade são interpretados como manifestação da encefalopatia hepática, síndrome provocada por falha no processo de síntese hepática da ureia resultando em hiperamonemia, responsável por degeneração esponjosa no sistema nervoso central (Santos *et al.*, 2008; Tokarnia *et al.*, 2012). Além disto, a intoxicação por *C. axillare* induz hipoglicemia, que contribui para a sintomatologia nervosa (Tokarnia *et al.*, 2012).

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

3.5. Achados patológicos

Os achados de necropsia em bovinos que morrem pela intoxicação aguda são bastante característicos. A lesão mais importante está localizada no fígado, cuja superfície de corte apresenta aspecto de noz moscada (Fig. 2). A parede da vesícula biliar apresenta edema, há ressecamento do conteúdo do omaso e do intestino grosso que aparece em forma de esferas envoltas por muco sanguinolento (Tokarnia *et al.*, 2012). Há hemorragias muito variáveis em quantidade e extensão, em diversos órgãos e tecidos, especialmente, no epi- e endocárdio, mas também tecido conjuntivo subcutâneo, intermuscular, peritrapeal, nas mucosas da vesícula biliar e do intestino delgado (Tokarnia *et al.*, 2012). Coutinho *et al.* (2013) encontraram áreas hemorrágicas no coração, abomaso, baço, bexiga e intestino delgado e grosso (Fig. 3). Em bubalinos, Marques (2010) observou fígado de cor alaranjada com aspecto de noz moscada, leve edema na parede da vesícula biliar, mucosa do abomaso levemente avermelhada e endocárdio do ventrículo esquerdo com equimoses extensas.

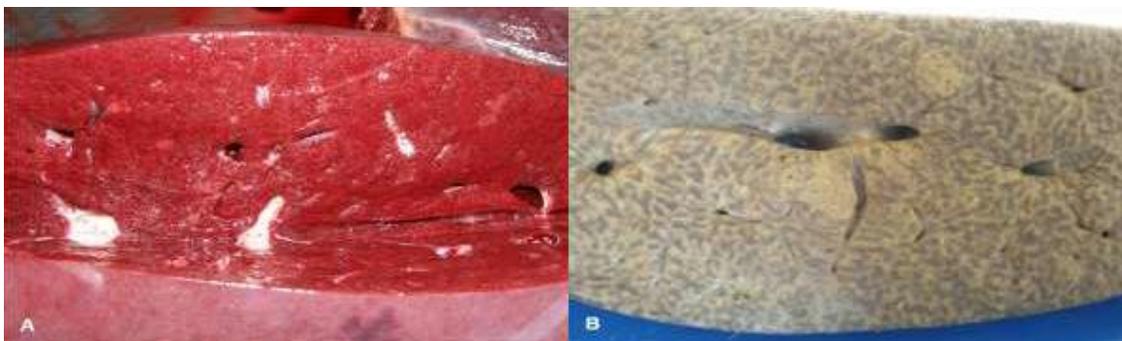


Figura 2: Fígado apresentando superfície de corte com aspecto de “noz moscada”. **B**: Fígado após ser fixado em formol à 10% (Coutinho *et al.*, 2013).

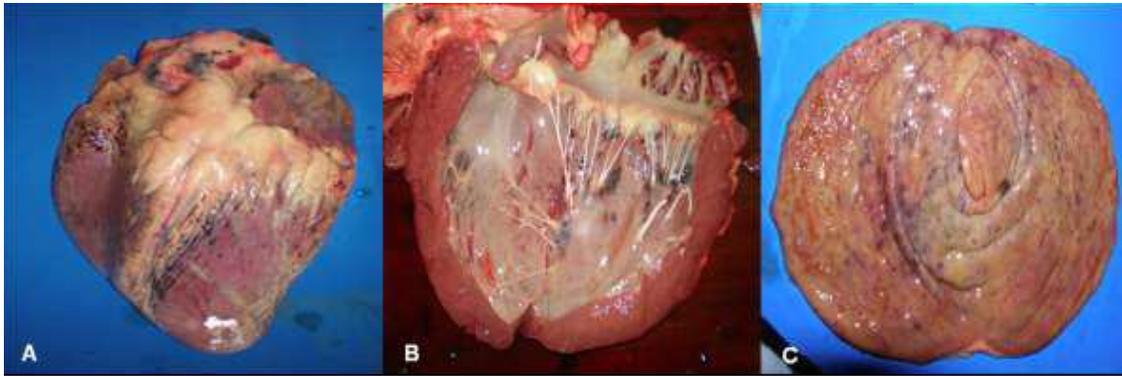


Figura 3: Hemorragias no epicárdio. **B**: Hemorragias no endocárdio. **C**: Mucosa da bexiga apresentando áreas de hemorragia (Coutinho *et al.*, 2013).

Os exames histológicos revelam como lesão mais constante e significativa a acentuada necrose centrolobular com numerosas figuras de picnose e cariorrexia, acompanhada por congestão e hemorragia (Fig. 4), e esteatose das células hepáticas na periferia do lóbulo (Brito *et al.*, 2010; Tokarnia *et al.*, 2012; Coutinho *et al.*, 2013).

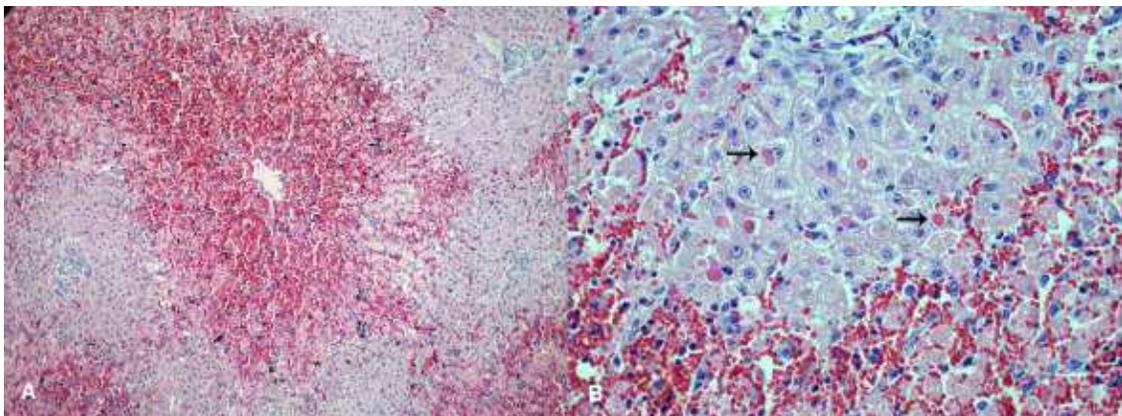


Figura 4: **A**: Área centrolobular de necrose hemorrágica confluindo para outras áreas adjacentes de necrose centrolobular. HE, obj 20X. **B**: Área de necrose hemorrágica centrolobular rodeada por hepatócitos vacuolizados e muitos hepatócitos com glóbulos hialinos no citoplasma (setas). HE, obj 40x. (Coutinho *et al.*, 2013).

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

3.6. Diagnóstico

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

A avaliação bioquímica sérica pode auxiliar no diagnóstico da intoxicação em animais vivos. Para avaliar a função hepática, não é indicada a mensuração de apenas uma enzima ou metabólito sérico, pois existe interdependência do fígado com outros órgãos. Os testes de função hepática incluem aqueles que medem o transporte (secreção, conjugação e excreção) tais como bilirrubina e ácidos biliares, a atividade enzimática no soro para detectar necrose, colestase e carcinomas, e os bioquímicos que avaliam a capacidade hepática de metabolização de nutrientes como carboidratos e proteínas. Há várias enzimas intracelulares que se encontram em grandes concentrações nos hepatócitos, e nos casos de elevadas atividades séricas é possível que esteja ocorrendo uma doença hepática ativa (Santos *et al.*, 2008; Marques, 2010; Coutinho *et al.*, 2013).

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

3.7. Tratamento

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

3.8. Princípios tóxicos

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

3.9. Saponinas

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

Em animais de produção, as saponinas podem interferir com o crescimento, o ganho de peso, a ingestão de alimentos e a reprodução (Cheeke, 1996). Algumas saponinas, como por exemplo as presentes no pericarpo dos frutos do *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril, timbaúva, orelha-de-macaco), podem promover efeito hepatotóxico caracterizado por necrose hepatocelular difusa (Gadelha *et al.*, 2015).

Canham e Warrem (1950) encontraram as saponinas denominadas gitogenina e digitogenina (Fig. 5) nos frutos de *C. axillare*. Cuartas e Castano (2008) observaram as saponinas gitogenina e digitogenina nas folhas, frutos, talo e flores de *Cestrum nocturnum* (dama da noite).

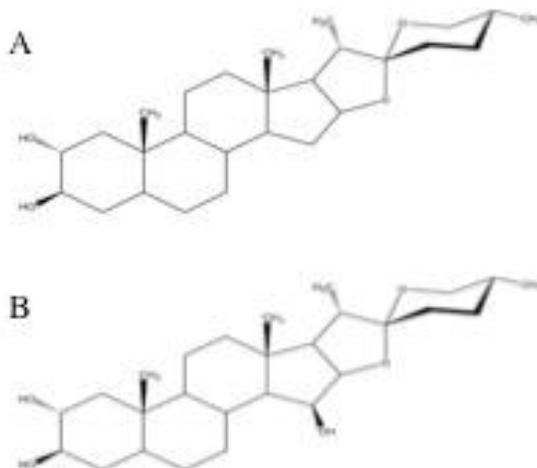


Figura 5. Estrutura molecular da gitogenina (A) e digitogenina (B).

3.10. Carboxiatractilosídeos

Carboxiatractilosídeos (Fig. 6) são glicosídeos diterpenóides produzidos por diversas espécies de plantas, como *Atractylis grummifera*, *Cestrum parqui* e *Xanthium* spp. Os frutos da planta *Xanthium* spp. são responsáveis por intoxicações em bovinos em vários países, incluindo EUA, Argentina e Brasil (Carlier *et al.*, 2014). Os carboxiatractilosídeos inibem a translocação da adenina nucleotídeo que transporta o ADP na membrana mitocondrial, inibindo dessa forma a síntese de ATP, essa inibição da fosforilação oxidativa resulta em um menor aporte de energia para célula, o que induz a morte celular programada (Botha *et al.*, 2014). O transporte de vários metabólitos (nucleotídeos, fosfatos, piruvato, oxoglutarato entre outros) através da membrana mitocondrial é essencial para o metabolismo eucariótico (Pebay-Peyroula, 2003). Os sinais clínicos da intoxicação em bovinos, caprinos e ovinos são agudos e consistem de apatia, anorexia, parada dos movimentos ruminais, dores abdominais, tenesmo retal com discreto prolapso de reto, sudorese, desidratação progressiva com retração dos globos oculares e sinais nervosos caracterizados por incoordenação motora, tremores musculares generalizados e agressividade (Cole *et al.*, 1989; Driemeier *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2008).

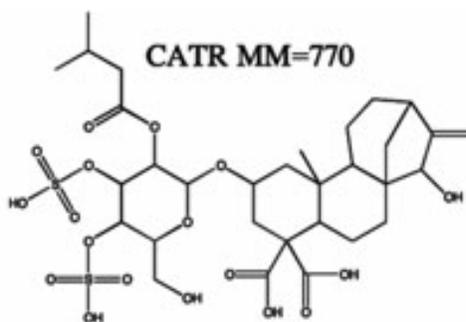


Figura 6. Estrutura molecular do carboxiatractilosídeo. Fonte: Carlier *et al.* (2014).

Cole *et al.* (1989) relatam que os carboxiatractilosídeos induzem hipoglicemia em ratos, coelhos e cães. Da mesma forma, um estudo conduzido em humanos naturalmente intoxicados por *Xanthium strumarium*, revelou uma hiperglicemia nas primeiras horas após a intoxicação e em seguida acentuada hipoglicemia persistente (Turgut *et al.*, 2005). Outro efeito destes compostos é a hepatotoxicidade, caracterizada por aumento nas atividades séricas das enzimas SDH, AST e GGT associada à necrose hepática centrolubular observada

microscopicamente (Cole *et al.*, 1989). Além disto, em bovinos intoxicados espontaneamente por *Xanthium cavanillesii* (planta que contém carboxiatractilosídeo) observaram acentuada necrose coagulativa hepatocelular centro lobular acompanhada de congestão e hemorragia (Driemeier *et al.*, 1999).

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

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

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Foram colhidas folhas de *C. axillare*, na região de Esmeraldas, MG, em propriedade com histórico de intoxicações de bovinos por essa planta. Um exemplar da planta foi depositado no herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Departamento de Botânica -UFMG, sob o código BHCB 182694. As folhas coletadas foram secas em estufa a 50°C por 48 horas e então trituradas em liquidificador.

4.2. Extrato de saponinas de *C. axillare*

Foram utilizados 2kg de folhas secas de *C. axillare* para extração alcoólica das saponinas. As folhas foram submetidas a extração com álcool absoluto por uma semana e o sobrenadante filtrado e armazenado, o procedimento foi repetido por 3 vezes. Todo o sobrenadante foi misturado e o solvente evaporado em sistema de rotavapor a 60 °C sob pressão reduzida. O resíduo etanólico foi dissolvido em água, filtrado e extraído exaustivamente com butanol em funil de separação. A porção butanólica foi evaporada em sistema de rotavapor a 60 °C. O resíduo butanólico obtido foi solubilizado em água, extraído com hexano e a porção aquosa residual foi novamente submetida ao sistema rotavapor para remoção dos resíduos de hexano. A concentração final de saponinas foi quantificada por meio da técnica espectrofotométrica descrita por Vigo *et al.* (2003), utilizando “Saponin from quillajabark” (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) como padrão.

A identificação das saponinas foi realizada através da cromatografia, utilizando LC-MS/MS. A coluna utilizada foi a C18 da Waters, com 150 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e partículas de 3,5mm. A análise foi realizada em modo positivo, temperatura na fonte de 150°C, energia capilar 4kv, sampling cone 40, temperatura do gás de solvatação 500°C, source off set 80, fluxo do gás 50L/h, fluxo do gás de dessolvatação 1000L/h, varredura do espectro a cada 0,5 segundos e intervalo de massa de 100 a 1200 dáltons. A fase móvel é constituída de acetato de amônio 10mM em água (10:90) e acetato de amônio em metanol (50/50).

4.3. Administração das folhas e do extrato de saponinas de *C. axillare* a caprinos

O experimento foi conduzido no galpão de Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária-UFMG. Foram utilizados seis caprinos, sem raça definida, de 4 meses a 6 meses de idade e peso de 18 a 41kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais que receberam [1] folhas secas de *C. axillare*, [2] extrato de saponinas das folhas de *C. axillare* e [3] água (grupo controle). Os caprinos foram submetidos a jejum de 8 horas previamente ao início do experimento.

Para os caprinos que receberam as folhas secas a dose administrada de planta foi de 10g/kg para um animal (A1) e de 5g/kg para outro (A2). A planta triturada foi misturada a água e administrada aos animais via sonda oro-gástrica, em dose única.

Para os animais que receberam o extrato de saponinas obtido segundo o item 4.2 a administração foi feita por meio de sonda oro-gástrica, com concentração equivalente a 20 g de folhas secas/kg de peso vivo. Após 24 horas da primeira administração do extrato, o extrato foi novamente administrado na mesma dosagem e forma de administração.

Os animais do grupo controle receberam apenas água por meio de sonda oro-gástrica com repetição da administração após 24 horas da administração inicial.

4.4. Avaliação clínica e bioquímica sérica

Após a administração, os animais foram monitorados por meio de exames físicos para avaliação de alterações comportamentais, frequências cardíaca e respiratória, dos movimentos ruminais, da temperatura retal, da coloração das mucosas e do tempo de preenchimento capilar. A avaliação foi realizada antes da administração

do extrato (T0) e após 3 horas (T3), 6 horas (T6), 12 horas (T12), 24 horas (T24), 27 horas (T27), 30 horas (T30) e 48 horas (T48).

Foram coletadas amostras de sangue por meio de punção da veia jugular usando vacutainer, em tubos sem anticoagulante para determinações bioquímicas séricas. As coletas foram realizadas antes da administração do extrato (T0) e após 3 horas (T3), 6 horas (T6), 12 horas (T12), 24 horas (T24), 27 horas (T27), 30 horas (T30) e 48 horas (T48). Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 6.000 rpm por 6 minutos para a separação do soro, o soro foi colocado em microtubos e então refrigerado a -20°C . A avaliação bioquímica sérica consistiu na determinação das atividades de aspartatoaminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (GGT) e das concentrações de proteínas totais, albumina, glicose e colesterol. As determinações bioquímicas foram realizadas utilizando kits comerciais específicos (Bioclin, Belo Horizonte, MG) e um analisador bioquímico (Cobas Mira Plus).

4.5. Estudo patológico

Nos animais que não vieram a óbito em 48 horas após a primeira administração foi realizada a coleta de fragmentos do fígado por meio de biópsia hepática percutânea guiada por ultrassonografia conforme descrito por Néspoli *et al.* (2013). Nos dois animais que receberam as folhas e sobreviveram, foi realizada a biópsia hepática 15 dias após o último procedimento.

O instrumental cirúrgico e as agulhas de biópsia percutânea foram submetidos a desinfecção com solução de glutaraldeído a 2% por 15 minutos e lavados com solução fisiológica estéril. Após jejum alimentar de 24 horas, os animais foram anestesiados usando cloridrato de xilazina 2% (0,1mg/kg), por via intramuscular. Os animais foram mantidos em decúbito lateral esquerdo, para que fossem realizadas a tricotomia e assepsia do local da cirurgia. No local da biópsia foi realizado bloqueio anestésico utilizando lidocaína 2% (3ml). A agulha (Tru-cut semi-automática) (Fig.7), foi introduzida através de uma pequena incisão de pele no 11^o espaço intercostal direito no ponto de interseção com uma linha paralela a coluna vertebral, que partia da extremidade da tuberosidade ilíaca (Fig.8 e 9).O aparelho de ultrassom utilizado para guiar a biópsia foi o modelo Minday DP2200 VT, com transdutor convexo com frequência de 5 mHz e profundidade da imagem de 8,4cm em modo B. Os fragmentos de fígado coletados foram fixados em formalina a 10%, e posteriormente, processados rotineiramente para histologia e corados pela técnica de hematoxilina-eosina.



Figura 7. Agulha Tru-cut semi-automática. Fonte: arquivo pessoal

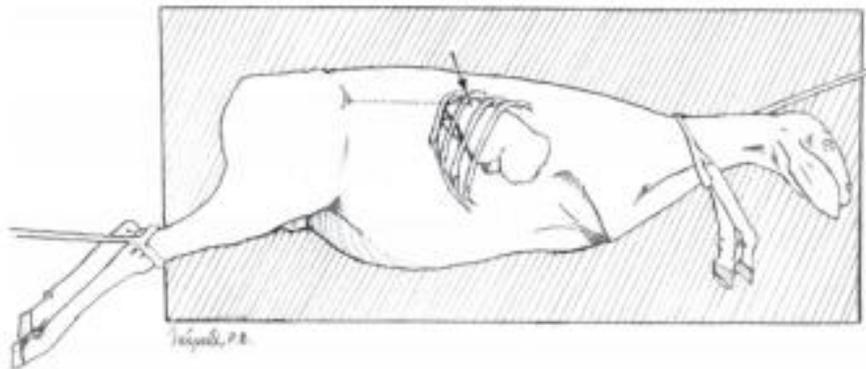


Figura 8. Posicionamento do animal e local para realização da biópsia hepática percutânea (seta). Fonte: Néspoli *et al.* (2010).



Figura 9. Biópsia hepática em caprino guiada por aparelho de ultrassonografia modelo Mindray DP 2200 VT com transdutor de 5 mHz. Fonte: arquivo pessoal.

No animal que veio a óbito, foi realizada a necropsia para observação macroscópica das alterações e coleta de fragmentos de fígado, rins, pulmões e coração para estudo microscópico. Os fragmentos foram fixados em formalina a 10%, e posteriormente, processados rotineiramente para histologia por parafinação e corados pela técnica de hematoxilina-eosina.

4.6. Pesquisa de carboxiatractilosídeos em folhas de *C. axillare*

A extração de carboxiatractilosídeo foi realizada segundo a metodologia proposta por Carlier *et al.* (2014). As amostras das plantas secas foram pulverizadas, e 50 mg foram misturados com 5,0 ml de solução de acetonitrila e água (50:50, v/v). A mistura foi colocada em banho sonicator por uma hora, e depois foi centrifugada (10 minutos a 3.000 g). O sobrenadante foi seco em banho-maria a 50 °C e reconstituído com 100 µl de solução de acetonitrila e tampão acetato (10:90, v/v).

Outra extração foi feita misturando 1000ml de acetona com 100g da planta triturada e filtrado em seguida. O resíduo foi passado duas vezes em solução acetona/água 9:1 e submetido a rotavapor a 60°C. Em seguida, foram adicionados 200ml de clorofórmio e 20g de cloreto de potássio e, então, a solução foi mantida a -20°C por 48 horas. Após este período, o extrato foi filtrado a vácuo e o precipitado acumulado no filtro foi ressuspenso adicionando álcool a 85% e novamente filtrado a vácuo. Ao precipitado, foram adicionados 50ml de hexano, a solução foi filtrada e ao precipitado adicionou 10ml de metanol (Botha *et al.*, 2014).

A confirmação da presença de carboxiatractilosídeo nas amostras foi feita por meio de espectrometria de massas usando sistema LC-MS/MS (Waters Xevo G2-S QToF). Para a espectrometria de massas, as condições cromatográficas foram otimizadas e validadas a partir das técnicas descritas por Steenkamp *et al.* (2004) e Steenkamp *et al.* (2006). Os extratos foram submetidos em infusão direta (ressuspensão em acetonitrila) ao LC-MS/MS, usando coluna C18 da Waters, com 150 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e partículas de 3,5µm. A análise foi realizada em modo negativo, temperatura na fonte de 150°C, energia capilar 4kV, sampling cone 40, temperatura do gás de solvatação 500°C, source off set 80, fluxo do gás 50L/h, fluxo do gás de solvatação 1000L/h.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extrato saponina

Nas folhas utilizadas de *C. axillare*, foi verificado que a concentração de saponinas totais nas folhas foi de $13,5 \pm 2,0\%$. A concentração de saponinas nos extratos administrados aos animais neste estudo foi de 6,17 mg/ml.

Canham e Warrem (1950) realizaram extração alcoólica das saponinas a partir dos frutos verdes de *C. axillare*, e encontrou os compostos denominados digitogenina e gitogenina. Alguns autores consideram estas saponinas como as responsáveis pelos quadros de intoxicação pela planta (Tokarnia *et al.*, 2012). Assim, no presente estudo foi feito um extrato de saponinas das folhas de *C. axillare* para verificar sua toxicidade em caprinos. A quantificação das saponinas no extrato foi realizada segundo a técnica descrita por Vigo *et al.* (2003), que utilizaram a raiz da planta *Pfaffia glomerata* (ginseng brasileiro) para validar a técnica de quantificação espectrofotométrica das saponinas após extração hidroalcoólica seguida por fracionamento com butanol.

Por meio de cromatografia LC-MS/MS, foi identificada a presença das saponinas gitogenina e digitogenina. A digitogenina foi encontrada em um tempo de retenção de 8,96 minutos e a massa 449,32 (Fig.10). Já a gitogenina foi identificada por meio da infusão direta com massa de 433,33. Além disto, a gitogenina combinada com a fase móvel (acetato de amônio) formou um aduto com a amônio, de massa 466,36 que foi mais abundante que a gitogenina em sua forma monovalente (Fig. 11). Evans (1974) identificou as saponinas de espécies diversas da planta *Digitalis* através da espectrometria de massas de alta resolução, foi observado gitogenina e digitogenina com massas iguais as encontradas neste estudo.

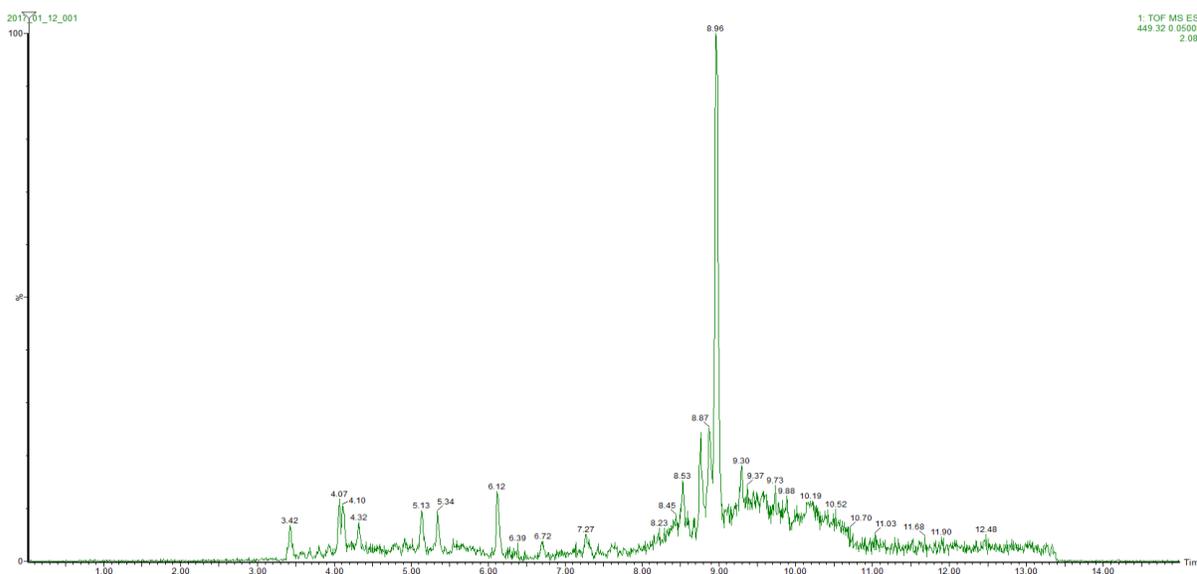


Figura 10. Cromatograma total do extrato saponinas, tempo de retenção 8,96 (digitogenina).

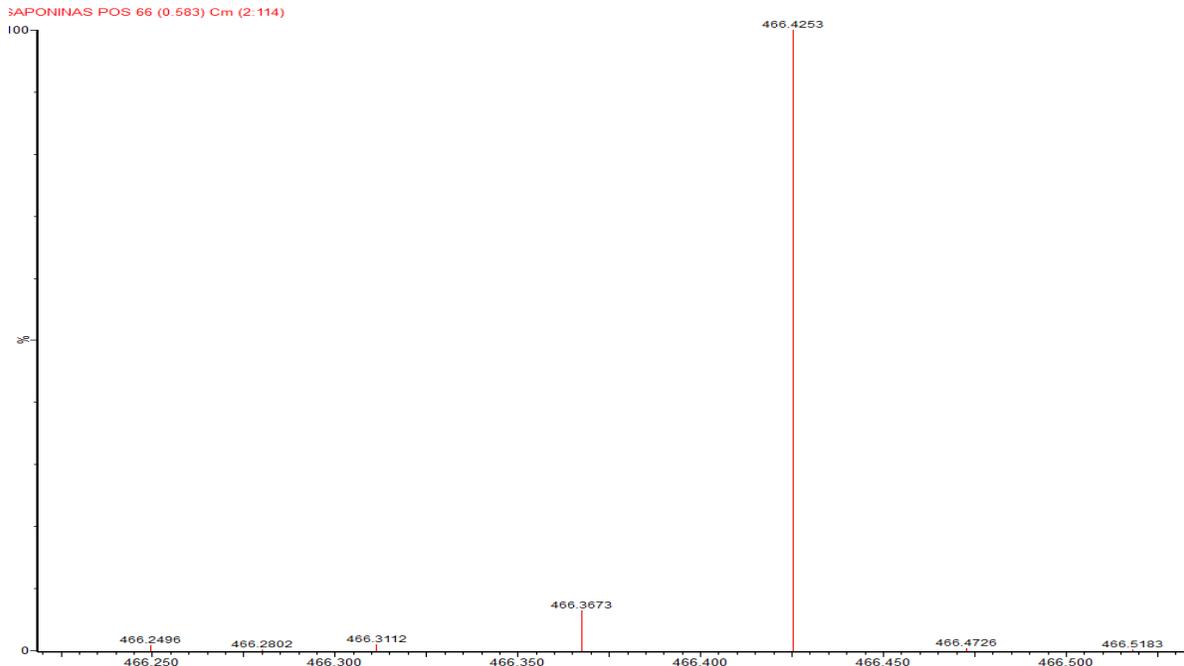


Figura 11. Gitogenina combinada com fase móvel formando aduto com amônio de massa 466,4253.

Os efeitos biológicos da saponina incluem: irritação de mucosas, déficit de crescimento e ganho de peso, inibição enzimática, efeitos na ingestão e palatabilidade do alimento, absorção de alimentos, efeitos no metabolismo de colesterol e bile, efeitos na microbiologia e metabolismo rumenal e fotossensibilização secundária (Cheeke, 1996). No presente estudo, os animais receberam 1,5425g de saponina em cada administração do extrato e não apresentaram sintomatologia clínica da intoxicação.

5.2. Efeitos das folhas e do extrato de saponinas de *C. axillare* a caprinos

O caprino que recebeu as folhas de *C. axillare* trituradas na dose de 10g/Kg (A1), apresentou alterações ao exame físico 3 horas após a administração. O animal se encontrava apático, cabeça pendular, ausência de movimentos ruminais, mucosas congestionadas e aumento da frequência respiratória (100 a 120 movimentos por minuto). Após 6 horas, o animal se encontrava em decúbito esternal, extremamente apático, desidratado e mucosas congestionadas. Doze horas após a administração da planta, o animal apresentava decúbito lateral, ausência dos reflexos corneano e palpebral, opistótono, hipotermia, redução da sensibilidade cutânea, movimentos de pedalagem e inconsciência, culminando em morte.

Em bovinos os primeiros sinais clínicos, da intoxicação aguda, são observados 15 a 24 horas após a ingestão da planta, e a morte ocorre entre 6 e 48 horas após o aparecimento das primeiras manifestações (Dobereiner *et al.*, 1969; Tokarnia *et al.*, 2012). Em um surto da intoxicação natural por *C. axillare* em período de seca, no agreste de Pernambuco, a taxa de morbidade foi de 13,3% do rebanho. Sendo que dos oito animais doentes 4 vieram a óbito com evolução de 12 a 48 horas após o início dos sintomas clínicos (Coutinho *et al.*, 2013). Marques (2010) administrou a búfalos a dose de 40g/kg de planta fresca, e observou os primeiros sinais clínicos da intoxicação 23h40min após o início da administração da planta. Neste estudo a evolução da intoxicação foi extremamente rápida, comparada aos dados da literatura.

As alterações clínicas observadas neste estudo são similares às encontrados por Brito *et al.* (2010), que relataram um caso de intoxicação natural em caprino, que apresentou cansaço, dificuldade de manter em estação, andar cambaleante, decúbito lateral e morte. Os sinais clínicos mais evidentes descritos em bovinos foram tremores musculares, opistótono, apatia, moderada desidratação, comprometimento em número e intensidade da atividade retículo-ruminal, fezes em pouca quantidade, ressecadas e com muco (Dobereiner *et al.*, 1969; Van Der Lugt *et al.*, 1991; Coutinho *et al.*, 2013). No trabalho de Barbosa *et al.* (2010), os búfalos intoxicados experimentalmente apresentaram apatia, anorexia, diminuição ou ausência dos movimentos

ruminais, sialorreia, dificuldade na inspiração, andar cambaleante, excitação, agressividade, constipação, fezes recobertas por muco e estrias de sangue, decúbito lateral, movimentos de pedalagem e então evoluíram para morte. Estes mesmos sinais clínicos foram observados em ovinos (Van Der Lugt *et al.*, 1992).

Em nosso estudo, o animal que recebeu a planta na dose de 5g/kg de folhas secas (A2) e os animais que receberam o extrato saponinas em concentração equivalente a 20 g/kg de folhas secas não apresentaram sinais clínicos da intoxicação. Dobereiner *et al.* (1969) administraram diferentes doses de folhas frescas a bovinos e estabeleceu uma relação entre a quantidade ingerida e o grau de intoxicação, conforme a Tabela 1. Assim, a planta fresca foi tóxica para bovinos a partir da dose de 10 g/kg. Considerando que as folhas perdem cerca de 50% de seu peso com a secagem, a toxicidade das folhas em caprinos parece ser similar à dos bovinos. Por outro lado, apesar da relativa elevada dose equivalente de folhas, o extrato de saponinas não resultou em alterações clínicas, indicando não ser estas o princípio tóxico da planta. Este estudo é o primeiro a administrar o extrato de saponinas a partir das folhas de *Cestrum axillare*.

Tabela 1. Frequência de intoxicação por *C. axillare* em brotação após administração experimental em bovinos. Fonte: Dobereiner *et al.* (1969).

Quantidade administrada		Peso dos animais kg	Número de bovinos	Ausência de sinais clínicos (%)	Somente sinais clínicos de intoxicação (%)	Mortos pela intoxicação (%)
g/kg	kg					
3,9-8,4	0,4-1,0	60-130	5	100	0	0
10,5-24,4a	0,9-2,2	70-140	9	66,7	11,1	22,2
25,0-50,0	2,0-4,5	80-110	10	10	10	80

a. A quantidade mínima que causou a morte foi de 10,5g/kg; a quantidade máxima que não causou sinais de intoxicação foi de 24,4g/kg (2200g/90kg)

5.3. Avaliação bioquímica sérica

A avaliação bioquímica sérica dos caprinos no presente estudo consistiu na determinação das atividades de AST e GGT e das concentrações de proteínas totais, albumina, glicose e colesterol. Com relação à atividade sérica de AST, após a administração das folhas (A1 e A2), as atividades desta enzima aumentaram gradativamente, sendo que no tempo final de cada animal o aumento foi muito considerável (Tab. 2). Os valores de AST em todos os animais, mesmo no tempo zero, estão abaixo dos níveis relatados por Kaneko *et al.* (2008). Silva *et al.* (2004) estudou os níveis de AST em 355 caprinos saudáveis da raça Saanen, na faixa de idade de 91 a 180 dias o valor médio foi de 87,08±26,41 U/L. Valores similares também foram encontrados por Duarte (2007) em caprinos saudáveis e sem raça definida. Assim, podemos considerar que a atividade sérica de AST em caprinos saudáveis chega a até 114 U/L.

Tabela 2. Níveis de AST (U/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas (A1 e A2).

	S1	S2	C1	C2	A1	A2
T0	108,9	124,27	62,25	61,14	87,35	107,12
T3	133,26	65,18	65,11	68,64	113,97	102,19
T6	132,45	65,18	61,42	69,44	133,67	91,6
T12	136,2	76,07	61,17	67,28	3431,62	111,28
T24	129,83	77,51	59,95	67,67		79,43
T27	123,98	73,78	63,23	68,52		97,405
T30	130,71	80,65	64,47	67,77		140,09
T48	113,95	70,52	60,51	63,04		1321,49

Valores de referência segundo Kaneko *et al.* (2008): 167-513 U/L. Silva *et al.* (2004): 87,08±26,41 U/L.

A AST é uma enzima intracelular e se encontra em grande quantidade nos hepatócitos. O aumento das atividades séricas de AST é observado em injúrias reversíveis e irreversíveis aos hepatócitos e podem ser vistas como injúria hepatocelular ou colestase. No entanto, essa enzima também pode estar elevada na circulação sanguínea em casos de lesão muscular (Tennant e Center, 2008). Em um surto natural de bovinos no estado de Pernambuco, todos os animais apresentaram aumento de AST mais de duas vezes em relação aos valores de referência (Coutinho *et al.*, 2013). Mesmos resultados foram relatados experimentalmente na África do Sul em bovinos (Van Der Lugt *et al.*, 1991) e em ovinos (Van Der Lugt *et al.*, 1992). Em bubalinos após intoxicação experimental, o valor sérico desta enzima passou de 148,5 U/L para 379,16 U/L. Neste estudo, o aumento foi de 39 vezes no A1 em relação ao tempo 0 e no A2 o aumento foi de 12 vezes em relação ao tempo 0.

As atividades séricas de GGT apresentaram alteração apenas 48 horas após a administração das folhas de *C. axillare* nos animais A1 e A2 (Tab. 3), enquanto nos demais animais as atividades se mantiveram dentro da faixa de normalidade (Kaneko *et al.*, 2008). Este mesmo resultado foi encontrado em estudos experimentais com bovinos (Van Der Lugt *et al.*, 1991) e ovinos (Van Der Lugt *et al.*, 1992). Coutinho *et al.* (2013) acompanharam um surto de intoxicação natural em bovinos leiteiros e encontraram valores dessa enzima extremamente aumentados (269,32±127,60). Em bubalinos, o valor aumentou de 16,33 U/L no tempo zero para 128,3 U/L após a ingestão da planta (Barbosa *et al.*, 2010). A GGT é considerada um marcador primário para doenças hepatobiliares que são associadas a colestase, sendo encontrada no fígado (membranas canaliculares e do conduto biliar), rim (túbulos renais), pâncreas e intestino. Possui maior atividade no fígado de bovinos, equinos, ovinos e caprinos (Tennant e Center, 2008).

Tabela 3. Níveis de GGT (U/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas (A1 e A2).

	S1	S2	C1	C2	A1	A2
T0	53,63	60,14	30,32	36,28	38,71	35,2
T3	69,32	47,61	32,03	39,77	39,3	35,25
T6	68,04	48,68	29,33	39,73	45,7	31,51
T12	66,05	51,55	29,04	39,25	63,45	34,26
T24	62,6	51,29	29,86	39,19		28,25
T27	64,98	51,14	30,79	39,12		29,68
T30	64,01	52,75	32,6	38,06		38,63
T48	57,65	45,2	24,71	35,93		112,65

Valores de referência segundo Kaneko *et al.* (2008): 20-56 U/L

Na dosagem de proteínas totais (Tab. 4), não foi observada diferença entre os grupos controle e saponinas. Já no grupo que recebeu as folhas, houve um aumento principalmente no A1, que veio a óbito 12 horas após a administração das folhas. Coutinho *et al.* (2013) encontraram elevação nos níveis de proteínas totais, nos animais intoxicados por *C. axillare*. A elevação dos níveis de proteínas totais neste estudo provavelmente é devido a desidratação (Eckersall, 2008).

Tabela 4. Níveis de proteínas totais (g/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas (A1 e A2).

	S1	S2	C1	C2	A1	A2
T0	5,78	5,54	5,16	5,02	6,33	6,47
T3	6,05	5,38	5,62	5,39	7,18	6,44
T6	5,95	5,42	5,51	5,41	7,69	5,86
T12	5,57	5,38	5,28	5,34	9,66	6,53
T24	5,47	5,53	5,29	5,37		5,26
T27	5,76	5,55	5,53	5,57		5,31
T30	5,7	5,63	5,64	5,3		6,99
T48	5,46	5,02	5,64	5,31		5,99

Valores de referência segundo Kaneko *et al.* (2008): 6,4-7,0 g/L. Pinheiro *et al.* (2008): 6,57±1,44 g/L. Birgel (1969): 5,78±0,504 g/L.

A dosagem de albumina neste estudo esteve dentro dos valores de referência nos grupos controle e saponina e no animal A2 que recebeu as folhas na dose de 5 g/kg. O animal A1, a partir de 3 horas após a administração da planta, apresentou aumento nos teores de albumina (Tab. 5). A concentração plasmática da albumina é determinada pela taxa de síntese hepática (único órgão que a produz) em equilíbrio com a degradação (Kaneko *et al.*, 2008). Coutinho *et al.* (2013) encontraram em seu estudo 3 animais com hipoalbuminemia e somente um animal com hiperalbuminemia. De acordo com Eckersall (2008), a hipoalbuminemia pode ser causada pela deficiência na síntese de albumina associada a doença hepatocelular ou aumento da perda por glomerulopatia, inflamação intestinal severa ou linfangiectasia intestinal. Já a hiperalbuminemia neste estudo é provavelmente devido a desidratação.

Tabela 5. Níveis de albumina (g/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas (A1 e A2).

	S1	S2	C1	C2	A1	A2
T0	3,11	3,34	3,1	3,08	3,54	3,3
T3	3,71	2,6	3,2	3,27	3,96	3,32
T6	3,58	2,67	3,14	3,27	4,7	2,99
T12	3,44	2,71	3,1	3,26	5,32	3,4
T24	3,37	2,73	3,08	3,27		2,83
T27	3,43	2,74	3,23	3,25		2,9
T30	3,37	2,79	3,24	3,22		3,52
T48	3,12	2,55	3,14	3,15		3,16

Valores de referência segundo Kaneko *et al.* (2008): 2,7-3,9 g/L. Birgel (1969): 2,49±0,515 g/L. Pinheiro *et al.* (2008): 2,94±0,58 g/L

Os níveis séricos de colesterol não apresentaram alterações em todos os animais (Tab. 6). A hipercolesterolemia pode ser causada pela dieta ou também por insuficiência hepática. Como o colesterol é eliminado na forma de ácidos biliares, o aumento da sua concentração no plasma pode estar associado com obstrução biliar extra-hepática, fibrose hepática e hiperplasia de ductos biliares (Araújo e Pacífico da Silva, 2008; Kaneko *et al.*, 2008). O colesterol pode ser usado como indicador direto do balanço energético em ruminantes, assim como triglicerídeos, β -hidroxibutirato e ácidos graxos não esterificados (Fernandes *et al.*, 2012).

Tabela 6. Níveis de colesterol (mg/dL) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas (A1 e A2).

	S1	S2	C1	C2	A1	A2
T0	103,21	107,8	53,9	54,97	72,47	61,9
T3	118,15	46,96	57,53	59,02	66,71	61,9
T6	108,01	44,4	56,03	58,06	68,52	54,11
T12	102,67	44,93	57,42	58,81	68,52	62,65
T24	99,26	53,9	58,38	58,7		57,95
T27	103,1	53,9	62,01	59,02		59,55
T30	102,35	54,22	63,4	59,66		75,35
T48	100,65	50,27	67,67	65,96		62,76

Valores de referência segundo Kaneko *et al.* (2008): 80-130 mg/dL. Araújo e Pacífico da Silva (2008): 91,7±25,1 mg/dL.

Os níveis séricos de glicose estão apresentados na Tabela 7. O animal A1 apresentou um aumento da glicemia 3 e 6 horas após a administração da planta, enquanto 12 horas houve severa hipoglicemia. Em 24 horas após a primeira administração houve hiperglicemia em todos os grupos, que pode ser atribuída à alimentação. Essa hiperglicemia inicial com posterior hipoglicemia severa observada no A1, também é descrita por Cole *et al.* (1989) em animais que ingeriram plantas que continham como princípio tóxico o carboxiatractilosídeo. Mesmo efeito também foi relatado por Turgut *et al.* (2005) em humanos intoxicados após a ingestão do chá da planta *Xantium strumarium*, que também possui como princípio tóxico carboxiatractilosídeos.

Tabela 7. Níveis de glicose (mg/dL) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas (A1 e A2).

	S1	S2	C1	C2	A1	A2
T0	74,99	69,79	78,37	71,84	78,92	87,18
T3	73,1	78,21	82,31	83,01	149,58	86
T6	78,61	83,56	84,27	88,76	103,55	77,35
T12	77,98	88,52	80,97	84,12	0,39	78,69
T24	72	84,98	83,25	75,46		63,74
T27	64,76	73,81	82,15	71,76		68,77
T30	64,84	85,06	84,27	73,26		82,7
T48	65,07	72,94	70,97	63,5		84,04

Valores de referência segundo Kaneko *et al.* (2008): 50-75 mg/dL

5.4. Achados patológicos

Na necropsia do animal A1, foram observados fígado apresentando aspecto de noz moscada ao corte (Fig. 13) e presença da planta no rúmen, retículo, omaso, abomaso e duodeno; os demais órgãos se encontravam macroscopicamente sem alterações dignas de nota. Ao exame histológico do fígado, foi verificado que os hepatócitos da região centrolobular apresentavam citoplasma intensamente eosinofílico, com núcleos picnóticos ou fragmentados (necrose centrolobular). Na região mediazonal, foram observados hepatócitos contendo microvacúolos intracitoplasmáticos bem delimitados (degeneração) e infiltrado neutrofílico moderado (Fig. 14). Os demais órgãos se apresentaram histologicamente normais. Já, na biopsia hepática do animal A2, foram observados hepatócitos da região centrolobular com citoplasma intensamente eosinofílico, com núcleos picnóticos ou fragmentados (necrose centrolobular). Na região mediazonal, observou-se hepatócitos contendo microvacúolos intracitoplasmáticos bem delimitados (degeneração), infiltrado

neutrófilico moderado e discreta hemorragia (Fig. 15 e 16). Após 15 dias da administração das folhas, foi realizada outra biopsia hepática e o animal já se encontrava sem alterações na morfologia das células hepáticas, sendo somente encontrado pequenas áreas de extravasamento de hemácias (hemorragia) (Fig. 17 e 18). Os demais animais submetidos à biopsia hepática não apresentaram alterações dignas de nota.



Figura 12. Superfície de corte do fígado caprino (A1), mostrando aspecto de noz moscada.

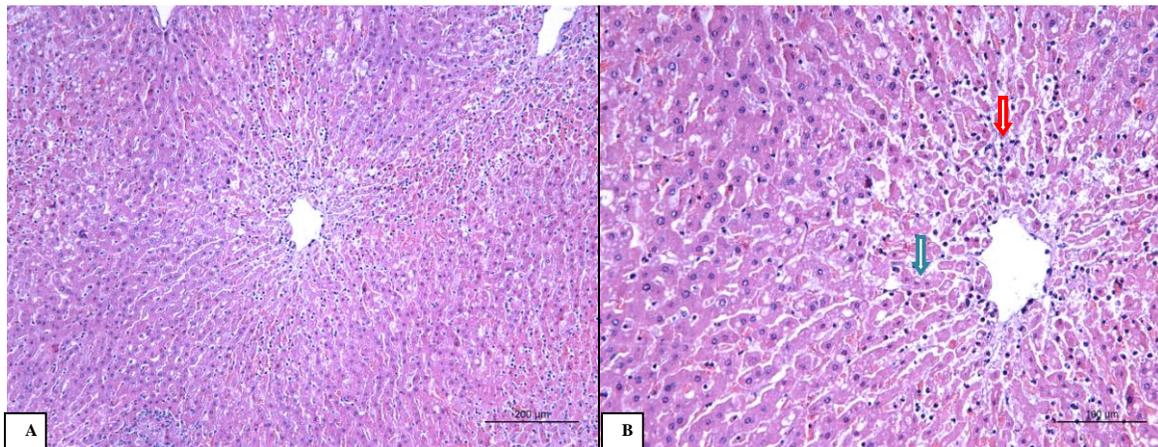


Figura 13. Histopatologia hepática de caprino, que recebeu folhas de *C. axillare* na dose de 10g/kgPv (A1). **A.** Necrose nas áreas no entorno da veia centrolubular, vacuolização dos hepatócitos ao redor das áreas de necrose (coloração HE, objetiva de 10x). **B.** Neutrófilos entre as células necróticas (seta vermelha), picnose (seta verde), diferenciação entre as células necróticas e hepatócitos normais (coloração HE, objetiva de 20x).

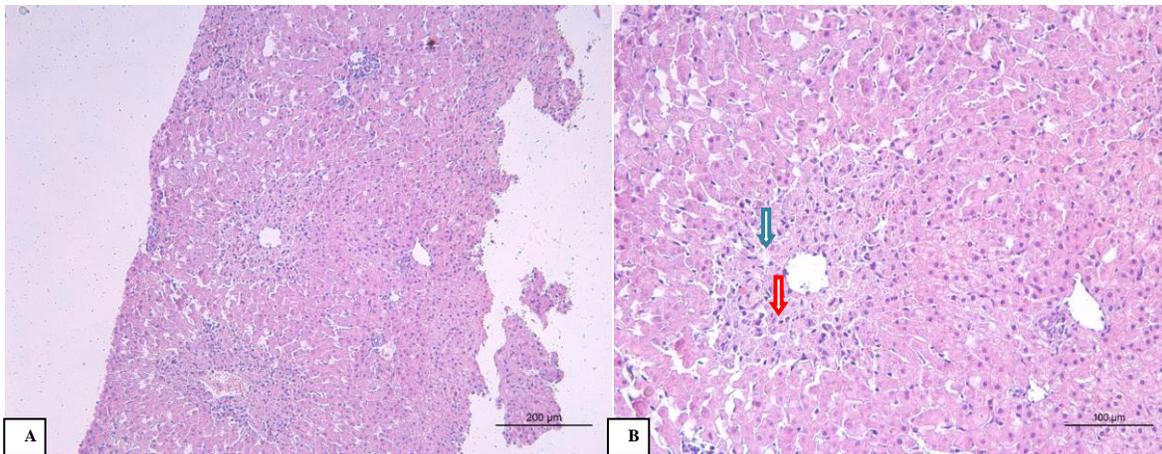


Figura 14. Biopsia hepática de caprino que recebeu folhas de *C. axillare* na dose de 5g/kgPv (A2). **A.** Necrose centrolobular aguda (coloração HE, objetiva de 10x). **B.** Vacuolização das células ao redor das áreas de necrose (seta verde), picnose e cariorrexis (seta vermelha) e citoplasma eosinofílico (coloração HE, objetiva de 20x).

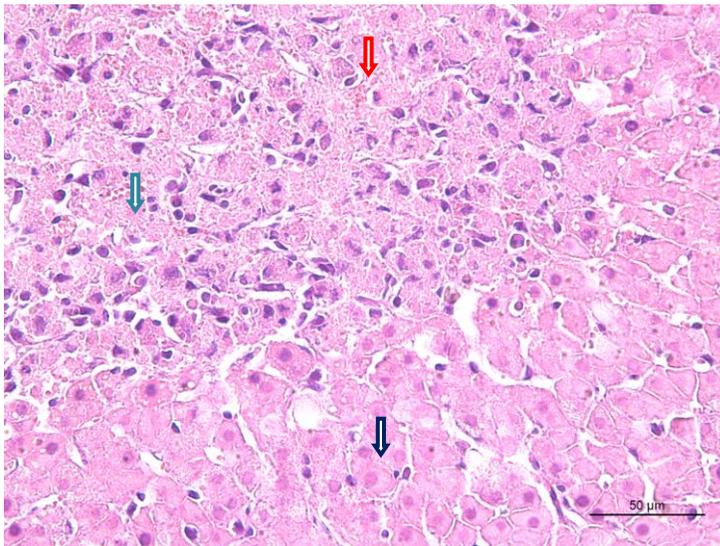


Figura 15. Biopsia hepática de caprino que recebeu folhas de *C. axillare* na dose de 5g/kgPv. Área de necrose centrolobular (seta verde), hepatócitos ainda íntegros (seta azul) e discreta hemorragia (seta vermelha) (coloração HE, objetiva de 40x).

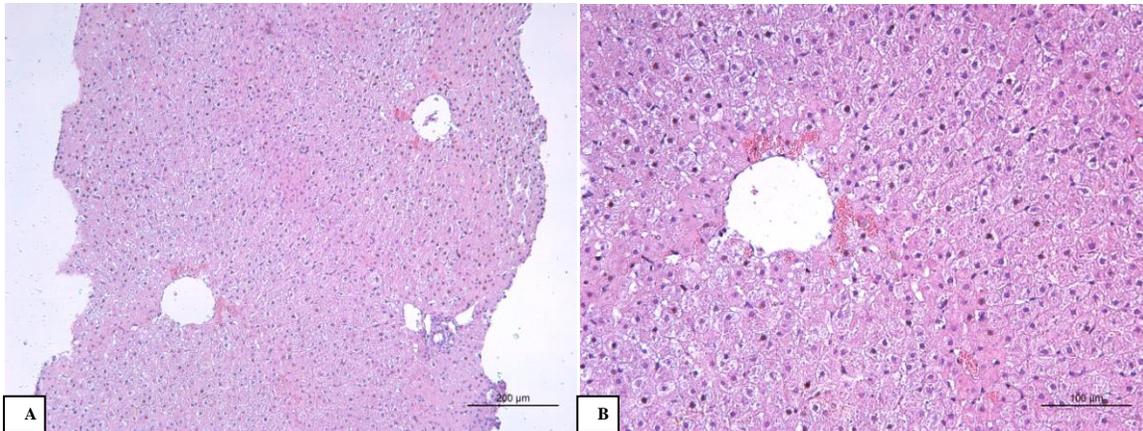


Figura 16. Biópsia hepática de caprino que recebeu folhas de *C. axillare* na dose de 5g/kgPv, 15 dias após a primeira biópsia. **A.** Hepatócitos da região centrolobular sem alterações (coloração HE, objetiva de 10x). **B.** Áreas de extravasamento de hemácias (hemorragia) (coloração HE, objetiva de 20x).

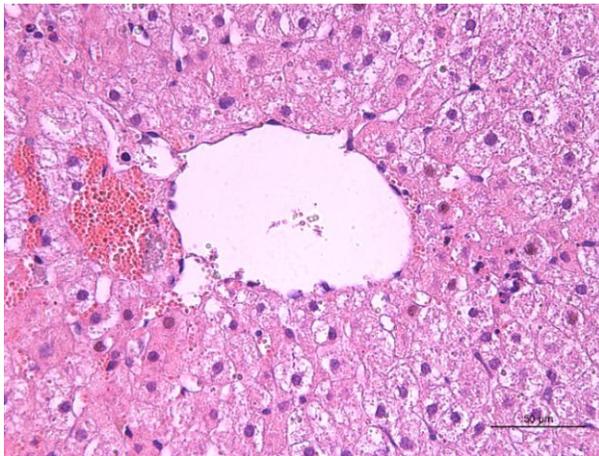


Figura 17. Biópsia hepática de caprino que recebeu folhas de *C. axillare* na dose de 5g/kgPv, 15 dias após a administração. Veia centrolobular sem alteração morfológica, mas com áreas de extravasamento de hemácias (coloração HE, objetiva de 20x).

O achado do fígado em aspecto de noz moscada com a confirmação da necrose hepática pela histologia presentes nos caprinos que receberam as folhas no presente estudo é similar à descrita por vários autores como lesões características da intoxicação por *C. axillare* (Dobereiner *et al.*, 1969; Van Der Lugt *et al.*, 1991, 1992; Tokarnia *et al.*, 2002; Marques, 2010; Barbosa *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2010; Tokarnia *et al.*, 2012; Coutinho *et al.*, 2013). Este resultado confirma que a espécie caprina é um bom modelo experimental para o estudo dos efeitos tóxicos desta planta.

Um aspecto característico do fígado é a habilidade de regenerar de forma rápida e eficiente a massa hepática perdida. A necrose na área centrolobular do lóbulo leva a uma onda de proliferação de hepatócitos nas áreas remanescentes do lóbulo, particularmente de hepatócitos periportais. Um único episódio de necrose hepática extensa é geralmente seguido por regeneração parenquimatosa sem cicatriz, desde que a estrutura da matriz extracelular normal (reticulina) da parte afetada permaneça intacta e não entre em colapso (McGavin e Zachary, 2013). Reconhece-se que a regeneração hepática é um evento que promove crescimento tecidual altamente ordenado e organizado. A perda do parênquima hepático, induzida por tratamento agudo, cirúrgico ou químico, desencadeia um processo regenerativo até que a massa hepática seja completamente restaurada.

A restauração ocorre por hiperplasia celular compensatória do parênquima remanescente, de forma regulada e precisa, até o fígado atingir seu peso original, com pequena variação de 5 a 10% (Jesus *et al.*, 2000).

5.5. Pesquisa de carboxiatractilosídeos em folhas de *C. axillare*

A ausência de alterações clínicas e patológicas significantes nos caprinos que receberam o extrato de saponinas contendo digitogenina e gitogenina é indicativa que estas não são o princípio tóxico do *C. axillare*. Além disto, as alterações clínicas e patológicas induzidas pelas folhas desta planta são similares às induzidas pelos carboxiatractilosídeos. De fato, Driemeier *et al.* (1999) relataram a intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (planta que possui como princípio tóxico carboxiatractilosídeos) em bovinos. Os sinais clínicos foram similares aos encontrados neste estudo e consistiam em anorexia, apatia, tenesmo retal com discreto prolapso de reto, desidratação progressiva com retração dos globos oculares e sinais nervosos como incoordenação motora, tremores musculares e agressividade. Além disto, os achados patológicos do fígado, caracterizados pela aparência macroscópica de aspecto de noz moscada e microscopicamente a necrose hepática, observados na intoxicação por *C. axillare* são similares as descritas na intoxicação de plantas que possuem como princípio tóxico os carboxiatractilosídeos (Cole *et al.*, 1989), como *Xanthium cavanillesii* (Driemeier *et al.*, 1999), *Xanthium strumarium* (Turgut *et al.*, 2005; Botha *et al.*, 2014) e *Atractylis gummifera* (Carlier *et al.*, 2014). Assim, foi realizada a pesquisa de carboxiatractilosídeos nas folhas de *C. axillare*, para confirmar se estes compostos poderiam ser os responsáveis pela intoxicação.

Os extratos foram submetidos em infusão direta (ressuspensão em acetonitrila) ao LC-MS/MS e a massa molar encontrada foi de 769,4023 (Fig. 19). A fórmula química do carboxiatractilosídeo é $[C_{31}H_{46}O_{18}S_2-H]$. No estudo de Botha *et al.* (2014), a presença do carboxiatractilosídeo na planta *Xanthium strumarium* foi confirmada através da cromatografia de alta resolução acoplado a espectrometria de massas (LC-MS) e a massa molar encontrada foi 769, 20449 correspondente ao carboxiatractilosídeo. Carlier *et al.* (2014) utilizaram a *Atractylis gummifera* L. para detecção do carboxiatractilosídeo por meio do aparelho LC-MS/MS, e a massa encontrada variou de 769,2053 a 770,2086. Steenkamp *et al.* (2004) encontraram carboxiatractilosídeo na planta *Callilepis lauréola*, através da LC-MS e a massa encontrada foi 769,00, assim como neste estudo.

Os sinais clínicos presentes nesse estudo são similares aos descritos por Santos *et al.* (2008) nos casos intoxicação por plantas que contém como princípio tóxico o carboxiatractilosídeo. Assim, a confirmação da presença do carboxiatractilosídeo pela cromatografia, associado à ausência de efeitos tóxicos significantes induzidos pela saponinas isoladas das folhas, demonstra que o princípio tóxico do *C. axillare* é provavelmente o carboxiatractilosídeo.

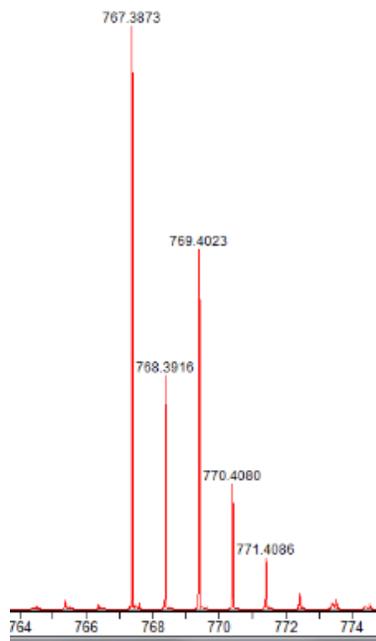


Figura 18. Espectro de massas (LC-MS/MS), evidenciando a massa molar do carboxiatractilosídeo (769,4023).

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, foi verificado que as folhas secas de *Cestrum axillare*, quando administradas na dose de 10g/kg a um caprino, produziram efeitos tóxicos, com alterações na bioquímica (indicando lesão hepática) e histopatológica apresentando necrose hepática centrolobular. Na dose de 5g/kg de folhas secas, não foi observado sintomatologia clínica da intoxicação, mas houve necrose hepática; após 15 dias após da última administração, o parênquima hepático deste animal já se encontrava normal, apenas com áreas hemorrágicas, demonstrando plena regeneração.

Apesar do extrato de saponinas das folhas de *C. axillare* conter gitogenina e digitogenina, apontadas na literatura como as responsáveis pela intoxicação, a administração deste extrato a caprinos em dose total equivalente ao conteúdo de 40g/kg de folhas secas, não produziram efeitos tóxicos significantes, comprovando não serem estes compostos os responsáveis pela intoxicação.

O estudo fitoquímico das folhas da planta demonstrou a presença de carboxiatractilosídeos, compostos que são responsáveis pelos mesmos efeitos tóxicos observados na intoxicação por *C. axillare*.

Assim, o princípio tóxico responsável pelos casos de intoxicação por *C. axillare* é provavelmente o carboxiatractilosídeo. Além disto, a espécie caprina é um bom modelo experimental para estudos desta intoxicação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, E.; SANTOS, H.L. Intoxicação experimental por coeranea Mart. Ex. Sendt. (Solanaceae) em bovinos. *Pesq. Agroc. Bras.*, v.30, p.875-883, 1995.
- 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)-Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR..
- ARAÚJO, D.F.; SILVA, I.P. Valores de amilase, glicose, colesterol e triglicérides em soro de cabras de Mossoró, RN. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.3, p.97-100, 2008.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; PINHEIRO, C.; LOPES, C.T.A. *et al.* Intoxicação por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) em bubalinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.30, p.1049-1052, 2010.
- BARROS, G.C.; DOBEREINER, J. Experimentos com *Cestrum laevigatum* Schlecht. em animais de laboratório. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.3, p.307-311, 1968.
- BIRGEL, E.H. Variações nos teores protéicos no sangue de caprinos durante o desenvolvimento etário. *Rev. Fac. Med. Vet. S. Paulo*, v. 8 fasc. 1, p. 209-305, 1969.
- BOTHA, C.J.; LESSING, D.; ROSEMANN, M. *et al.* Analytical confirmation of *Xantium strumarium* poisoning in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.26, p. 640-645, 2014.
- BRITO, M.F.; FRANÇA, T.N.; OLIVEIRA, L.I.; RAMOS, A.S. Intoxicação espontânea por *Cestrum laevigatum* em um caprino no Rio de Janeiro-Relato de Caso. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.21, n.1, p.55-57, 2010.
- CANHAM, P. A. S.; WARREN, F.L. The saponins: part I. The isolation of gitogenin and digitogenin from *Cestrum laevigatum*. *Journal the South African Chemical Institute*, v. 3, n. 1, p. 9-12 1950.
- CARLIER, J.; ROMEUF, L.; GUITTON, J. *et al.* A validated method for quantifying atractyloside and carboxyatractyloside in blood by HPLC-HRMS/MS, a non-fatal case of intoxication with *Atractylis gummifera* L. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 38, n. 9, p. 619-627, 2014.
- CHEEKE, P.R. Biological effects of feed and forage saponins. In: WALLER, G.R.; YAMASAKI, K. (Eds.). *Saponins used in food and agriculture*. New York: Plenum Press, 1996. p.377-385.
- COLE, R.J.; CUTLER, H.G.; STUART, B.P. Carboxyatractyloside. In: CHEEKE, P.R. (Ed.). *Toxicants of plant origin*, Vol. II, Glycosides. BocaRaton: CRC Press Inc., BocaRaton, 1989. p.253-263.
- COUTINHO, L.T.; COSTA, N.A.; MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B. *et al.* Intoxicação natural de bovinos leiteiros por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) no agreste de Pernambuco – Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.4, n.3, p.352-359, 2013.
- CUARTAS, Y.B.; CASTANO E.R. Descripción botánica y fitoquímica Del jazmín de noche (*Cestrum nocturnum* L.). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas*, v.12, n.1, p.17-23, 2008.
- DOBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C. *et al.* Intoxicação por *Cestrum laevigatum* Schlecht., a causa de mortandades em bovinos no estado do Rio de Janeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.4, p. 165-193, 1969.
- DRIEMEIER, D.; IRIGOYEN, L.F.; LORETTI, A.P. *et al.* Intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.19, n.1, 1999.

- DUARTE, A. L. L. *Biópsia hepática guiada por videolaparoscopia em caprinos*. 67 f. 2007. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo.
- ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6^a ed. Burlington: Academic Press, 2008. p.117-155.
- EVANS, F.J. Thin-layer chromatography-mass spectrometry for the identification of saponins from *Digitalis* species. *Biomed. Mass Spectrom.*, v.1, n.3, p.166-168, 1974.
- FERNANDES, S.R.; FREITAS, J.A.; SOUZA, D.F. *et al.* Lipidograma como ferramenta na avaliação do metabolismo energético em ruminantes. *Rev. Bras. Agrociência*, v.18, n.1-4, p.21-32, 2012
- FRANCIS, G.; KEREN, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, v.88, p.587-605, 2002.
- GADELHA, I.C.N.; CÂMARA, A.C.L.; PACÍFICO DA SILVA, I. *et al.* Toxic effects of the pericarp of the *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong fruit on chicks. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 13, p. 135-140, 2015.
- JESUS, R.P.; WAITZBERG, D.L.; CAMPOS, F.G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev Ass Med Brasil*. v.46(3), p.242-254, 2000.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6^a ed. Burlington: Academic Press, 2008. p.882-888.
- MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. Bases da patologia em veterinária. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, 1324p.
- MARQUES, D.M. *Intoxicação experimental por Cestrum laevigatum em bubalinos (Bubalus bubalis)*. 2010. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.
- NÉSPOLI, P.B.; GHELLER, V.A.; PEIXOTO, P.V. *et al.* Avaliação de técnicas de biópsia hepática em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* v.30, p. 29-36, 2010.
- PEBAY-PEYROULA, E.; DAHOUT-GONZALEZ, C.; KAHN, R. *et al.* Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier complex with carboxyatractyloside. *Nature*, v.426, p.39-44, 2003.
- PEDROSO, P.M.O.; PESCADOR, C.A.; OLIVEIRA, E.C.; SONNE, L. Intoxicações naturais por plantas em ruminantes diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de 1996-2005. *Acta Scientiae Veterinarie*, v.35, p.213-218, 2007.
- PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, p.752-758, 2013.
- PINHEIRO, R.R.; ANDRADE, M.L.R.; SANTIAGO, L.B. *et al.* Níveis de proteínas totais, albuminas, globulinas e gama-globulinas no soro de matrizes caprinas da raça Moxotó e Saanen criadas no semiárido nordestino. In: V Congresso Nordeste de Produção Animal, Aracaju-SE, 2008.
- SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V.D.; BARROS, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 1, p. 1-14. 2008.

SILVA, S.L.; FLAGLIARI, J.J.; CESCO, F.T.R.S. Atividade sérica das enzimas AST, ALP e GGT de caprinos das raças Anglo-Nubiana e Saanen criados nos Estados de São Paulo e Paraíba. *Ars Veterinaria*, v. 20, n. 1, 022-027, 2004.

SILVA, S.N.; CARVALHO, A.M.V.; SANTOS, F.A.R. *Cestrum* L. (*Solanaceae*) da mata higrófila do Estado da Bahia, Brasil. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, v.25, n.1, p.157-166, 2003.

STEENKAMP, P.A.; HARDING, N.M.; VAN HEERDEN, F.R.; VAN WYK, B.E. Determination of atractyloside in *Callilepis laureola* using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1058, p.153-162, 2004.

STEENKAMP, P.A.; HARDING, N.M.; VAN HEERDEN, F.R.; VAN WYK, B.E. Identification of atractyloside by LC-ESI-MS in alleged herbal poisonings. *Forensic Sciences International*, v.163, p.81-92, 2006.

TENNANT, B.C.; CENTER, S.A. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6^a ed. Burlington: Academic Press, 2008. p.379-412.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J. *Plantas tóxicas do Brasil*. 2^a Ed. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 2012. 566p.

TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Poisonous plants affecting livestock in Brasil. *Toxicon*, v.40, p.1635-1660, 2002.

TURGUT, M.; ALHAN, C.C.; GURGOZE, M. et al. Carboxyatractiloside poisoning in humans. *Annals of Tropical Paediatrics*, v.25, p. 125-134, 2005.

VAN DER LUGT, J.J.; NEL, P.W.; KITCHING, J.P. The pathology of *Cestrum laevigatum* (Schlecht) poisoning in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.58, p. 211-221, 1991.

VAN DER LUGT, J.J.; NEL, P.W.; KITCHING, J.P. Experimentally-induced *Cestrum laevigatum* (Schlecht) poisoning in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.59, p. 135-144, 1992.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Speng.) Pedersen – *Amaranthaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, supl. 2, p. 46-49, 2003.