

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Área de concentração de Toxicologia e Plantas Tóxicas

**Fotossensibilização por *Brachiaria ruziziensis* em ovinos: Avaliações clínica,
patológica, micológica e fitoquímica por LC-MS/MS**

GABRIELLA MATOSO LIMA DIAMANTINO

Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária da UFMG
2018

Gabriella Matoso Lima Diamantino

Fotossensibilização por *Brachiaria ruziziensis* em ovinos: Avaliações clínica, patológica, micológica e fitoquímica por LC-MS/MS

Dissertação apresentada ao Colegiado 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.

Área: Clínica e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. Benito Soto-Blanco

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Marília Martins Melo

Belo Horizonte, MG

Escola de Veterinária da UFMG

2018

D537f Diamantino, Gabriella Matoso Lima, 1990-
Fotosensibilização por *Brachiaria ruziziensis* em ovinos: avaliações clínica, patológica, micológica e fitoquímica por LC-MS/MS / Gabriella Mattoso Lima Diamantino. – 2018. 96 p. : il.

Orientador: Benito Soto-Blanco

Co-orientador: Marília Martins Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Ovino – Teses. 2. Plantas venenosas – Teses. 3. Saponinas – Teses. 4. Micotoxinas – Teses. I. Soto-Blanco, Benito. II. Melo, Marília Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 59



FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIELLA MATOSO LIMA DIAMANTINO

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 08 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Benito Soto Blanco
Presidente - Orientador

Profª Kelly Moura Keller
Escola de Veterinária - UFMG

Prof. Cláudio Roberto Scabelo Mattoso
Faculdade Vértice - Univértix - Matipó-MG



Dedico este trabalho
À minha mãe,
Ao meu marido Diego,
Aos meus avós, Carlos e Marluce,
À Tia amada, Maria José,
À minha família,
E aos animais.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me guiar e sustentar em todos os bons e maus momentos.

À minha mãe, Carla, por sempre acreditar em mim e ser exemplo de força e garra.

Ao meu avô Carlos, que mesmo não estando aqui, tenho certeza que continua tendo orgulho da neta médica de bicho.

À minha avó Marluce que é a fonte de força e fé de toda a família.

À tia Maria José, pois sem o seu apoio eu jamais chegaria até aqui.

À minha irmã Fernanda que me apoiou na etapa final, com paciência e cuidado.

Ao meu marido Diego, minha maior torcida e apoio, que vibra a cada etapa vencida.

Ao meu orientador, Prof. Benito Soto Blanco, pela oportunidade, paciência e generosidade.

À querida Profa. Kelly Moura Keller, pela essencial ajuda, conselhos e paciência.

À Gabriela Lago, por toda ajuda e pelo constante sorriso.

Às amigas, Ana Flávia, Camila, Ana Luisa e Stephanie por serem grandes companheiras, confidentes, e proporcionarem boas risadas.

Aos queridos colegas do Laboratório de Toxicologia que me receberam tão bem.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos e Ovinos pelo apoio e obtenção das amostras.

Às instituições de fomento de fomento CAPES e CNPq, por viabilizar financeiramente a realização do experimento.

SUMÁRIO

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. OBJETIVO GERAL.....	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. <i>Brachiaria</i> spp.	6
3.2. <i>Pithomyces chartarum</i>	9
3.3. SAPONINAS.....	14
3.4. CLIMA E IDADE DA PLANTA.....	16
3.5. SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA À PROTODIOSCINA.....	17
3.6. COR DA PELAGEM.....	19
3.7. MECANISMO DA FOTOSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA.....	20
3.8. APRESENTAÇÕES CLÍNICAS.....	23
3.8.1. Tempo para aparecimento dos sinais clínicos.....	23
3.8.2. Sinais clínicos.....	24
3.8.3. Achados de Necropsia.....	24
3.8.4. Histologia.....	25
3.8.5. Avaliação da bioquímica sérica.....	27
3.9. FORMAÇÃO DOS CRISTAIS.....	28
3.10. DETECÇÃO DE PROTODIOSCINA	29
3.11. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE SAPONINA.....	30
3.12. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS).....	31
3.13. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. LOCAL	34
4.2. SURTO DE FOTOSENSIBILIZAÇÃO.....	34
4.2.1. Divisão dos grupos.....	36
4.3. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	36
4.3.1. Plantas.....	36
4.3.2. Amostras de sangue.....	37
4.4. TESTES BIOQUÍMICOS.....	37
4.5. NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA.....	38
4.6. CONTAGEM DE ESPOROS DE <i>P. chartarum</i>	38
4.7. DETERMINAÇÃO DA PROTODIOSCINA.....	38

4.7.1.	Reagentes químicos.....	38
4.7.2.	Preparação de soluções de estoque e trabalho.....	39
4.7.3.	Preparação do extrato da planta.....	39
4.7.4.	Preparação dos padrões	39
4.7.5	Equipamento e condições de LC-MS/MS.....	40
4.7.6.	Aquisição e processamento dos dados.....	41
4.8.	MÉTODO DE VALIDAÇÃO.....	42
4.8.1.	Seletividade	42
4.8.2.	Efeito matriz.....	42
4.8.3.	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	43
4.8.4.	Precisão.....	43
4.8.5	Exatidão.....	43
4.8.6	Aplicação do método.....	44
4.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5.	RESULTADOS.....	44
5.1.	SINAIS CLÍNICOS.....	44
5.2.	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA SÉRICA.....	45
5.3.	NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA.....	47
5.4.	CONTAGEM DE ESPOROS.....	50
5.5.	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PROTODIOSCINA.....	51
5.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	52
5.6.1.	Seletividade.....	53
5.6.2.	Efeito matriz.....	54
5.6.3.	Linearidade.....	55
5.6.4.	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	55
5.6.5.	Exatidão.....	56
5.6.6.	Precisão.....	56
5.6.7.	Aplicação do método.....	57
6.	DISCUSSÃO.....	58
6.1.	SINAIS CLÍNICOS.....	58
6.2.	MORTALIDADE.....	59
6.3.	BIOQUÍMICA SÉRICA.....	60
6.4.	HISTOPATOLOGIA.....	61
6.5.	CONTAGEM ESPOROS DE <i>Pithomyces chartarum</i>	64
6.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	64
6.7.	PROTODIOSCINA.....	66
6.7.1.	Concentrações tóxicas de protodioscina.....	67
6.8.	IDADE DA PLANTA E CLIMA.....	68
7.	CONCLUSÕES.....	69

8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores das bioquímicas séricas de ovinos realizadas no dia 03/02/2017	46
Tabela 2 -	Valores das bioquímicas séricas de ovinos realizadas no dia 09/02/2017	47
Tabela 3 -	Contagem de esporos de <i>Pithomyces chartarum</i> em amostras de <i>Brachiaria ruziziensis</i> . Os valores estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão.	51
Tabela 4 -	Concentrações de protodioscina encontradas em amostras de Simulalo de <i>Brachiaria ruziziensis</i> . Os valores estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão.	52
Tabela 5 -	Concentrações de protodioscina encontradas em amostras de <i>Brachiaria ruziziensis</i> em Brotação. Os valores estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão.	52
Tabela 6 -	Equação de regressão linear e coeficiente de determinação e correlação da curvas analítica para Protodioscina	55
Tabela 7 -	Limites de detecção e de quantificação do método	55
Tabela 8 -	Limites de detecção e de quantificação do método	56
Tabela 9 -	Recuperação média	56
Tabela 10 -	Repetitividade expressa pelo desvio padrão relativo de protodioscina nas diferentes concentrações.	56
Tabela 11 -	Reprodutibilidade expressa pelo desvio padrão relativo de protodioscina nas diferentes concentrações.	57
Tabela 12 -	Valores de protodioscina encontrada em amostras de <i>Brachiaria</i> dos surtos no Ceará e em Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais.	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características morfológicas de <i>Brachiaria ruziziensis</i> Fonte: Seiffert (1980)	12
Figura 2 -	Estrutura química da esporidesmina (Álvarez, 2017)	15
Figura 3 -	Estrutura química da saponina protodioscina (Lee <i>et al.</i> , 2010)	20
Figura 4 -	Lesão macroscópica de crostas em orelha de ovino acometido por fotossensibilização	48
Figura 5 -	Características macroscópicas do fígado de animal com fotossensibilização	48
Figura 6 -	Fotomicrografia de fígado apresentando múltiplos macrófagos espumosos (setas pretas). HE (200x)	49
Figura 7 -	Fotomicrografia de fígado apresentando crescimento fibroso entre fileiras de hepatócitos próximo ao espaço porta (setas pretas). HE (200x)	49
Figura 8 -	Fotomicrografia de tecido epitelial com perda da arquitetura do epitélio (setas pretas). HE (50x)	50
Figura 9 -	Fotomicrografia de tecido epitelial com alteração vascular secundária a fotossensibilização. Presença de material eosinofílico no interior de vasos, compatível com trombo (seta preta). HE (50x)	50
Figura 10 -	Fotomicrografia de esporos de <i>Pithomyces chartarum</i> .	51
Figura 11 -	Cromatograma do padrão da protodioscina – Linha vermelha: adquirido na função alta energia de colisão do modo MSE; Linha Verde: adquirido na função baixa energia de colisão.	53
Figura 12 -	Cromatograma da mistura da solução padrão da protodioscina. No gráfico de linha verde observa-se o pico no tempo de retenção (t_r) de 1,35 minutos, o mesmo não é observado no no gráfico de linha vermelha (da matriz branca).	54
Figura 13 -	Avaliação do paralelismo entre as curvas de calibração com a presença da matriz e sem a presença da matriz	54
Figura 14 -	Curva analítica matrizada para análise de protodioscina	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato aminotransferase
ELS	Espalhamento de luz evaporativo
FTS	Fotossensibilização
GGT	Gama-glutamilttransferase
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
LC-MS	Cromatografia líquida com espectrômetro de massa
UV	Ultravioleta
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SPPs	<i>Secondary plant products</i>
SC	Estrato córneo
GSC	Grupo sem contato
GSF	Grupo sem fotossensibilização mas que teve contato com a planta
GFTS	Grupo fotossensibilização
REC	<i>Brachiaria ruziziensis</i> Recombinante
K	<i>Brachiaria ruziziensis</i> Kennedy
EV	Escola de Veterinária
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
QCA	Análise Comparativa Qualitativa (<i>Qualitative Comparative Analysis</i>)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HE	Hematoxilica e Eosina
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
CE	Energia de colisão
ESI +	Eletrospray positivo
R _t	Tempo de retenção
SD	Desvio padrão

RESUMO

Algumas espécies do gênero *Brachiaria* são cultivadas mundialmente em regiões de clima tropical e subtropical como a principal forragem para ruminantes. Diversos trabalhos relatam a fotossensibilização hepatógena por *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha* e *B. humidicola*, mas a *Brachiaria ruziziensis* somente foi relatada no Brasil em dois trabalhos. As lesões cutâneas e hepáticas podem ter como causadores as saponinas presentes nas folhas ou a micotoxina esporidesmina produzida pelo fungo saprófito *Pithomyces chartarum*. O presente trabalho tem como objetivo descrever as alterações clínicas e patológicas em surto de fotossensibilização hepatógena causada pela *B. ruziziensis* em ovinos. Além disto, pretende oferecer subsídios para se entender melhor a etiologia desta fotossensibilização, por meio da avaliação da concentração de saponina esteroidal protodioscina e da contagem de esporos de *P. chartarum*. Ovinos mestiços da raça Santa Inês, apresentaram sinais de fotossensibilização ao serem alimentados por novo clone de *B. ruziziensis*. Os sinais clínicos incluíram icterícia, apatia, desidratação e fotossensibilização, caracterizadas por edema facial e cicatrizes cutâneas, principalmente nos ouvidos. Durante a necropsia de um animal que foi a óbito, foi observado icterícia generalizada, lesões crostosas na face e principalmente em orelhas; os rins e fígado se apresentaram firmes e esverdeados. Histologicamente, o fígado apresentou infiltrado difuso de macrófagos espumosos, raras células multinucleadas, aumento discreto de volume dos hepatócitos (megalocitose) característico de hepatite histiocítica aguda difusa acentuada com macrófagos espumosos; e na pele, necrose epidermal e dermal focalmente extensa aguda acentuada com trombos oclusivos. O clone de *B. ruziziensis* mostrou níveis baixos de protodioscina ($0,020 \pm 0,024\%$ nas folhas maduras e $0,065 \pm 0,084\%$ na planta em brotação) com base na análise por LC-MS/MS e altas contagens de esporos de *P. chartarum* (média de 479.844 ± 443.951 esporos/g de planta). Assim, é provável que a fotossensibilização pela *B. ruziziensis* aqui descrita tenha sido causada pela micotoxina da esporidesmina.

Palavras-chave: envenenamento de plantas; *Brachiaria* spp.; saponinas; protodioscina; esporidesmina; *Pithomyces chartarum*.

ABSTRACT

Some species of the genus *Brachiaria* are cultivated worldwide in regions of tropical and subtropical climate as the main forage for ruminants. Several studies report hepatogenic photosensitization by *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha* and *B. humidicola*, but *Brachiaria ruziziensis* has only been reported in Brazil by two studies. Cutaneous and hepatic lesions may be caused by the saponins present in the leaves or the mycotoxin sporidesmin produced by the saprophyte fungus *Pithomyces chartarum*. The present work aims to describe clinical and pathological changes in an outbreak of hepatogenic photosensitization caused by *B. ruziziensis* in sheep. In addition, it intends to offer subsidies to better understand the etiology of this photosensitization, through the evaluation of the steroidal saponin protodioscin and the spore count of *P. chartarum*. Crossbred Santa Inês sheep showed signs of photosensitization when fed a new clone of *B. ruziziensis*. Clinical signs included jaundice, apathy, dehydration and photosensitization, characterized by facial edema and cutaneous scars, especially in the ears. At necropsy of a dead animal, there was generalized jaundice, crustal lesions on the face and especially on the ears, the kidneys and liver were firm and greenish. Histologically, the liver had diffuse infiltrate of foamy macrophages, rare multinucleated cells, discrete volume increase of hepatocytes (megalocytosis) characteristic of histiocytic hepatitis with sharp diffuse sharp acute and skin macrophages, acute focally extensive epidermal and dermal necrosis accentuated with occlusive thrombi. The *B. ruziziensis* clone showed low levels of protodioscin ($0.020\pm 0.024\%$ in mature leaves and $0.065\pm 0.084\%$ in sprouts) based on LC-MS/MS analysis and high spore counts of *P. chartarum*. Thus, it is likely that the photosensitization by *B. ruziziensis* described herein was caused by the mycotoxin sporidesmin.

Keywords: plant poisoning; *Brachiaria* spp.; saponins; protodioscin; sporidesmin; *Pithomyces chartarum*.

1. INTRODUÇÃO

Os dados mais recentemente apresentados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que Brasil tinha 18,41 milhões de ovinos em 2015, com uma variação de 4,5% em relação a 2014. O nordeste se destaca, pois concentrou 60,6% do rebanho nacional no ano estudado. A Região Sul segue com 26,5% do efetivo da espécie, acompanhada pelas Regiões Centro-Oeste (5,6%), Sudeste (3,8%) e Norte (3,6%) (IBGE, 2015).

Os ovinos são criados em pastagens de diversas espécies de gramíneas, sendo mais frequente no Brasil algumas espécies do gênero *Brachiaria*. Atualmente o país possui 70 milhões de hectares de *Brachiaria* spp. dos 100 milhões de hectares de pastagem cultivada, e presume-se que aproximadamente 50% destas pastagens sejam constituídas pela espécie *B. decumbens* (Fonseca-Filho *et al.*, 2017). No entanto, a utilização de pastagens de *Brachiaria* pode representar um problema para a criação de ovinos, pois pode causar um quadro de fotossensibilização hepatógena, que pode ser fatal (Gracindo, 2010). De fato, a espécie mais sensível aos efeitos tóxicos causados pela *Brachiaria* é a ovina, mas a intoxicação também ocorre em bovinos, bubalinos, caprinos e equinos. As espécies de braquiárias responsáveis por fotossensibilização são *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola* (Lemos *et al.*, 1998; Tokarnia *et al.*, 2012), havendo também apenas dois relatos de fotossensibilização por *Brachiaria ruziziensis* (Nazário *et al.*, 1985; Purchio *et al.*, 1988).

Os animais acometidos pela fotossensibilização apresentam sensibilidade exagerada aos raios solares. São descritos dois tipos de fotossensibilização causadas por plantas: primária e secundária. A fotossensibilização primária, na qual a planta possui um composto fotossensibilizante que é absorvido pelo intestino, ultrapassa barreira hepática e atinge a corrente sanguínea e chega à pele, causando elevada sensibilidade aos raios solares (Tokarnia *et al.*, 2012). A fotossensibilização secundária acontece quando a planta promove alterações no tecido hepático ou de seus ductos biliares por apresentar

alguma substância tóxica que causa prejuízo no mecanismo de eliminação da filoteritina, um pigmento fluorescente formado a partir da clorofila por ação da microbiota nos pré-estômagos dos ruminantes. Normalmente, a filoteritina absorvida em quantidade pequena pelo intestino é eliminada pelo fígado através da bile (Tokarnia *et al.*, 2012).

Inicialmente, a micotoxina esporidesmina, produzida pelo fungo saprófito *Pithomyces chartarum*, foi apontada como responsável por levar os animais a apresentarem fotossensibilização (González e Soto-Blanco, 1998). No entanto, estudos posteriores demonstram que, mesmo com mínima presença de esporos no pasto ou ocorrência de cepas não produtoras da esporidesmina, alguns animais apresentam lesões associadas à fotossensibilização, o que indica outra causa para intoxicação por *Brachiaria* (Meagher *et al.*, 1996). Assim, foi verificada uma relação entre a ocorrência e gravidade da fotossensibilização nos animais com os níveis da saponina protodioscina na planta, indicando ser esta substância a responsável pela intoxicação (Meagher *et al.*, 1996; Brum *et al.*, 2007).

Na avaliação histopatológica de casos de intoxicação por *Brachiaria*, podem ser encontradas células com o citoplasma espumoso (“foam cells”) e cristais birrefringentes no interior de macrófagos, mas estas não são encontradas em todos os casos estudados (Driemeier *et al.*, 1998; Seixas *et al.*, 2016). Os animais que morrem rapidamente muitas vezes não apresentam estas células espumosas (Seixas *et al.*, 2016). De fato, há relatos em bovinos e ovinos demonstrando que as “foam cells” levam tempo para se formarem (Driemeier *et al.*, 1998, 1999). Já os cristais birrefringentes, formados a partir das saponinas, podem ser dissolvidos durante o processamento histopatológico (Bridges *et al.*, 1987). Outro achado microscópico nesta fotossensibilização é a proliferação do retículo endoplasmático liso (Driemeier *et al.*, 1998). À microscopia eletrônica, foi verificada a presença de material granular eletrodense no interior de lisossomos de hepatócitos (Driemeier *et al.*, 2002).

A determinação das atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamiltransferase (GGT) são comumente utilizadas como exame complementar, para diagnóstico nos casos de intoxicação por braquiária (Brum *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2008; Saturnino *et al.*, 2010). As concentrações séricas de creatinina e ureia também podem estar aumentadas (Brum *et al.*, 2007).

Para determinação do teor da saponina protodioscina nas plantas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é considerada uma técnica precisa e comumente utilizada (Oleszek, 2002; Brum *et al.*, 2007). Já as técnicas utilizando cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS) ou espectrometria de massas sequencial (MS/MS) foram identificadas como o mais adequado para uso na análise e identificação de misturas de saponinas (Wang *et al.*, 2007; Dinchev *et al.*, 2008).

Apesar do grande número de relatos e estudos de fotossensibilização por *Brachiaria*, principalmente por *B. decumbens*, há apenas dois relatos relacionados à *B. ruziziensis* (Nazário *et al.*, 1985; Purchio *et al.*, 1988), realizados antes da descoberta da associação entre saponinas em braquiárias e a ocorrência de fotossensibilização. Além disto, é necessária a continuidade dos estudos visando melhor entender a etiologia da fotossensibilização pela *Brachiaria*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo descrever as alterações clínicas e patológicas em surto de fotossensibilização hepatógena causada pela *Brachiaria ruziziensis* em ovinos. Além disto, pretende oferecer subsídios para se entender melhor a etiologia desta fotossensibilização, por meio da avaliação da concentração de saponina esteroideal protodioscina e do esporo de *Pithomyces chartarum*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar método de detecção e quantificação simultânea da protodioscina por meio da técnica de LC-MS/MS na gramínea *Brachiaria ruziziensis*;
- Avaliar a fotossensibilização hepatógena apresentada por ovinos após a ingestão de *Brachiaria ruziziensis* por meio da avaliação clínica, histopatológica; hepática e renal por meio da bioquímica sérica dos animais acometidos;
- Na planta, estudar a presença da saponina protodioscina, por meio da sua detecção e quantificação nas folhas de *Brachiaria ruziziensis* utilizando a técnica desenvolvida de LC-MS/MS e quantificar esporos de *Pithomyces chartarum*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Brachiaria* spp.

Brachiaria ruziziensis Germain et Evrard (Figura 1) é uma gramínea de origem africana. Como características de crescimento, possui ciclo vegetativo perene, altura de crescimento livre, chegando até 1,20 m, tem forma de crescimento cespitosa. É utilizada para pastejo e possui digestibilidade e palatabilidade satisfatórias e pode suportar de 2 a 3 cabeças por hectare de pastejo. Requer precipitação pluviométrica de 1.000 mm/ano, possui média tolerância à seca (Vilela, 2005).

O cultivar Kennedy de *B. ruziziensis*, apesar de ser diferente por ter porte maior, tem relação com a *Brachiaria decumbens*. Tem floração tardia, as folhas são largas, com pilosidades verdes (Vilela, 2005).

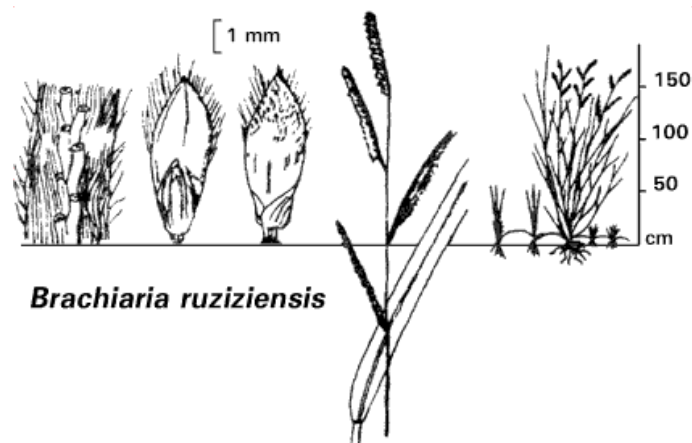


Figura 1: Características morfológicas de *Brachiaria ruziziensis*. Fonte: Seiffert (1980)

Brachiaria spp. tem sido considerada, no Brasil, a melhor opção para alimentação de ruminantes devida a sua alta capacidade de produção de matéria seca, fácil cultivo, boa adaptação a diferentes solos para o crescimento o ano todo e sua resistência à seca e baixo custo de manutenção (Castro *et al.*, 2011).

Dentre as diferentes espécies de braquiária, as principais são *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicula* e *B. ruziziensis*. *B. decumbens* foi a primeira espécie introduzida no Brasil, o que ocorreu em 1952 sob o nome de *B. brizantha*. Em 1965, material da mesma espécie foi adquirido do Suriname, desta vez como *B. decumbens*, distinta de *B. brizantha*, que também foi introduzida em 1965 (Miles *et al.*, 1996).

Apesar de sua importância como pastagem, as plantas do gênero *Brachiaria*, principalmente *B. decumbens*, são consideradas as principais plantas relatadas como causa de surtos de fotosensibilização hepatógena em cabras, ovelhas (Graydon *et al.*, 1991; Lajis *et al.*, 1993; Lemos *et al.*, 1996; Salam e Rajion, 1997; Driemeier *et al.*, 2002; Brum *et al.*, 2007) e bovinos (Driemeier *et al.*, 2002; Riet-Correa *et al.*, 2011; Furlan *et al.*, 2012). Os casos de animais intoxicados por *B. brizantha* (Mustafa, 2009);

B. humidicola (Láu, 1990) e *B. ruziziensis* (Nazário *et al.*, 1985; Purchio *et al.*, 1988) são menos frequentes. Para diminuir o número de surtos, nos últimos 20 anos, a alternativa foi a substituição de *B. decumbens* por *B. brizantha* e *B. humidicola*, por serem espécies consideradas menos tóxicas (Castro *et al.*, 2011; Riet-Correa *et al.*, 2011).

Dubé *et al.* (2016) descreveram a intoxicação em caprinos pela gramínea mulato, uma variedade híbrida de *B. ruziziensis* e *B. brizantha*. Neste surto, os animais foram alimentados pela planta em forma de forrageira e de feno. Uma das características apontadas como mais desejáveis do híbrido mulato é a sua tolerância a períodos prolongados de seca e sua capacidade de regenerar e oferecer forragem verde durante esta época crítica do ano.

A ocorrência de intoxicação em ovinos foi relatada no estado de São Paulo, onde os animais pastavam *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria ruziziensis* e apresentaram sinais característicos de fotossensibilização. Após a análise micótica e micotoxicológica, detectaram a presença do fungo *P. chartarum* e da micotoxina esporidesmina, onde caracterizou-se esse surto sendo causado pela micotoxina (Purchio *et al.*, 1988). Porém, desde 1996 há autores que sugerem que a toxicidade da *Brachiaria* spp. é devido a presença de saponinas esteroidais litogênicas contidas nesta grama (Meagher *et al.*, 1996).

Diversos estudos foram realizados no intuito de descrever a ocorrência e os aspectos clínico-patológicos da intoxicação causada pela *Brachiaria* spp. em ruminantes, , mas ainda assim, existem pontos relacionados aos aspectos epidemiológicos que precisam ser melhor explicados. Em especial, os fatores que podem interagir para a ocorrência da intoxicação ainda são desconhecidos, principalmente em ovinos, que é considerada uma das espécies mais suscetíveis (Mustafa *et al.*, 2012).

Já Riet-Correa *et al.* (2011) relataram que nos casos de intoxicação por *Brachiaria* spp., o estudo epidemiológico deve considerar se na propriedade tem estas pastagens, se a categoria de animais jovens é mais afetada que os adultos, e se há alta frequência de animais criados anteriormente em pastagens sem essa gramínea mas acometidos após a introdução em pastagens de *Brachiaria* spp.

Apesar dos problemas, a grande utilização de *Brachiaria* spp. no Brasil, assim como em outros países tropicais, se dá pelas vantagens que estas gramíneas têm em relação às outras espécies. De fato, produzem matéria verde em solos com baixa e média fertilidade, são tolerantes à seca, são resistentes às pragas e estão bem adaptadas aos solos ácidos e pobres. Além de serem boas plantas para o controle da erosão como cobertura do solo, e também toleram pastagens pesadas. Além disso, são capazes de se adaptar a diferentes ambientes, são agressivas e competem com a vegetação nativa (Dias-Filho, 2000; Hare *et al.*, 2009).

3.2. *Pithomyces chartarum*

Pithomyces chartarum é um fungo saprófito, pertencente à família Herpotrichiellaceae (anteriormente Dematiaceae), cosmopolita, distribuído em regiões temperadas, quentes, subtropicais e tropicais do mundo (Dingley, 1962; Cruz, 2010). As condições ambientais favoráveis como, umidade relativa de 60% e temperatura entre 18 e 27°C, permitem que muitos conídios (esporos) sejam produzidos, e estes podem conter a micotoxina esporidesmina (Figura 2) (Di Menna *et al.*, 2009).

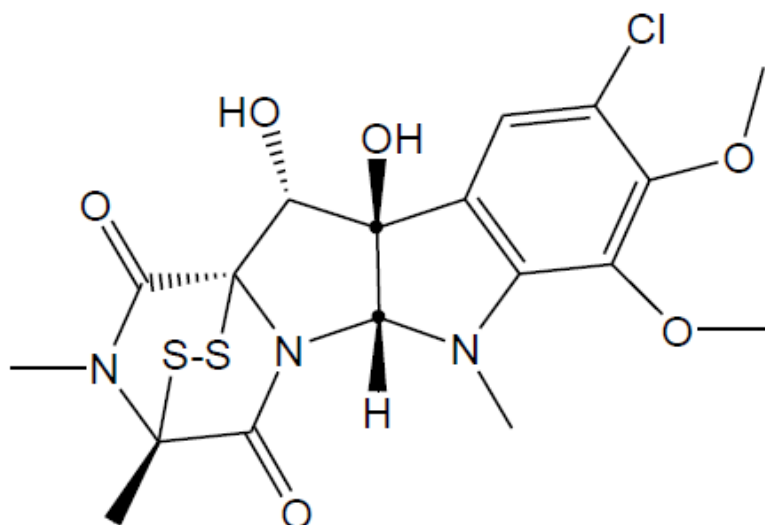


Figura 2: Estrutura química da esporidesmina (Álvarez, 2017)

Em 1958, foram isolados os primeiros fungos decorrentes de casos de eczema facial em ovinos e ocorreram na Nova Zelândia (Di Menna *et al.*, 2009). O fungo *Pithomyces chartarum* normalmente produz esporidesmina que pode causar fotossensibilização hepatógena como a intoxicação por *Brachiaria* spp., porém existem cepas não produtoras da micotoxina (Lima *et al.*, 2015).

Este fungo está relatado na literatura internacional como responsável por fotossensibilização em ruminantes (Synge e White, 1960; Brook, 1963). Para que sobreviva, ele necessita de umidade relativa por volta de 96%, temperaturas entre 18° a 27° C e substrato, pois favorecem a formação de microclima adequado à esporulação do *P. chartarum*. A estação chuvosa, seguida por um período seco e quente fornece estas condições e também é ideal para o crescimento de pastagem (Bars *et al.*, 1990; Russomanno *et al.*, 2003; Di Menna *et al.*, 2009).

Lima (2012) observou que a fase de crescimento da planta que melhor proporcionou condições de crescimento para o fungo foi de 300 e 360 dias em comparação com períodos anteriores com plantas jovens (60 e 120 dias), pois tinha muitas folhas antigas e materiais em decomposição, altas temperaturas, precipitações e evaporação. O período

entre Dezembro e Março é o que apresenta as temperaturas mais próximas do ideal para o *P. chartarum*, porém, o auge de sua atividade segue as elevações anuais de temperatura (Brook, 1969; Mortimer e Ronaldsin, 1983)

Lima *et al.* (2012) estudaram a influência de diversos fatores sobre a contagem de esporos. A contagem de esporos de *P. chartarum* foi maior nas plantas com maior idade. Ao comparar espécies, não houve diferença no número de esporos entre *B. brizantha* e *B. decumbens*. Os mesmos autores relataram que o fator que mais influenciou a contagem de esporos foi a precipitação máxima e evaporação média, ou seja, o clima causou a maior influência.

As cepas de *P. chartarum* isoladas da Nova Zelândia e da Austrália possivelmente produzem mais esporidesmina do que as cepas proveniente das Américas (Lima *et al.*, 2015). Um exemplo disso é o trabalho de Collin *et al.* (1998), que compararam os isolados de *P. chartarum* obtidos a partir de amostras de pastagens provenientes da Austrália, Brasil, Nova Zelândia e Uruguai, e avaliaram a capacidade destes esporos em produzirem esporidesmina. As frequências de cepas isoladas que produziram esporidesmina de cada país analisado foram: Austrália, 67% dos 207 isolados; Brasil, 2% de 51 isolados; Nova Zelândia, 86% dos 391 isolados; e Uruguai, 28% dos 182 isolados produziram a micotoxina esporidesmina. Em outro estudo, Halder *et al.* (1981) analisaram amostras isoladas na América do Norte, e não observaram cepas produtoras de esporidesmina.

A fotossensibilização causada pelo *P. chartarum* é mais conhecida como "eczema facial", pois os animais acometidos apresentam alterações na pele e ao serem expostos aos raios solares. Sofrem lesões em consequência do acúmulo de filoteritina na periferia dos tecidos, sendo esta a substância que condiciona o fenômeno da fotossensibilização. As lesões costumam se concentrar mais na face e orelhas, pois estas regiões não possuem proteção total de lã (Brook, 1963, 1969).

A micotoxina esporidesmina, produzida pelo *P. chartarum*, afeta primariamente o sistema biliar, causando colangite obstrutiva, com extensa necrose na adventícia dos ductos, com proliferação de tecido conjuntivo e de ductos biliares próximos ao espaço-porta (Russomanno *et al.* 2003, Tóth *et al.* 2007). Esta toxina leva a lesão hepática, inflamação e obstrução do ducto biliar com conseqüente retenção de pigmentos fotossensibilizantes no sangue que normalmente seriam excretados. Após este acúmulo, quando os animais são expostos à luz solar, ocorrerão lesões da pele. Entre a ingestão da planta contaminada com a micotoxina e o aparecimento dos sinais clínicos, há um período de aproximadamente 7-20 dias (Di Menna *et al.*, 2009).

A filoteritina em peles despigmentadas ou desprovidas de pelos, por ser uma substância fotodinâmica, gera a formação de radicais livres de oxigênio no citosol da célula ao terem contato com a luz solar e reagir com a luz ultravioleta (UV). Com isso, causa ruptura de lisossomos, degranulação de mastócitos cutâneos, degradando membranas fosfolípídicas, polipeptídios proteicos e ácidos nucléicos, o que gera intensa inflamação que caracteriza a fotodermatite (Jones *et al.*, 2000).

A fotossensibilização causada pelo esporidesmina foi classificada em subclínica, quando há elevação de GGT sérica e colangiohepatite no exame histológico, ou classificada como clínica, subdividida em aguda, crônica moderada e crônica grave. A forma clínica é caracterizada por inapetência, inquietação, edema e aumento de sensibilidade na orelha com posterior necrose, pêlo arrepiado, prurido e sacudir da cabeça. E para definir qual tipo de forma clínica, o tempo para aparecimento dos sinais, a gravidade, a duração e o tempo para cura espontânea devem ser considerados. Além desses sinais, na forma clínica grave, é comum observar edema submandibular e de barbeta associado à anemia, desidratação, icterícia e feridas exsudativas pelo corpo. A contagem de esporos de *P. chartarum* das pastagens das propriedades onde os animais apresentaram o surto, ficou entre 87.000 a 251.000 por grama de pastagem (Fagliari *et al.* 1994). Segundo Di Menna *et al.* (2009), as contagens de esporos de *P. chartarum* superiores a 100.000 esporos por grama de pastagem são consideradas perigosas.

Outros autores, como Alessi *et al.* (1994), também descreveram os sinais clínicos apresentados por bovinos de sete a 30 meses de idade alimentados por *Brachiaria* spp. contendo 81.000 a 251.000 esporos de *P. chartarum* por grama de pastagem. Neste caso, foi observado na histopatologia colangiohepatite, necrose e proliferação de ducto biliar somente em animais que apresentaram a forma clínica em alguma fase da vida.

Segundo Alvariza (1993) citado por Moreira *et al.* (2009), a toxicidade da pastagem vai depender da contagem de esporos presente. Em contagens superiores a 40.000 esporos/g, pode ocorrer fotossensibilização hepatógena clínica. Já em condições de campo, em contagens a partir de 100.000 esporos/g geralmente ocorrem morte dos animais. Nas observações de Moreira *et al.* (2009), mesmo com contagens maiores que 40.000, os animais não apresentaram sinais clínicos sugestivos de fotossensibilização. Entretanto, a esporidesminotoxicose pudesse estar ocorrendo de forma subclínica.

Para que os agricultores consigam identificar os períodos de toxicidade das pastagens, dois métodos foram sugeridos: a avaliação das condições climáticas e a contagem de esporos de *P. chartarum* na pastagem (Di Menna *et al.*, 2009). A contagem de esporos por meio da lavagem e posterior avaliação em microscópio pode ser utilizada em vários tipos de material, além das pastagens, e também poderia ser utilizado no conteúdo ruminal e nas fezes de ovelhas que os pastoreiam a planta contaminada por esporos (Smith *et al.*, 1987) e também em qualquer tipo de terreno (Di Menna *et al.*, 2009).

Não se pode excluir o fungo como agente etiológico da toxicose de esporidesmina em casos de ausência ou baixa contagem de esporos, pois podem acontecer atrasos, tanto no tempo de processamento até a contagem dos esporos, quanto no momento desde a ingestão da forragem contaminada por esporidesmina até o momento de aparecimentos das lesões (Smith 2000, Di Menna *et al.* 2009). Por outro lado, Lemos *et al.* (1996) demonstraram que os esporos nem sempre se encontravam em quantidade suficiente para serem considerados tóxicos, para causar doença.

Até o presente momento, o número trabalhos que fizeram estudos isolados no Brasil não é suficiente para concluir que todas as cepas do Brasil não produzem esporidesmina. É necessário que mais estudos sejam desenvolvidos a partir de amostras brasileiras para determinar conclusivamente se as cepas e as quantidades de fungo são capazes de produzir esporidesmina (Lima *et al.*, 2012).

3.3.SAPONINAS

Pelo menos 400 espécies de plantas, inclusive plantas usadas na alimentação ou suplementação de ruminantes, possuem saponinas. As saponinas são glicosídeos, possuem alto peso molecular, consistindo de uma fração de açúcar ligada a um triterpeno ou esteróide aglicona (Hostettmann e Martson, 1995). Derivadas do metabolismo secundário das plantas, as saponinas, mesmo não sendo essenciais para a vida da planta, estão relacionadas com o sistema de defesa da planta, gerando vantagens para sua sobrevivência (Reed *et al.*, 2000; Wina *et al.*, 2005). De fato, os produtos do metabolismo secundário desempenham papéis importantes na sinalização e defesa química contra herbívoros, insetos, pragas e mesmo outras plantas (Field *et al.*, 2006). Assim, as saponinas estão presentes nas follhas parte mais vulnerável ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos (Reed *et al.*, 2000; Wina *et al.*, 2005).

Existem outros metabólitos secundários relacionados à defesa da planta além das saponinas, como os glicosídeos cianogênicos e os glicosinolatos. São armazenadas em vacúolos presentes no interior das células vegetais, onde os precursores inativos são facilmente convertidos em antibióticos biologicamente ativos por enzimas normalmente separadas dos seus substratos por compartimentalização celular (Szakiel *et al.*, 2011). Porém, há fungos patogênicos capazes de colonizar o tecido das plantas, mesmo com a presença de saponinas antifúngicas. Assim, ambos os processos, tanto a defesa da planta, quanto o ataque de patógenos, resulta em alterações qualitativas da composição

da saponina e a escala dessa alteração depende da escala da infecção (Szakiel *et al.*, 2011).

A síntese das saponinas é otimizada sob condições de estresse, desta forma, sugere que esses compostos podem estar envolvidos na adaptação da planta a sobrevivência em condições adversas do solo (Szakiel *et al.*, 2011). Além disso, essas substâncias possuem efeitos benéficos como promotor de crescimento, porém pode ser tóxica para ruminantes (Wina *et al.*, 2005).

Algumas saponinas, denominadas genericamente de saponinas litogênicas, podem ser responsáveis pela fotossensibilização, pois desencadeiam reações complexas no organismo animal que resultam em lesões em células sensíveis da pele animal (Meaghi *et al.*, 1996; Yamori *et al.*, 2011). Lemos *et al.* (1996) fizeram análise de 30 culturas de *P. chartarum* de um caso de surto em ovelhas no Brasil, e apenas uma delas demonstrou produzir esporidesmina, relacionando os casos de fotossensibilização à ação tóxica da *Brachiaria decumbens* e não à esporidesmina.

Níveis variáveis de saponinas litogênicas foram encontrados em pastagens de *Brachiaria* com baixo número de esporos *P. chartarum* ou mesmo na ausência destes (Brum *et al.*, 2007; Mustafa, 2009). Em *Brachiaria* spp., a protodioscina tem sido a principal saponina encontrada (Brum *et al.*, 2007; Santos Júnior, 2008; Brum *et al.*, 2009; Riet-Correa *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2011).

A protodioscina possui massa molecular de 1048g/mol, fórmula C₅₁H₈₄O₂₂ (Figura 3), sendo denominada quimicamente como (25*R*)-furost-5-ene-3β,22α,26-triol 3-*O*-α-*L*-ramnopiranosil-(1→4)-[α-*L*-ramnopiranosil-(1→2)]-β-*D*-glicopiranosil26-*O*-β-*D*-glicopiranoside (Ahmad e Basha, 2006; Lee *et al.*, 2009).

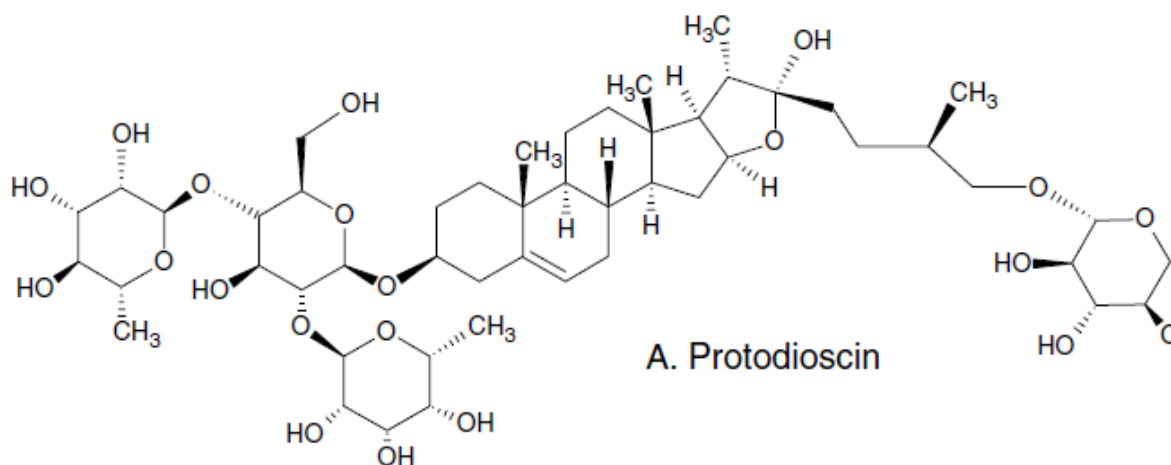


Figura 3: Estrutura química da saponina protodioscina (Lee *et al.*, 2010)

Estudo realizado por Lozano *et al.* (2017), o maior teor médio de protodioscina foi encontrada em *B. decumbens* ($1,98\% \pm 0,68\%$, com valores que variam de $0,59\%$ a $2,99\%$), seguido pelo híbrido ($1,74\% \pm 0,67\%$, $0,77\%$ a $3,68\%$) e *B. brizantha* ($1,09\% \pm 0,36\%$, $0,47\%$ a $1,81\%$). Um total de 77% das amostras continham concentrações de protodioscina acima de 1%, correspondendo a 30% para híbridos, 27% para *B. decumbens* e 20% para *B. brizantha*. A mínima concentração de protodioscina que causa intoxicação em ovinos, sendo a espécie mais sensível, parece ser 1% (Riet-Correa *et al.*, 2011).

3.4. CLIMA E IDADE DA PLANTA

Grande parte dos estudos mostra que as pastagens em brotação tem maior concentração de saponinas do que as plantas maduras (Santos Júnior, 2008) e as folhas jovens possuem mais saponina do que folhas maduras ou senescentes (Barbosa-Ferreira *et al.*, 2011). Entretanto, no estudo de Brum *et al.* (2009), as concentrações mais elevadas de saponina foram encontradas em pastagens maduras, e Souza *et al.* (2010) descreveram a ocorrência de surtos de intoxicação em qualquer época do ano. Segundo Mustafa (2009), a intoxicação por *Brachiaria* spp. em ovinos pode ocorrer em qualquer época do ano e em qualquer estágio da planta.

O efeito da maturidade na concentração de saponina é relatado por Castro *et al.* (2011), que verificaram concentrações dessa substância variando em um curto período de amostragem. As amostras de *B. decumbens* foram coletadas nos dias 15, 45 e 90 do crescimento, e as concentrações de saponina foram 2,03%, 1,63% e 1,26%, respectivamente.

Segundo Lima (2012), maiores concentrações de protodioscina (*B. decumbens* = 23,26 g/kg; *B. brizantha* = 18,6 g/kg) foram encontradas em plantas jovens, após 60 dias do plantio. Nas plantas após 360 dias do plantio, mais velhas, as concentrações de saponina foram baixas (*B. decumbens* = 10,28 g/kg; *B. brizantha* = 4,72 g/kg). A concentração de protodioscina diminuiu substancialmente durante o período entre 60 e 120 dias de crescimento.

Lozano *et al.* (2017) compararam três espécies de braquiárias e verificaram que, em relação ao tempo pós-corte, o híbrido (*B. ruziziensis* x *B. decumbens* x *B. brizantha*) apresentou níveis significativamente maiores de protodioscina aos 28 dias em quase todos os meses do ano, exceto outubro. O conteúdo de protodioscina foi menor em junho e depois aumentou linearmente nos dois seguintes tempos de amostragem atingindo seu nível máximo na estação seca. Neste período, o teor de protodioscina do híbrido era cerca de duas e três vezes superior à de *B. decumbens* e *B. brizantha*, respectivamente (Lozano *et al.*, 2017).

Pérez *et al.* (2016) verificaram maiores concentrações de protodioscina em *B. decumbens* e *B. brizantha*, que ocorreram durante o inverno. Já Lozano *et al.* (2017) perceberam que a concentração aumentou no período das secas. Se as saponinas esteroidais são utilizadas pela planta como mecanismo de defesa (Szakiel *et al.*, 2011), os níveis mais elevados de protodioscina encontrados na estação da seca poderia representar uma resposta de defesa dessas pastagens (Lozano *et al.*, 2017).

3.5. SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA À PROTODIOSCINA

Existem alguns fatores que aumentam a susceptibilidade animal à intoxicação com saponinas, entre elas espécies, idade e nenhuma exposição anterior ao pasto de plantas que apresentam este componente (Riet-Correa *et al.*, 2011). Como exemplo disso, existem relatos de animais que nunca tiveram contato anterior com *B. decumbens* sejam mais susceptíveis ao entrarem em contato pela primeira vez. Há poucos estudos que sugerem a existência de resistência por mecanismos de adaptação ou, talvez, por algum tipo de seleção natural (Riet-Correa e Mendez, 2007).

Os ovinos são considerados mais susceptíveis que os bovinos à intoxicação por *Brachiaria* spp. e podem estar sujeitos ao problema em qualquer idade (Lemos *et al.*, 1996; Santos Júnior, 2008) Alguns autores afirmam que os animais mais jovens são mais suscetíveis do que animais maduros (Albernaz *et al.*, 2010; Mustafa *et al.*, 2012).

Pupin *et al.* (2016), para avaliar a resistência á intoxicação por *Brachiaria* spp., separaram animais em dois grupos. Foram formados um grupo susceptível, com animais que apresentavam sinais de intoxicação, e um grupo resistente, com aqueles que não manifestavam esses sinais. As proles provenientes do grupo resistente e susceptível foram avaliadas durante dois anos e, posteriormente, colocadas em pastagem de braquiária (inicialmente *B. decumbens* e *B. brizantha* e, após o desmame, apenas *B. decumbens*). Foi observado que adoeceram apenas as crias do grupo susceptível, com seis animais evoluindo para óbito, enquanto no grupo resistente nenhum animal foi afetado. Os casos de toxicose por braquiária ocorreram, em sua totalidade, após o desmame. Neste estudo, as descobertas suportam a hipótese de que há resistência hereditária relacionada à intoxicação por *B. decumbens* em ovelhas, uma vez que a progênie de ovelhas resistentes não manifestou a intoxicação.

Segundo Castro *et al.* (2007), existe a possibilidade de que animais criados em pastagens de braquiária possam desenvolver capacidade de melhor biotransformar e

excretar a saponina esteroideal presente nesta planta. Outra possibilidade é o desenvolvimento de uma microbiota ruminal especial capaz de reduzir a concentração da toxina, evitando seus efeitos (Albernaz *et al.*, 2010). Ovelhas de rebanhos que nunca tiveram contato com espécies de braquiária são mais suscetíveis do que os machos criados com acesso livre à planta (Lemos *et al.*, 1996; Riet-Correa *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012; Faccin *et al.*, 2014). Mustafa (2009) relata que na espécie ovina, foi comprovado que animais criados em pastagens de *Brachiaria* spp. apresentam maior resistência à intoxicação do que os ovinos criados em outras pastagens.

Castro *et al.* (2009) observaram que ovelhas, após serem introduzidas em pastagens de *B. decumbens*, não apresentavam sinais clínicos, porém apresentavam elevação das enzimas GGT e AST, de forma semelhantes a ovelhas que apresentavam sinais clínicos, sugerindo que as primeiras possuíam resistência à intoxicação por braquiária. No mesmo sentido, Morris *et al.* (1991) relataram a importância da resistência genética à intoxicação associada ao eczema facial, a micotoxicose causada pela esporidesmina.

Riet-Correa *et al.* (2011) propuseram duas medidas para o uso seguro de *Brachiaria* spp. como pastagens. Uma dessas medidas é utilizar espécies e variedades de *Brachiaria* que sejam menos tóxicas. A outra medida é a seleção de animais resistentes, para que apenas esses sejam utilizados.

3.6. COR DA PELAGEM

Alguns autores sugerem que, em animais negros da raça Santa Inês, o único sinal de fotossensibilização é o edema periocular com olhos lacrimejantes, epífora e conjuntivite. Em ovelha lanadas, a dermatite é restrita ao rosto e às orelhas. Nos casos de maior evolução, as orelhas podem se apresentar espessadas e contorcidas devido à retração da cicatriz. Essas condições subagudas e crônicas podem afetar ovelhas nativas, bem como ovelhas criadas em pastagens de *Brachiaria* spp. (Santos Júnior, 2008; Mustafa, 2009; Saturnino *et al.*, 2010; Riet-Correa *et al.*, 2011).

Saturnino *et al.* (2010) sugerem que a pigmentação da pele é um aspecto importante clinicamente, pela possibilidade de menor predisposição ao aparecimento de lesões da fotossensibilização hepatógena. Dessa forma, esses autores relacionam a cor da pelagem ao aparecimento de sinais clínicos cutâneos, após a ingestão de *B. decumbens*. Os animais de pelagem escura não apresentaram lesões de pele características de fotossensibilização.

Da mesma forma, Santos Júnior (2008) observaram baixa frequência de lesões de pele em seu estudo, pois o único animal que possuía pelagem clara apresentou erosão e ulceração na pele, de um total de 12 animais intoxicados.

3.7. MECANISMO DA FOTOSSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA

Após a ingestão ou contato com pigmentos de plantas ou produtos secundários que são ultravioletas (UV) ou reativos à luz; os animais expostos à luz solar podem apresentar fotossensibilidade, que é definida como uma dermatite severa que resulta de uma maior reatividade das células da pele e dos tecidos cutâneos associados (Rowe, 1989).

A esporidesmina e as saponinas esteroidais causam fotossensibilização indiretamente, danificando hepatócitos e/ou dutos biliares, interrompendo a capacidade do fígado de excretar a filloeritrina no trato gastrointestinal por via biliar. O resultado é lesão hepática, mas a lesão geralmente não é suficientemente grave para resultar em morte rápida. Em vez disso, os herbívoros afetados geralmente apresentam algum grau de colestase durante pelo menos alguns dias (Quinn *et al.*, 2014).

Estudos sobre a cinética que ocorre no rúmen para que ocorra a degradação de saponina e seus efeitos no fígado são necessários, pois há pouco conhecimento sobre este assunto (Lima, 2012). A protodioscina e a dioscina são glicosídeos e são hidrolisadas no rúmen para produzir diosgenina. A diosgenina é então saturada e sofre epimerização no rúmen

formando epismilagenina, que é ainda conjugada com ácido glicurônico no fígado. A epismilagenina conjugada é altamente litogênica e pode ser depositada em canalículos, causando lesão hepática e obstrução ao fluxo biliar (Miles *et al.*, 1992, 1993).

Assim como em quaisquer reações químicas exógenas fora da planta envolvendo fotossensibilização, na planta, a molécula absorvente de luz, neste caso a filoteritina derivada da clorofila ou outra molécula reativa, é referida como o fotossensibilizador e a molécula que é alterada pelo fotossensibilizador, é referida como o substrato ou o aceitador. O cromóforo é a parte da molécula que absorve a luz de um intervalo de comprimento de onda específico. Todos os fotossensibilizadores contêm um cromóforo, pelo que a absorção de luz leva a mudanças fotoquímicas dentro da molécula que resultam em mudanças em outras moléculas associadas (como um substrato biológico). Se o fotossensibilizador fotoativado produz mudanças que envolvam oxigênio, o processo é referido como fotodinâmico. Alguns fotossensibilizadores, incluindo a clorofila, são endógenos na planta e estão fisicamente protegidos contra mudanças fotodinâmicas por maquinaria celular e localização no cloroplasto (Wallaart *et al.*, 1999; Yamori *et al.*, 2011).

Sendo um tipo de fitoporfirina, a filoteritina é produto do metabolismo da clorofila, ela é produzida no rúmen, durante a fermentação anaeróbia realizada pelos microorganismos (Quim *et al.*, 1935 citado por Oliveira, 2011a). O acúmulo de fitoporfirina no fígado e na pele do animal vai levar a fotossensibilização, e após exposição à luz solar esta molécula fotoativa será excitada, levando a lesões hepáticas, icterícia, problemas de pele, anorexia, alteração do sistema nervoso e em alguns casos, à morte (Riet-Correa *et al.*, 2011). As moléculas fotodinâmicas se acumulam na circulação sanguínea como resultado do pastejo e são então ativadas na pele com a presença de luz solar, após a circulação ou pelo contato direto. Os compostos ativados podem promover a degradação do DNA após a excitação com luz UV e/ou visível (Yamori *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012).

Na presença de radiação visível e UV as células da pele tornam-se altamente reativas por meio do aumento da foto excitação de moléculas fotodinâmicas (Quinn *et al.*, 2014). A produção de moléculas que resultam na geração de espécies reativas de oxigênio está associada à foto-oxidação na planta. Algumas espécies reativas de oxigênio podem resultar em danos nos radicais livres e algumas formas de oxigênio singlete como resultado do processo fotodinâmico, levando a uma eventual degradação do DNA em células vegetais (Smith *et al.*, 2012).

A pele de herbívoros possui mecanismos inatos para evitar a passagem de substâncias tóxicas para as camadas subcutâneas mais sensíveis. As células queratinizadas do estrato córneo (SC) representam uma barreira significativa para compostos lipofílicos e também oferecem resistência à difusão de moléculas polares de percorrer camadas subepidérmicas. Por isso, a epiderme tem um papel importante, pois fornece um alto nível de resistência ao transporte passivo de compostos bioativos. Os lipídios cutâneos atuam também como uma barreira à penetração dérmica de substâncias tóxicas; a extração ou quebra de lipídios epidérmicos podem aumentar a permeabilidade da pele à substâncias exógenas (Monteiro-Riviere *et al.*, 2001).

A matriz de lipídios da pele vai depender da idade e das espécies; as diferenças nas propriedades sub-celulares das camadas epidérmicas podem resultar em diferenças na capacidade de absorção entre herbívoros de pastagem, particularmente entre diferentes faixas etárias dentro da mesma espécie (Monteiro-Riviere *et al.*, 2001).

Em casos de lesão hepática, causada por alguma substância hepatotóxica, há prejuízos na eliminação da filoteritina que é ingerida por herbívoros, este composto deve ser eliminado através da bile de modo análogo à bilirrubina. Pelo fato da filoteritina ser um agente fotodinâmico, derivado da clorofila, após o impedimento da eliminação normal secundária à disfunção hepática, acontece o acúmulo de filoteritina no sangue e em tecidos. Ao se acumularem, as moléculas absorvem energia luminosa, e com a presença de oxigênio se excitam e sofrem diversas reações na derme. Por isso, o poder

fotosensibilizante da filoteritina se dá por reações com formação de radicais livres levando a peroxidação de lipídeos e perda das estruturas celulares (Spinosa *et al.*, 2008).

3.8.APRESENTAÇÕES CLÍNICAS

3.8.1. Tempo para aparecimento dos sinais clínicos

De acordo com os experimentos realizados por Santos Júnior (2008), o tempo entre a ingestão da planta e aparecimentos dos sinais clínicos pode estar associado a algumas variáveis, como a susceptibilidade e a adaptação dos ovinos, a quantidade de saponina na grama que pode variar de acordo com a época do ano, o estado fisiológico e o manejo de forragem.

No experimento de Santos Júnior (2008), foi demonstrado que a intoxicação por *Brachiaria* spp. em ovinos jovens ocorre entre 7 e 60 dias após serem introduzidos nas pastagens. No trabalho de Cruz *et al.* (2001), também de forma experimental, entre nove ovinos, apenas um animal demonstrou sinais de intoxicação aos 89 dias após a introdução do grupo em piquete de *Brachiaria decumbens*. Diversos fatores podem influenciar na grande variação do tempo de surgimento de intoxicação pela *Brachiaria* spp. nos surtos naturais observados no país onde ovinos foram acometidos; dentre eles a idade, variações na toxicidade da gramínea e diferenças na suscetibilidade dos animais (Mustafa *et al.*, 2012).

Conforme descrito por Saturnino *et al.* (2010), o início dos sinais clínicos aconteceu, em média, nos primeiros 36 dias de ingestão da gramínea. Há variação entre autores sobre o início do aparecimento dos sinais clínicos após o início do consumo da pastagem pelos ovinos. Desta forma, são descritos sinais clínicos após 7 dias (Santos Júnior, 2008), como citados acima, 14 dias (Albernaz *et al.*, 2010) e 21 dias (Graydon *et al.*, 1991); neste último caso, aconteceu em pastagens novas após eventos de precipitação fora da estação.

Mustafa *et al.* (2012) descreveram, em seus estudos, morbidade geral de 23,2% e a letalidade foi 88,3%. O período entre os animais estarem no pasto e o aparecimento dos sinais clínicos de intoxicação por *Brachiaria* spp. foi de 15 dias até mais de 12 meses. O curso clínico da intoxicação variou de 2 a 45 dias. Já Riet-Correa *et al.* (2011) descreveram que a apresentação clínica subaguda a crônica com período de manifestação clínica de 15 a 45 dias é a mais frequente.

3.8.2. Sinais clínicos

Na apresentação clínica subaguda ou crônica, o animal pode apresentar anorexia, depressão, perda de peso, inchaço do rosto e ouvidos, conjuntivite, secreção ocular e nasal, cegueira, fotofobia com movimentos contínuos da cabeça, icterícia e dermatite do rosto e das orelhas. Nos animais de pele branca, a dermatite pode ocorrer em outras áreas da superfície corpórea (Riet-Correa *et al.*, 2011). Para Pupin *et al.* (2016), os sinais clínicos consistiram em graus variados de edema subcutâneo da face e eritema e perda de pelo das orelhas, crostas na pele das orelhas, em torno dos olhos e no plano nasal e, deformações cicatriciais das orelhas e secreção ocular bilateral, alguns muito semelhantes a outros casos.

O único sinal de fotossensibilização em animais de pelagem negra, da raça Santa Inês, é secreção ocular e edema periocular, epífora e conjuntivite. A dermatite é restrita ao rosto e às orelhas em ovelhas de lã. Já nos casos de maior evolução, as orelhas podem estar espessadas e contorcidas devido à retração da cicatriz (Santos Junior, 2008; Mustafa, 2009; Saturnino *et al.*, 2010).

3.8.3. Achados de Necropsia

Além da dermatite, as principais lesões macroscópicas são: icterícia, fígado aumentado de volume, amarelado ou acastanhado, vesícula biliar distendida com parede edematosa,

edema subcutâneo, ascite, hidropericárdio, hidrotórax e atrofia da gordura visceral. O rim pode estar escuro e a urina marrom escuro. Em casos mais agudos sem dermatite, as principais lesões são edema subcutâneo, hepatomegalia, icterícia e distensão da vesícula. Em casos crônicos, o fígado pode mostrar um padrão lobular aumentado, maior consistência ou uma superfície irregular espessa e esbranquiçada (Lemos *et al.*, 1996; Riet-Correa e Mendez, 2007; Mendonça *et al.*, 2008).

Durante a necropsia em seis cordeiros foram encontrados mucosas pálidas, emaciação, dermatite, deformação cicatricial das orelhas, fígados amarelos e grandes com padrão lobular marcado e infestação moderada por *Haemonchus contortus* (Pupin *et al.*, 2016). Fígado amarelado com padrão lobular aumentado difuso, maior consistência e espessamento da cápsula também podem ser observados em matadouros de ovelhas criadas em pastagens de *Brachiaria* spp. (Riet-Correa *et al.*, 2011). Saturnino *et al.* (2010) relata a ocorrência de icterícia acentuada na maioria dos ovinos necropsiados, enquanto outros autores descrevem a sua ausência ou de intensidade leve a moderada (Brum *et al.*, 2007; Santos Júnior, 2008).

3.8.4. Histologia

Os achados histológicos das lesões hepáticas relatados por Pupin *et al.* (2016) foram: alteração da arquitetura da trabécula hepatocelular, aglomerados de macrófagos espumosos formando ocasionalmente células gigantes multinucleadas, hepatócitos edemaciados e vacuolados, cristais ou imagens negativas de cristais no sistema biliar, estase biliar, proliferação do ducto biliar e infiltrado linfoplasmocítico nas tríades portais. Na pele, foi encontrado foto dermatite caracterizada por necrose epidérmica, hiperqueratose e infiltrado neutrofílico dérmico. As lesões descritas foram encontradas de forma semelhante em todos os cordeiros necropsiados, mas com diferentes graus de gravidade.

Riet-Correa *et al.* (2011) descrevem que a principal lesão histopatológica é a presença de cristais nos canais biliares, em macrófagos ou hepatócitos. A intoxicação por *Brachiaria* spp. tem como característico a presença de macrófagos espumosos, se essa característica for observada, deve ser interpretada com cautela, pois essas células também podem ser observadas em animais sem sinais clínicos criados em pastagens de *Brachiaria*.

Driemeier *et al.* (1999) avaliaram 55 fígados de bovinos coletados nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, entre os anos 1970 e 1991, de animais alimentados por pastagens conhecidas. Os macrófagos espumosos só foram encontrados a partir de 1976; antes disso, entre os anos 1970 e 1975, não foram encontrados. Isso corresponde com a introdução da *Brachiaria decumbens*, variedade australiana, no Brasil.

Quando isoladas as células dos primeiros casos de macrófagos com o citoplasma espumoso (ou *foam cells*), no fígado de bovinos, em 1976, estas células eram difíceis de diferenciar dos hepatócitos adjacentes, mas quando formavam aglomerados ao redor das veias centrolobulares, eram mais bem reconhecidas, podem também formar células multinucleadas. Há focos em que os macrófagos podem ter citoplasma pouco evidente e associado a linfócitos, podendo haver neutrófilos em meio a restos de hepatócitos necróticos. Quando observados com objetiva de imersão, os macrófagos espumosos, por vezes, apresentam estruturas com imagens negativas de cristais, semelhantes a fendas de colesterol (Driemeier *et al.*, 1999).

Os macrófagos podem medir de 14 a 70 μm , podem se apresentar isolados ou em grupos de 3 a 50 células (Souza *et al.*, 2010), podendo chegar a mais de 200 células com vacuolização citoplasmática fina e núcleos centrais ou periféricos podem ser encontrados (Riet-Correa *et al.*, 2011). Há estudos em que um grande número de macrófagos espumosos isolados, às vezes contendo cristais, foram encontrados nos sinusoides em casos agudos de intoxicação em ovelhas (Driemeier *et al.*, 2002; Santos Júnior, 2008; Mustafa, 2009).

Resumindo, as características da intoxicação por *Brachiaria* spp. são a presença de cristais birrefringentes ou imagens negativas desses cristais nos canais biliares, macrófagos e hepatócitos (Lemos *et al.*, 1996, 1998; Driemeier *et al.*, 2002; Santos Júnior, 2008; Silveira *et al.*, 2009) e a presença de macrófagos com citoplasma espumoso, às vezes contendo cristais (Driemeier *et al.*, 1998, 1999, 2002; Gomar *et al.*, 2005; Santos Júnior, 2008; Moreira *et al.*, 2009). Já nos rins, podem ser encontrados imagem negativa de cristais, ocasionalmente associadas a células gigantes multinucleadas (Brum *et al.*, 2007), e dilatação de túbulos contorcidos e necrose de células epiteliais (Mendonça *et al.*, 2008).

3.8.5. Avaliação da bioquímica sérica

Nas intoxicações por *Brachiaria* spp. são relatadas elevações nas atividades séricas das enzimas gama glutamiltransferase (GGT) (Brum *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2008; Santos Júnior, 2008) e aspartato aminotransferase (AST) (Santos Júnior, 2008), além dos níveis de bilirrubina (Brum *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2008; Santos Júnior, 2008). Os valores de AST e GGT indicam que há aumento significativo da atividade destas enzimas nos ovinos que apresentaram sinais de intoxicação, quando comparados com os ovinos que não adoeceram (Saturnino *et al.*, 2010).

A ocorrência de estase biliar está relacionada com o aumento da atividade sérica de GGT, que é uma enzima de indução, que está presente em membranas celulares e o aumento no soro pode ser devido a um estímulo que resulta em sua maior liberação pelas células ou pela liberação de fragmentos de membranas que contêm esta enzima (Thrall *et al.* 2006).

O aumento da atividade de GGT sérico acontece pela solubilização da enzima aderida à membrana celular sendo liberada na corrente sanguínea em consequência da ação de detergente dos ácidos biliares nos casos de estase biliar. Os ruminantes apresentam

estreita amplitude sérica de GGT, o que torna esta enzima mais sensível e específica no diagnóstico de estase da bile (Stockham e Scott, 2011).

Alguns autores relatam que o aumento dos níveis de GGT no soro é um bom preditivo do início da intoxicação por *Brachiaria* spp., tendendo a permanecer alto por um período mais longo (Fagliari *et al.* 1994; Castro *et al.* 2007; Santos Júnior, 2008; Saturnino *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2011). Porém, alguns autores relatam que o aumento dos níveis de AST e GGT não se correlacionou com a gravidade da intoxicação (Santos Júnior, 2008; Castro *et al.*, 2007, 2009).

Saturnino *et al.* (2010) trabalharam com animais da raça Santa Inês, de pelagem escura com média de três meses de idade, recém-desmamados, oriundos de propriedade onde nunca havia sido utilizado *B. decumbens* como fonte alimentar. Os autores descrevem que a ocorrência do início de sintomatologia prevaleceu após a elevação da atividade da enzima GGT. Os mesmos autores citam que estas enzimas seriam úteis para triagem se realizadas em amostra significativa do rebanho, a fim de reduzir perdas econômicas e permitir que os ovinos sejam retirados da pastagem antes do aparecimento dos sinais clínicos. Porém, Santos Júnior (2008) descreve que mesmo aumentos consideráveis de AST e GGT não podem ser correlacionados com o diagnóstico e prognóstico da intoxicação, quando os casos são analisados individualmente, pois alguns ovinos sem sinais clínicos apresentaram elevações nos níveis de atividade destas enzimas.

3.9. FORMAÇÃO DOS CRISTAIS

Brachiaria spp. contém saponinas esteroidais que foram associadas à deposição de cristais no sistema biliar e colangite. Estas saponinas foram isoladas da bile e cristais biliares de ovelhas alimentadas com essa planta (Holland *et al.*, 1991; Miles *et al.*, 1993; Miles *et al.*, 1994).

Há autores que relataram a presença de cristais no fígado de ovinos (Lemos *et al.*, 1996; Driemeier *et al.*, 2002; Brum *et al.*, 2007), que são encontrados no sistema biliar de animais intoxicados; estes cristais foram relatados como sais insolúveis de glicuronato de episarsasapogenina e epismilagenina, sendo considerados produtos da detoxificação das saponinas (Flåøyen, 1996).

Foi proposto que a hidrólise das saponinas litogênicas resulta em sapogeninas de diosgenina e yamogenina que, depois de serem metabolizadas no trato digestivo, produzem epismilagenina e episarsasapogenina (McDonough *et al.*, 1994; Cruz *et al.*, 2001). A desintoxicação destes compostos acontece por conjugação com ácido glicurônico, gerando glicuronídeos que se ligam a íons de cálcio para formar um sal insolúvel depositado na forma de cristais (Lee *et al.*, 2009; Riet-Correa *et al.*, 2011), que são os que causam danos nos rins e fígado (Barbosa-Ferreira *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2011) e causam colangiohepatopatia com obstrução das vias biliares (De Oliveira *et al.*, 2013).

As duas sapogeninas, epismilagenina e episarsasapogenina, diferem apenas na sua configuração em torno do carbono 25, assim como a diferença entre protoneodioscina (A) e protodioscina (B). A episarsasapogenina e a epismilagenina são consideradas os produtos da biotransformação das saponinas A e B, respectivamente (Pérez *et al.*, 2016). Lajis *et al.* (1993) isolaram epismilagenina e episarsasapogenina a partir do conteúdo do rúmen dos carneiros intoxicado por *B. decumbens*.

3.10. DETECÇÃO DE PROTODIOSCINA

Para determinação do teor da saponina protodioscina nas plantas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é considerada a técnica mais precisa e comumente utilizada (Oleszek, 2002). Ganzera *et al.* (2001) relatam que as saponinas tem problema de detecção pela falta de cromóforos UV, apresentando sinal baixo neste tipo de detecção. Deste modo, o uso de espalhamento de luz evaporativo (ELS) foi utilizado para determinar o conteúdo de saponina em *T. terrestris*. Por outro lado, Lee *et al.*

(2010) descreveram um método utilizando HPLC que emprega um detector de UV, onde os limites de detecção de quantificação para protodioscina foram de 1,6 µg/mL e 3,13 µg/mL, e a linearidade foi observada entre 3,13 µg/mL e 1000,0 µg/mL. Assim, estes autores concluem que o detector UV poderia ser utilizado para a detecção de protodioscina de forma eficiente.

Pérez *et al.* (2016) compararam *B. decumbens* e *B. brizantha*, e verificaram que não houve diferença significativa na concentração de protodioscina entre os dois tipos desta planta. Desta forma, a ideia de que a presença de protodioscina é a única causadora de intoxicação deve ser reconsiderada, podendo o conteúdo de saponina, não ser a única explicação para a diferença fitoquímica entre as duas.

Lozano *et al.* (2017) dosaram a protodioscina em um híbrido *B. ruziziensis* x *B. decumbens* x *B. brizantha*, que apresentou os níveis mais altos de protodioscina durante a seca (3,37%). Os resultados encontrados no ensaio mostram que o híbrido pode conter o mesmo ou até níveis mais elevados do que *B. brizantha* e *B. decumbens*, fazendo deste tipo de gramínea uma ameaça potencial para fotossensibilização secundária (Lozano *et al.* 2017).

É importante considerar que outras saponinas com diosgenina, cujos metabólitos induzem lesões hepáticas, também foram identificado em *B. decumbens* e *B. brizantha* (Pires *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2011).

3.11. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE SAPONINA

Uma estratégia para reduzir o risco de intoxicação por protodioscina após o consumo de *Brachiaria* spp. seria realizar a ensilagem ou fenação destas forragens, e fornecê-los aos animais de produção (Lima *et al.*, 2015). Neste trabalho foram dosados os níveis de protodioscina antes e após o preparo do feno ou da silagem, com o passar dos dias, a dosagem da saponina continuou a ser feita para verificar mudanças na quantidade de

protodioscina detectada uma vez que o feno reduz o teor de protodioscina. Usar as gramíneas sob a forma de feno poderia ser uma alternativa para evitar intoxicação por saponina também segundo Lozano *et al*(2017).

Lima (2012) avaliou a ensilagem como uma alternativa de diminuir o teor de protodioscina na planta, e observou que as amostras de *Brachiaria* ensiladas não tiveram concentrações detectáveis de saponina protodioscina depois de 24 dias de ensilagem. Também em *B. decumbens*, a concentração de protodioscina reduziu 36% do primeiro ao terceiro dia após a fenação e posteriormente manteve-se constante.

Para reduzir as populações de *P. chartarum* em pastagens, Di Menna *et al.* (2009) relataram aplicação de spray de fungicidas de tiabendazol e, posteriormente, protegendo animais com doses orais de zinco. O limitante da administração do zinco é que a dose está em níveis próximo ao tóxico, além de ser importante a seleção de animais resistentes após o desafio à esporidemia, sendo este o melhor método de controle de longo prazo.

3.12. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

A LC-MS/MS nada mais é que instrumento analítico para separar e identificar compostos químicos, além disso, consiste em separar os constituintes da amostra possibilitando a determinação de multianalitos em matriz complexa com ótima seletividade e sensibilidade, e oferece informação estrutural e da massa molar dos analitos (Chlaradla *et al.*, 2008; Demoliner, 2008; Rodrigues, 2011; Amparo, 2013).

Os elementos que compõem o espectrômetro de massas são: sistema de injeção da amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detector de massa e o sistema de software para aquisição das amostras (Demoliner, 2008).

Um ou mais analisadores de massa podem ser utilizados nos aparelhos de cromatografia, com a finalidade de identificar compostos que estejam com baixas concentrações nas matrizes muito complexas (Demoliner, 2008) ou quando há um grande número de analitos e é necessário os separar (Amparo, 2013). Para que os resultados sejam analisados após sua detecção há um sistema de software que mostra o resultado por meio de um cromatograma contendo a relação dos íons em razão da massa e carga (Chlaradla *et al.*, 2008).

3.13. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Para que uma nova técnica de cromatografia seja criada, é necessário que seja feito um processo de validação do método analítico, estudos experimentais e busca de evidências objetivas, de forma que as exigências das aplicações analíticas sejam atendidas. Assim, é assegurada a reprodutibilidade e confiabilidade da metodologia utilizada em um novo método. Alguns parâmetros analíticos devem ser estudados durante a validação, como seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (ANVISA, 2003; Ribani *et al.*, 2004; Demoliner, 2008; INMETRO, 2009; Amparo, 2013). Para isso, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (Ribani *et al.*, 2004; De Souza, 2007; Sante, 2015).

A seletividade é a capacidade do método de determinar acuradamente e especificamente o analito de interesse mesmo na presença de possíveis interferentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz sob as condições iniciais do ensaio (ANVISA, 2003; Eurachem, 2014). A matriz, ou seja, a base da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem prejudicar o sinal. Então, para avaliar a seletividade, os experimentos para validação do método devem conter etapas utilizando padrões ou materiais de referência, amostras

brancas com e sem o analito desejado, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (De Souza, 2007; INMETRO, 2009).

A sensibilidade é quando, com determinado nível de confiança, o método consegue diferenciar duas concentrações próximas (Brito *et al.*, 2003; INMETRO, 2009). Métodos que possuem boa sensibilidade, frente à pequena diferença na concentração do analito, apresentam suficiente variação no valor do sinal analítico medido. Isso demonstra a capacidade do método analítico gerar variação no valor da substância monitorada ou medida, seja alteração na concentração ou na quantidade do analito (Brito *et al.*, 2003).

A linearidade é a capacidade do método analítico em permitir resultados proporcionais em relação à concentração do analito em uma determinada faixa de aplicação. Nada mais é do que uma expressão matemática utilizada para o cálculo da concentração do analito a ser estabelecido na amostra real (INMETRO, 2009). A equação da reta é: $y = ax + b$; onde: y = resposta medida (área do pico); x = concentração; a = interseção como eixo y , quando $x = 0$; b = inclinação da curva analítica (sensibilidade). No mínimo cinco níveis de concentração, incluindo a amostra zero, são recomendados pela União Europeia (DIRECTIVE 657, 2002) para serem empregados na construção da curva analítica. Para a linearidade, devem ser descritos a faixa de trabalho, a equação matemática e o modelo de regressão linear aplicado na construção da curva.

O LOD é estabelecido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança que a concentração do analito seja maior que zero. Equivale à menor concentração do analito a ser detectada, não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas.

A exatidão é um dos critérios mais importantes para avaliar o desempenho de um método analítico, pois representa a existência de erros sistemáticos (DIRECTIVE 657, 2002; INMETRO, 2009). A concordância entre o resultado de um método em estudo em

relação ao valor verdadeiro de um mensurado é expressa pela exatidão, que é definida após estabelecer a linearidade, o intervalo linear e a especificidade a partir de três concentrações (alta, média e baixa) com, no mínimo, duplicata de cada concentração. São aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos (INMETRO, 2009).

A precisão avalia a dispersão de resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções de referência avaliadas em condições específicas. A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Ribani *et al.*, 2004; De Souza, 2007), que normalmente são dependentes da concentração do analito e precisam ser determinadas para diferentes concentrações. A característica da dispersão dos resultados de medições sucessivas de um mesmo método é determinada pela repetibilidade sob as mesmas condições, em várias concentrações na faixa de trabalho. A reprodutibilidade determina o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra analisada em dias, analista ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado após a aprovação Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias e Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFGM) e pelo Comitê de Ética da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos e Ovinos.

4.1. LOCAL

Os ensaios com os animais foram realizados no Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos e Ovinos da EMBRAPA, núcleo Sudeste, na Fazenda Gado de Leite, em

Coronel Pacheco, Minas Gerais (latitude -21,56 S, longitude 43,25 W e altitude 435 m). O processamento das amostras e demais análises foram realizados na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2. SURTO DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO

Um surto de fotossensibilização hepática afetou ovinos machos, mestiços da raça Santa Inês, com pelagem marrom e preta, com idades variadas, mantidas em pastagens de *Brachiaria ruziziensis*. Os casos ocorreram durante os meses de abril de 2016 a fevereiro de 2017, principalmente após o período de chuvas, iniciado em setembro de 2016. Dentre os animais afetados, estavam animais provenientes da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos/SP onde pastejavam *Panicum maximum* cv. Tanzânia, ou seja, até então, nunca haviam tido contato com *Brachiaria* spp.

Estes ovinos foram matriculados em um experimento para avaliar os aspectos nutricionais de um novo clone de *B. ruziziensis* (denominado provisoriamente como Recombinante), desenvolvido para ser resistente a *spittlebugs* (insetos da ordem Homoptera, família Cercopidae, gêneros *Zulia*, *Mahanarva* e *Deois*) e compará-lo ao cultivar comercial cv. Kennedy. Todos os animais recebiam dieta diária com pastagem, sal mineral e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em dois tratamentos (Recombinante e Kennedy), cada tipo de tratamento teve uma repetição. Primeiramente, em Abril de 2016, 20 animais foram introduzidos, parte nos piquetes com um novo clone de *B. ruziziensis* e parte em piquete com Cv. Kennedy. Em dezembro, foram introduzidos outros 40 ovinos nos mesmos piquetes, estes nunca tinham tido contato com *Brachiaria* spp.

Durante o período do experimento foram observados 13 casos de fotossensibilização nos animais alojados em piquetes tanto do tratamento Kennedy quanto do tratamento Recombinante. Os animais apresentavam sinais clínicos como, icterícia generalizada,

apatia, inapetência, desidratação e fotossensibilização, caracterizados por edema facial e lesões cutâneas crostosas, principalmente sobre o focinho e orelhas, busca pela sombra e lacrimejamento. Os animais que apresentavam doença eram retirados do pasto no mesmo dia em que os sinais foram detectados e colocados em um local apropriado e com sombra. Receberam tratamento clínico em função dos sintomas apresentados; a alimentação destes animais era à base de ração (20% de PB), silagem e água. Os ovinos mantidos em piquetes com outras variedades de pastagens não apresentaram sinais clínicos.

4.2.1. Divisão dos grupos

Os animais foram distribuídos em três grupos:

GFTS – grupo de 5 animais que apresentaram sintomatologia de fotossensibilização após serem alimentados por *Brachiaria ruziziensis* tanto do tratamento Kennedy quanto do tratamento Recombinante e foram posteriormente encaminhados para tratamento;

GSF – grupo de 21 animais sem sinais clínicos mas que entraram nos piquetes de *Brachiaria ruziziensis*;

GSC – Grupo de 7 animais sem contato com *Brachiaria ruziziensis*.

4.3. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

4.3.1. Plantas

Foram coletadas 64 amostras de *Brachiaria ruziziensis* das variedades Kennedy e Recombinante para análise de determinação dos níveis de protodioscina e da quantidade de esporos de *P. chartarum*. As amostras foram coletadas em três períodos de crescimento: simulado (tecido vegetal passível de ser consumido), brotação e macega

(ou material morto na base das touceiras). As amostras de simulado e brotação foram utilizadas para determinação dos níveis de protodioscina para avaliar a diferença de concentração da saponina entre elas, enquanto as amostras de macega foram utilizadas para as contagens de esporos, pois possui folhas antigas e materiais em decomposição, favorecendo o crescimento do fungo (Lima, 2012). Foram realizadas coletas em 8 momentos, nos dias 03, 09, 15 e 24 de Fevereiro, dias 08, 20 e 29 de Março e dia 04 de Abril de 2017. As amostras foram congeladas a -20°C até o momento das análises.

4.3.2. Amostras de sangue

Foram realizadas coletas de sangue de 33 animais em dois momentos, nos dias 3 e 9 de fevereiro de 2017, de três grupos diferentes: GFTS, GSF e GSC. Sendo 5 amostras do GFTS, 21 amostras do GSF e 7 amostras do GSC por coleta,

Foram coletados 5 ml de sangue total por meio de punção de veia jugular, utilizando-se sistema a vácuo em frascos sem anticoagulante. Após coagulação da amostra os tubos foram centrifugados a 2000 rpm, durante 6 minutos para obtenção do soro, que foi encaminhado para o laboratório de Toxicologia Animal EV-UFMG e congelado a -20°C até o momento das análises bioquímicas.

4.4. TESTES BIOQUÍMICOS

Trinta e três amostras de soro de ovinos passaram por dosagem da bioquímica sérica, realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da EV-UFMG, em analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus-Roche[®], Montclair, NJ, EUA) com os kits bioquímicos específicos (Bioclin[®], Belo Horizonte, MG). Os analitos foram avaliados em duplicata sendo eles: aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), proteínas totais, albumina, glicose, ureia e creatinina. O preparo dos reagentes bem como as técnicas de análise seguiram as indicações do fabricante dos kits.

4.5. NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA

A necropsia foi realizada em um animal que foi a óbito em consequência da fotossensibilização (não houve eutanásia de nenhum animal). Neste caso, o animal veio a óbito no dia 7 de novembro de 2016, e a necropsia foi realizada nas estruturas da EMBRAPA. Os fragmentos de diversos órgãos (rins, fígado, pulmão e pele e cérebro) foram colocados em solução de formol 10% e o cérebro e partes maiores de órgãos em álcool 70% e encaminhados à EV/UFMG para análise histopatológica.

Os fragmentos fixados foram processados de acordo com métodos histológicos de rotina, incorporados em parafina, cortados com 5 mm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE) no laboratório de Patologia Animal no Setor de Clínica e Cirurgia Veterinárias da EV/UFMG.

4.6. CONTAGEM DE ESPOROS DE *P. chartarum*

Os esporos do fungo *P. chartarum* foram contados de acordo com a descrição de Dingley (1962). Para essa contagem, foi feita uma adaptação da técnica de Di Menna e Bailey (1973). As amostras da planta foram cortadas em pedaços de 2 cm, e 10 gramas de planta foram misturados manualmente em 100 mL de água e misturadas durante 1 minuto. Posteriormente, os esporos foram contados em câmara de contagem de microscópio (hemocitômetro). Após a contagem dos esporos, o valor obtido é multiplicado por 5.000, fornecendo a quantidade de esporos em 1g de forragem.

4.7. DETERMINAÇÃO DA PROTODIOSCINA

4.7.1. Reagentes químicos

Acetonitrila e o metanol de grau MS, fornecidos pela Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e Merck Company (Darmstadt, Alemanha), respectivamente. O ácido fórmico de

grau cromatográfico e adquirido da Sigma Aldrich. A água foi purificada com sistema de purificação de água Milli-Q (18,2 Ω , Millipore Co., MA, EUA). Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico superiores e obtidos a partir de fontes comerciais. O padrão de protodioscina isolada a partir de *Dioscorea sinoparviflora* foi adquirido da empresa Sigma Aldrich com pureza $\geq 98\%$.

4.7.2. Preparação de soluções de estoque e trabalho

A solução estoque do padrão foi preparada em acetonitrila-água 50:50 v/v a uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. As soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 50,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Todas as soluções foram armazenadas a -25°C para o uso subsequente.

4.7.3. Preparação do extrato da planta

A extração da saponina protodioscina das amostras de toda parte aérea de *B. ruziziensis* foi realizada no Laboratório de Toxicologia da EV/UFMG, utilizando uma adaptação da metodologia descrita por Lima *et al.* (2012). Foi pesado 0,5 gramas das folhas de *B. ruziziensis* seca e moída e adicionado a 10 mL de acetonitrila-água 50:50 v/v. A amostra foi então extraída em ultrassom durante 30 min e depois centrifugada (2000 rpm x 6 min) para recuperar o sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, adicionando a cada vez 5 mL de acetonitrila-água 50:50 v/v ao sedimento. Os extratos obtidos foram reunidos e completados para um volume de 25 mL utilizando balão volumétrico. Cada extrato foi filtrado através de uma membrana de PTFE de 0,22 μm (politetrafluoroetileno) e foi armazenado em congelador a -25°C para posterior análise.

4.7.4. Preparação dos padrões

Extratos de matriz branca fortificados foram preparados a partir de quantidades apropriadas das soluções estoque/trabalho para construção da curva em matriz com padrões nos níveis 0,1; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg/mL.

4.7.5. Equipamento e condições de LC-MS/MS

Para detecção e quantificação da protodioscina nas amostras de *B. ruziziensis*, as análises em UPLC-MS foram realizadas utilizando um espectrômetro de massa Xevo G2 S Q-TOF (Waters) equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Waters). A análise cromatográfica foi realizada em um sistema Waters ACQUITY UPLC® I-Class (Waters, Milford, MA, USA) equipado com uma bomba binária, uma bomba degaseificadora, um compartimento de coluna termostato e um auto-amostrador. A separação da amostra foi realizada em uma coluna ACQUITY UPLC® BEH C8 (130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 50 mm).

A fase móvel consistiu em 70:30 solvente A (5 mM acetato de amônio em água-metanol, 90:10, v/v) e solvente B (acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico) e foi eluída a uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min em modo isocrático. O tempo de corrida cromatográfico foi de 3 minutos, o volume de injeção foi de 5 µL e a agulha foi enxaguada com 50% de metanol. A temperatura da coluna e do amostrador automático foi ajustada a 35 °C e 6 °C, respectivamente. As condições da espectrometria de massa ESI foram: temperatura da fonte 120 °C, temperatura de dessolvatação 450°C, fluxo de gás de dessolvatação 800 L/h, tensão capilar 3,0 kV, tensão do cone de amostragem 40 V e tensão da fonte 80 V.

O instrumento foi configurado para adquirir dados no intervalo m/z 50-1200 com um tempo de varredura igual a 0,5 s. Os dados foram coletados nos modos de ionização *eletrospray* positiva (ESI +) usando a função MS^E no modo centróide, com uma energia de colisão de 6 V na função 1 (pesquisa dos íons precursores) e uma rampa de energia de colisão de 10-50 V na função 2 (pesquisa de íons fragmentos). Leucina Enkephalin

(MW = 555.62 Da) (1,0 ng/ μ L) foi utilizada como a massa de bloqueio para correção de mudança de massa. O espectrômetro de massa foi calibrado antes das análises usando solução de ácido fosfórico a 0,1% em acetonitrila-água 50:50 v/v.

4.7.6. Aquisição e processamento dos dados

O software Waters MassLynx™ v.4.1 foi utilizado para aquisição de dados, e os software TargetLynx™ e ChromaLynx™ foram utilizados para processamento de dados. O modo MS^E coleta dados de verificação completa de íons de precursores e produtos alternando energia de colisão baixa (CE) e varreduras CE elevadas na mesma experiência.

Durante todo tempo de corrida, este modo fornece informações espectrais sobre compostos alvo, bem como padrões de fragmentação, para auxiliar na elucidação estrutural. Como tal, a abordagem MS^E é frequentemente usada para os fluxos de trabalho de triagem Quan-Qual. Na MS^E, os analitos que alcançam a fonte de massa após a UPLC são submetidos à ionização em modos de colisão de baixa e alta energia alternando a média frequência (cerca de 30 Hz). Todas as moléculas que ionizam em baixa energia de colisão são detectadas e identificadas como íons precursores. Alguns milésimos segundos depois, mudar para o modo de colisão de alta energia induz a fragmentação dos íons precursores e a detecção quase simultânea de íons fragmentados. Como consequência, uma mistura complexa de metabólitos pode ser analisada em uma única corrida, nenhum íon precursor é selecionado para fragmentação individual, e os íons fragmentos podem estar relacionados aos seus precursores usando um software de fragmentação em massa e bancos de dados de massas de alta resolução.

Em um primeiro passo, as soluções padrão de protodioscina foram submetidas à análise de MS^E e um banco de dados pessoal, incluindo a fórmula empírica de íons observados, tempo de retenção (Rt) e a maioria dos fragmentos de diagnóstico na função 2 foi criado usando o editor de texto do bloco de notas. O extrato da planta foi então submetido à

MS^E e os dados obtidos (Rt, massas precisas de precursores e fragmentos) foram comparados aos valores registrados no banco de dados padrão pelo software ChromaLynx[™], para confirmar a presença ou ausência dos analitos. O TargetLynx[™] automatiza a aquisição, o processamento e a geração de relatórios de dados, incorporando uma ampla gama de verificações de confirmação que identificam amostras fora dos limiares regulatórios, proporcionando confiança em resultados quantitativos. As opções de processamento ajustáveis para quantificação e confirmação específicas para protodioscina foram m/z 1031,54 > 869,48 [M + H - H₂O]⁺ (pares de íons de precursores / fragmentos). Cada amostra foi analisada em triplicata.

4.8. MÉTODO DE VALIDAÇÃO

4.8.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método analítico diferenciar os analitos alvo de outros componentes não relacionados presentes na amostra. Esta análise foi realizada através da avaliação de seis repetições de extratos brancos de plantas. Os cromatogramas das amostras em branco foram comparados com aqueles que foram fortificados com analitos para investigar se os íons alvo tinham ou não o mesmo tempo de retenção com os compostos de interferência endógena das amostras. O tempo de retenção do analito foi de 1,37 minutos.

4.8.2. Efeito matriz

O efeito da matriz é o efeito sobre um método analítico causado por todos os outros componentes da amostra, exceto o composto específico a ser quantificado. Uma curva de calibração foi construída por regressão linear com os padrões de calibração na solução solvente (acetonitrila-água 50:50 v/v). Em seguida, outra curva de calibração foi construída em matriz branca fortificada. A linearidade de ambas as curvas foi

estudada com *F*-test e *t*-test, então a avaliação do efeito matriz foi feita avaliando o paralelismo das curvas de resposta. O nível de significância (α) foi de no mínimo 0,05.

4.8.3. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A curva de calibração da protodioscina foi construída através da análise das amostras de extratos de plantas enriquecidos com a adição de protodioscina em três concentrações diferentes durante três dias consecutivos. Os valores da área de pico foram plotados em relação à concentração e as curvas de calibração foram construídas usando método dos mínimos quadrados ponderado para regressão linear. O coeficiente de correlação (*r*) e o coeficiente de determinação (R^2) também foram calculados. O limite de detecção (LOD), a menor concentração que produz uma resposta diferenciável do ruído, foi determinado usando a relação sinal-ruído de 3:1 e o limite de quantificação (LOQ) foi calculado como a concentração mínima calculada usando a relação sinal-ruído de 10:1. Esta análise foi realizada avaliando três amostras replicadas.

4.8.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada pelas médias dos estudos de repetibilidade e reprodutibilidade intra-laboratorial. Os valores intra- e inter-dia foram avaliados em três níveis de concentração em três repetições dentro do mesmo dia e em três dias sucessivos. A precisão foi expressa como o desvio padrão relativo (RSD) para detectar a distribuição da concentração medida.

4.8.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo método de recuperação. Três níveis de concentração em três repetições da protodioscina foram adicionados à matriz branca e, em seguida, a análise foi realizada no material branco, a partir da preparação da amostra

através da determinação cromatográfica. A comparação do valor encontrado com o valor adicionado forneceu a recuperação (%) do método.

4.8.6. Aplicação do método

Para confirmar a eficácia do método validado, foi dosado a protodioscina de amostras de *B. decumbens* de outros dois surtos de fotossensibilização em ovinos. Um surto ocorrido em Fortaleza, Ceará, e outro ocorrido em Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais. As amostras de *B. decumbens* destes casos passaram pelo mesmo processo de extração da protodiscina, e foram analisadas em LC-MS/MS da mesma forma, para que a aplicação do método fosse comprovada.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O número de esporos foi calculado pela média das quatro contagens por dia de coleta. Os resultados do número das análises bioquímicas estão apresentados como médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão (DP). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente usando o programa Graph Pad Prism versão 6. A homogeneidade das variâncias foi avaliada por meio dos testes de Bartlett e de Brown-Forsythe. As concentrações foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância estatística foi estabelecido como $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. SINAIS CLÍNICOS

Os casos de fotossensibilização começaram após o início das chuvas, no mês de setembro de 2016. Os sinais clínicos apresentados pelos ovinos incluíam icterícia generalizada, apatia, inapetência, desidratação e fotossensibilização, caracterizados por

edema facial e lesões cutâneas crostosas, principalmente sobre o focinho e orelhas, busca pela sombra e lacrimejamento. Não houve diferença entre os animais de pele escura e clara, ambos apresentaram o mesmo grau de severidade das lesões.

Dos 72 animais colocados em pastagens de *B. ruziziensis* para o experimento, inicialmente 25 animais tiveram sinais clínicos da doença onde 13 animais foram a óbito sendo, 7 animais na variedade Kennedy e 6 animais na variedade Recombinante, sete animais recuperaram e cinco ficaram em tratamento. Estes dados envolvem todos os animais utilizados para a avaliação do novo clone de *B. ruziziensis* e não apenas os animais cujo as amostras foram enviadas para avaliação laboratorial.

5.2. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA SÉRICA

Os resultados da avaliação bioquímica sérica estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Não houve diferença estatística entre grupos nas análises bioquímicas AST, albumina e colesterol. Porém o GFTS apresentou alteração do analito GGT, no dia 03/fev, em relação aos grupos GSC e GSF, entretanto, no dia 09/fev a diferença não permaneceu.

Os grupos não apresentaram diferença estatística na análise da ureia no dia 03/fev, mas no dia 09/fev, o grupo GSF foi estatisticamente diferente do grupo GSC. A creatinina, tanto no dia 03/fev quanto no dia 09/fev, o GFTS apresentou diferença estatística em relação aos outros dois grupos (GSC e GSF).

O GSC apresentou diferença estatística dos valores da glicose em relação aos grupos GSF e GFTS, tanto no dia 03, quanto no dia 09/fev. Os níveis de proteínas totais apresentaram diferença estatística no dia 03/fev, o GSC foi diferente dos outros dois grupos (GSF e GFTS) e no dia 09/fev o GSC foi diferente do GSF. Nas concentrações de globulinas, nos dias de análise, 03 e 09/fev, o GSC foi diferente dos grupos GSF e GFTS. Já a relação albumina:globulinas, no dia 03/fev, todos os grupos foram diferentes e, no dia 09/fev, o GSC foi diferente dos outros dois grupos, GSF e GFTS. Triglicérides

não apresentou diferença entre grupos no dia 03/fev, mas no dia 09/fev o GSC foi diferente do GSF.

Tabela 1. Valores das avaliações bioquímicas séricas de ovinos realizadas no dia 03/02/2017

		Ureia	Cre	AST	GGT	Gli	Prot	Alb	Glob	Col	Trig
GSC	Média	25,6 a	0,91 a	128,3 a	53,6 a	75,0 b	6,01 b	3,04 a	2,97 b	80,9 a	29,7 a
	DP	9,45	0,12	29,1	5,54	5,24	0,35	0,29	0,20	13,2	21,3
GSF	Média	36,2 a	0,93 a	142,3 a	55,2 a	62,9 a	6,61 a	3,01 a	3,60 a	73,9 a	11,3 a
	DP	5,62	0,07	19,4	12,8	7,06	0,25	0,16	0,24	29,9	4,57
GFTS	Média	71,0 a	1,63 b	421,5 a	160,6 b	59,6 a	6,95 a	2,55 a	4,40 a	73,2 a	27,2 a
	DP	60,5	0,45	488,0	93,5	17,2	0,98	0,48	0,83	35,1	32,3

Legenda: Cre – creatinina; AST – aspartatoanimotransferase; GGT – gamaglutamiltransferase; Gli – glicose; Prot – proteína total; Alb – albumina; Glob – Globulina; Col – colesterol; trig – triglicerídeos. GSC – Grupo sem contato com a planta; GSF – Grupo sem sinais clínicos mas que teve contato com a planta; e GFTS – grupo de animais que apresentaram sinais clínicos de fotossensibilização.

^{a,b} letras diferentes na mesma coluna indicam valores com diferença significativa ($P < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn)

Tabela 2. Valores das avaliações bioquímicas séricas de ovinos realizadas no dia 09/02/2017

		Ureia	Cre	AST	GGT	Gli	Prot	Alb	Glob	Col	Trig
GSC	Média	20,4 a	0,97 a	117,7 a	56,6 a	70,0 b	5,41 b	2,76 a	2,66 b	79,7 a	20,6 b
	DP	6,62	0,13	32,0	3,35	6,26	0,35	0,26	0,23	17,9	11,5
GSF	Média	35,6 b	1,04 a	129,1 a	53,7 a	54,1 a	5,95 a	2,75 a	3,20 a	63,1 a	9,0 a
	DP	5,80	0,13	20,8	13,3	9,22	0,49	0,26	0,45	19,5	2,66
GFTS	Média	63,6	1,67 b	434,6 a	115,8 a	49,0 a	6,04	2,23 a	3,81 a	74,2 a	30,4
	DP	64,3	0,53	493,4	75,1	10,1	1,55	0,44	1,26	29,3	30,7

Legenda: Cre – creatinina; AST – aspartatoanimotransferase; GGT – gamaglutamiltransferase; Gli – glicose; Prot – proteína total; Alb – albumina; Glob – Globulina; Col – colesterol; trig – triglicerídeos. GSC – Grupo sem contato com a planta; GSF – Grupo sem sinais clínicos mas que teve contato com a planta; e GFTS – grupo de animais que apresentaram sinais clínicos de fotossensibilização.

^{a,b} letras diferentes na mesma coluna indicam valores com diferença significativa ($P < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn)

5.3. NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA

Macroscopicamente, o animal apresentou crostas na face e orelhas (Figura 4), icterícia generalizada e os rins e fígado estavam firmes e esverdeados (Figura 5). Na histopatologia, o fígado mostrou infiltrado difuso de macrófagos espumosos (Figura 6), raras células multinucleadas, aumento discreto de volume dos hepatócitos (megalocitose). O fígado também apresentou tendência à formação de fibrose entre fileiras de hepatócitos próximo ao espaço porta (Figura 7). Já no fragmento de pele analisado, foi observada área focalmente extensa de perda de epitélio de revestimento que se estende para a derme superficial e profunda (Figuras 8 e 9), característica de necrose epidermal e dermal. As fibras colágenas esparsas, característico de edema, e presença de infiltrado neutrofílico, restos celulares e trombos vasculares oclusivos. Histologicamente, os rins não apresentaram alterações. Assim, o fígado apresentou hepatite histiocítica com macrófagos espumosos aguda difusa acentuada e a pele, necrose epidermal e dermal focalmente extensa aguda acentuada com trombos oclusivos. Por outro lado, as amostras de rins, pulmão e cérebro não apresentaram alterações histopatológicas.



Figura 4: Lesão macroscópica de crostas em orelha de ovino acometido por fotossensibilização

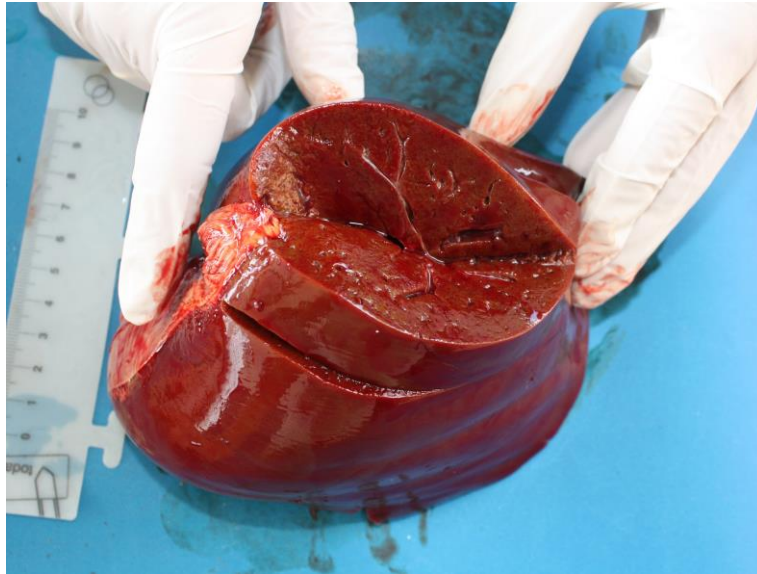


Figura 5: Características macroscópicas do fígado de animal com fotossensibilização

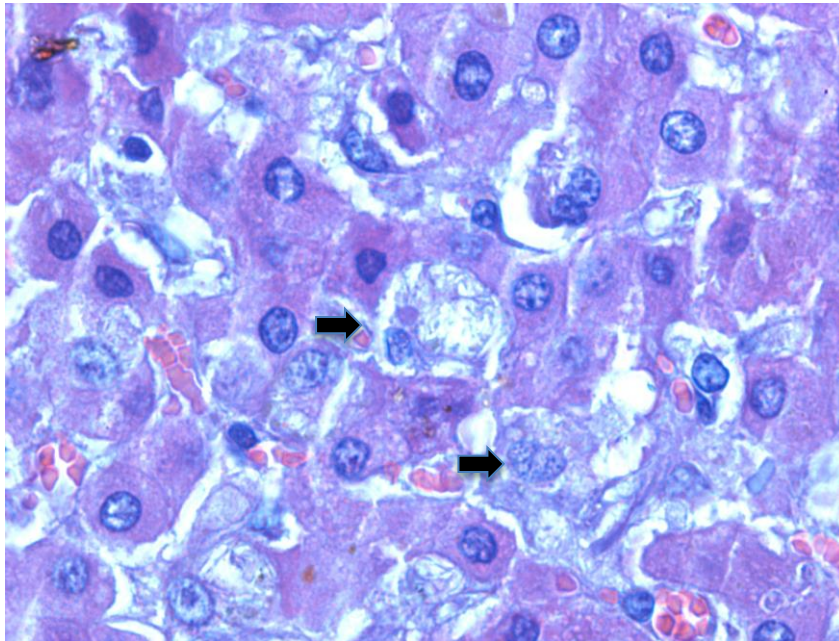


Figura 6: Fotomicrografia de fígado apresentando múltiplos macrófagos espumosos (setas pretas). HE (200x)

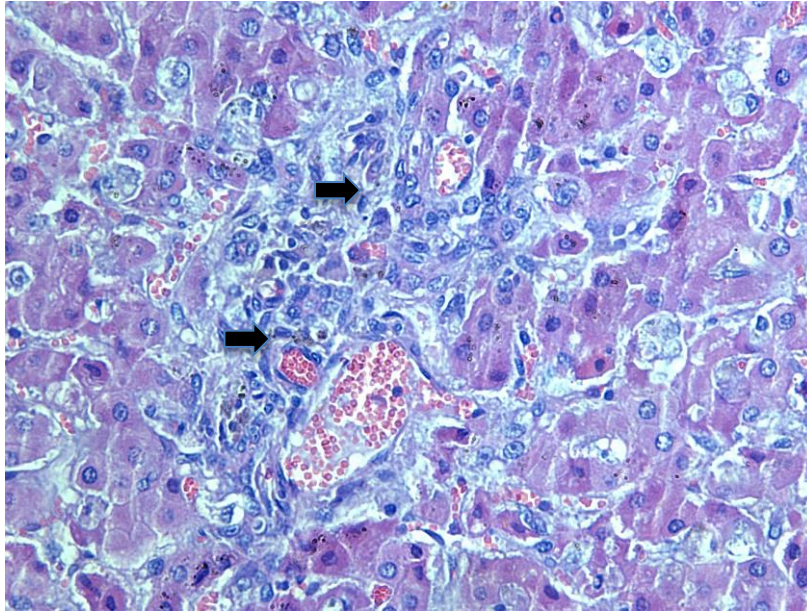


Figura 7: Fotomicrografia de fígado apresentando crescimento fibroso entre fileiras de hepatócitos próximo ao espaço porta (seta preta). HE (200x)

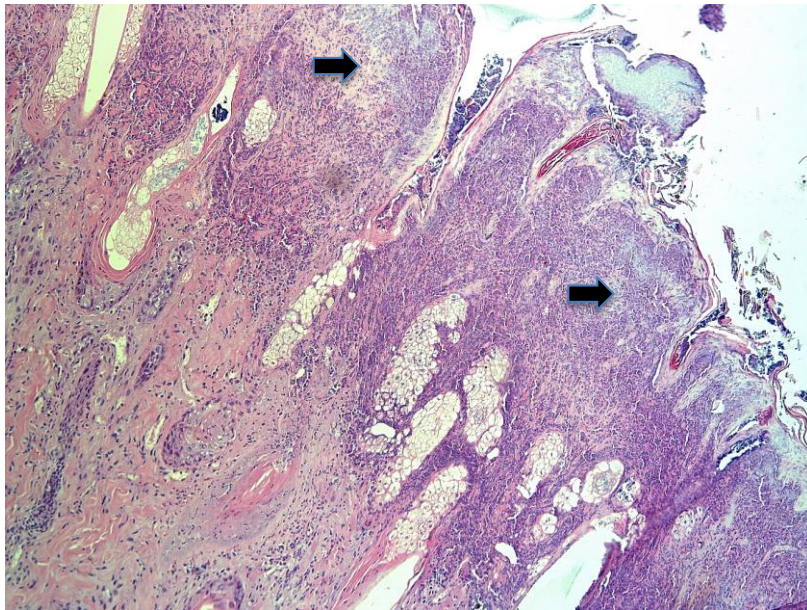


Figura 8: Fotomicrografia de tecido epitelial com perda da arquitetura do epitélio (seta preta). HE (50x)

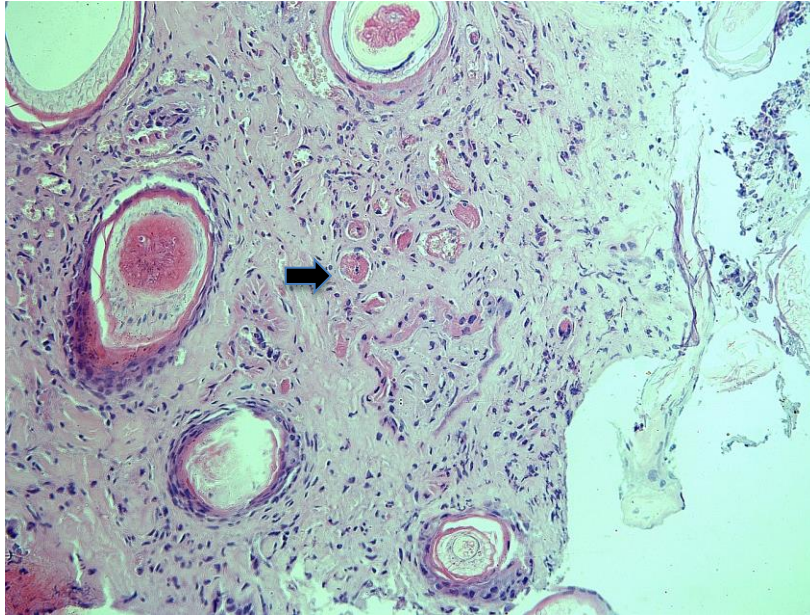


Figura 9: Fotomicrografia de tecido epitelial com alteração vascular secundária a fotossensibilização. Presença de material eosinofílico no interior de vasos, compatível com trombo (seta preta). HE (50x)

5.4. CONTAGEM DE ESPOROS

Todas as amostras de macega de *B. ruzizensis* foram analisadas quanto à quantidade de esporos de *P. chartarum* (Figura 10) por grama da planta, apresentando média em todo o período avaliado de 479.844 ± 443.951 esporos/g de planta. Os valores das contagens por dia de coleta estão apresentados na Tabela 3. A contagem de esporos de *Pithomyces chartarum* não apresentou diferença estatística entre os dias de coleta.



Figura 10: Fotomicrografia de esporos de *Pithomyces chartarum*.

Tabela 3. Contagem de esporos de *Pithomyces chartarum* em amostras de *Brachiaria ruziziensis*. Os valores estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão.

Data da coleta	Contagem (esporos/g)
03/02/2017	302.500 \pm 151.079
09/02/2017	302.500 \pm 151.079
15/02/2017	773.750 \pm 651.490
24/02/2017	282.500 \pm 307.205
08/03/2017	601.250 \pm 516.501
20/03/2017	592.500 \pm 682.221
29/03/2017	462.500 \pm 233.435
04/04/2017	700.000 \pm 473.779

As contagens não diferiram estatisticamente entre os dias de coleta ($P > 0,5$)

5.5. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PROTODIOSCINA

Foram avaliadas 64 amostras de *B. ruziziensis* quanto à presença e quantidade de protodioscina presente na gramínea utilizando sistema LC-MS/MS. As amostras foram divididas em amostras de Simulado e Brotação, e os resultados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. A concentração média total de protodioscina nas amostras de Simulado foi $0,020 \pm 0,024$ % ($204,7 \pm 237,1$ mg/Kg), enquanto na planta em Brotação foi $0,065 \pm 0,084$ % ($645,2 \pm 840,5$ mg/Kg).

Tabela 4: Concentrações de protodioscina encontradas em amostras de Simulado de *Brachiaria ruziziensis*. Os valores estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão.

Data da coleta	mg/Kg	%
03/02/2017	159,3 \pm 57,4	0,016 \pm 0,006
09/02/2017	249,3 \pm 408,1	0,025 \pm 0,041
15/02/2017	570,6 \pm 300,5	0,014 \pm 0,013
24/02/2017	210,7 \pm 195,4	0,057 \pm 0,030
08/03/2017	131,1 \pm 107,7	0,021 \pm 0,020
20/03/2017	134,8 \pm 125,1	0,013 \pm 0,011
29/03/2017	42,0 \pm 22,6	0,014 \pm 0,012
04/04/2017	159,3 \pm 57,4	0,004 \pm 0,002

Tabela 5: Concentrações de protodioscina encontradas em amostras de *Brachiaria ruziziensis* em Brotação. Os valores estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão.

Data da coleta	mg/Kg	%
03/02/2017	217,0 \pm 150,1	0,022 \pm 0,015
09/02/2017	97,2 \pm 84,3	0,010 \pm 0,009
15/02/2017	159,7 \pm 158,8	0,016 \pm 0,016
24/02/2017	1898,2 \pm 1715,0	0,190 \pm 0,172
08/03/2017	436,5 \pm 193,8	0,044 \pm 0,019
20/03/2017	336,7 \pm 171,6	0,034 \pm 0,017
29/03/2017	1289,0 \pm 503,0	0,129 \pm 0,050
04/04/2017	727,5 \pm 430,8	0,073 \pm 0,043

5.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Após a validação do método por LC-MS/MS, o mesmo apresentou critérios de desempenho adequados para detecção e quantificação da saponina Protodioscina (Figura 11). Onde no cromatograma do padrão, de linha vermelha, foi adquirido na função alta energia de colisão do modo MS^E; e no cromatograma de linha verde, foi adquirido na função baixa energia de colisão.

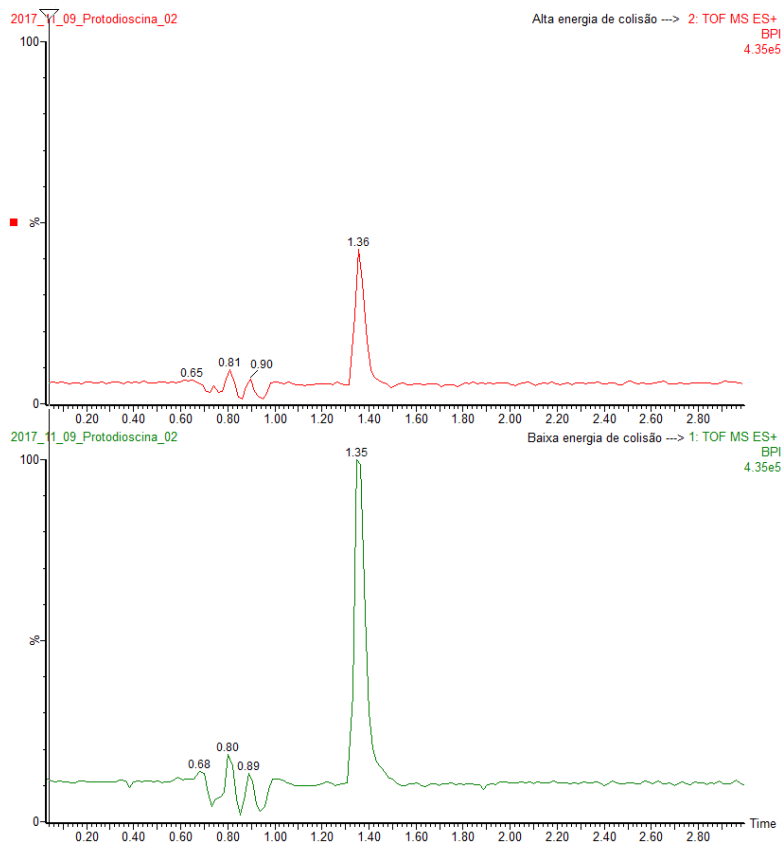


Figura 11: Cromatograma do padrão da protodioscina – Linha vermelha: adquirido na função alta energia de colisão do modo MSE; Linha Verde: adquirido na função baixa energia de colisão.

5.6.1. Seletividade

O cromatogramas obtidos na análise da mistura da solução padrão e da matriz branca está representada na Figura 12. No cromatograma do padrão observa-se o pico no tempo de retenção (t_r) de 1,35, o mesmo não é observado no cromatograma da matriz branca, demonstrado a ausência de interferentes na matriz.

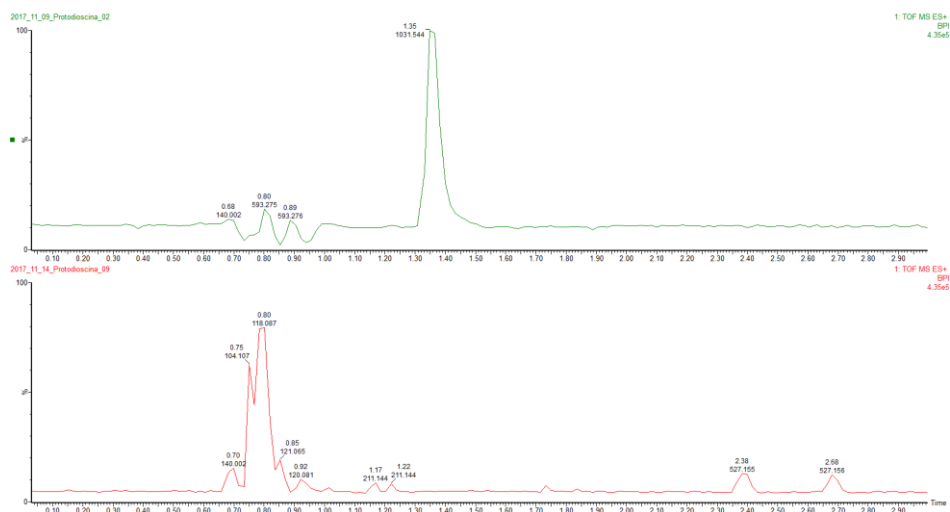


Figura 12: Cromatograma da mistura da solução padrão da protodioscina. No gráfico de linha verde observa-se o pico no tempo de retenção (t_r) de 1,35 minutos, o mesmo não é observado no no gráfico de linha vermelha (da matriz branca).

5.6.2. Efeito matriz

Foram realizadas cinco concentrações do padrão, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13) e após análise do diagrama de dispersão constatou-se alteração significativa do coeficiente angular da reta $p < 0,001$ indicando a presença de efeito matriz.

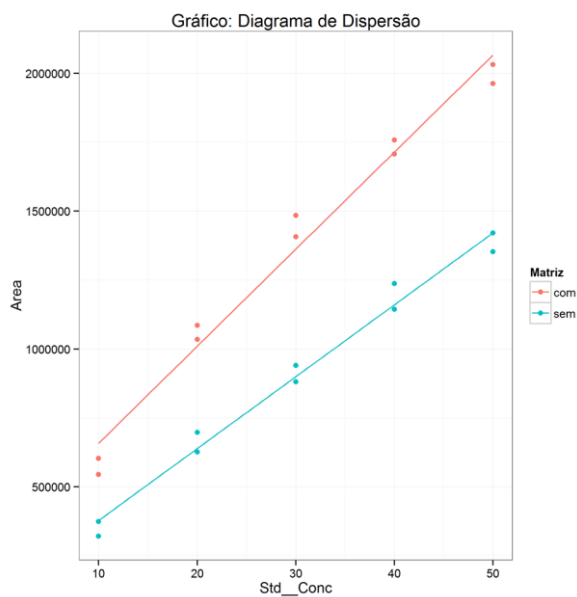


Figura 13: Avaliação do paralelismo entre as curvas de calibração com a presença da matriz e sem a presença da matriz

5.6.3. Linearidade

A curva analítica fortificada da protodioscina apresentou linearidade na faixa de 0,1 a 10 µg/mL, $p < 0,001$ e está representada na Figura 14 e na Tabela 6.

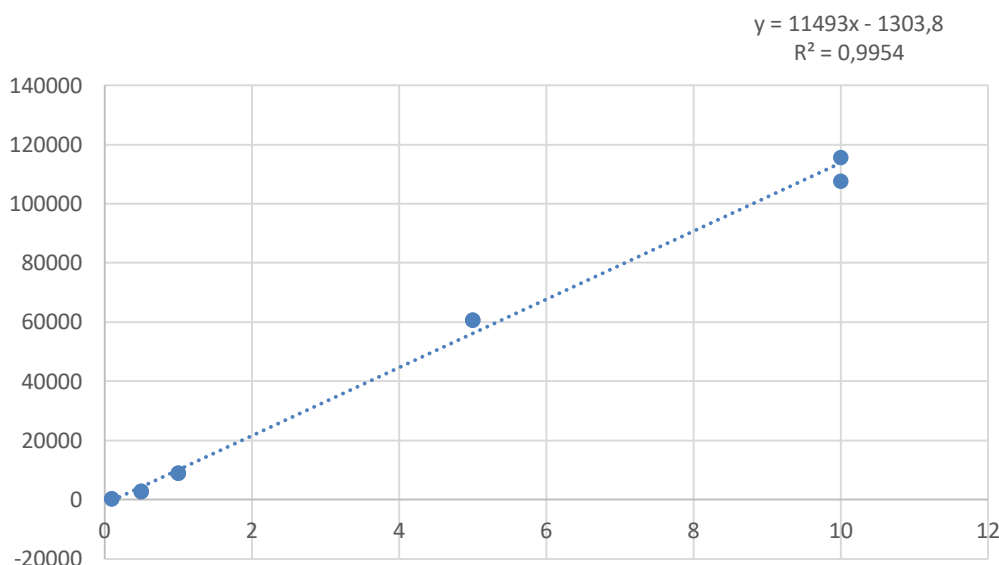


Figura 14. Curva analítica matrizada para análise de protodioscina

Tabela 6. Equação de regressão linear e coeficiente de determinação e correlação das curvas analítica para Protodioscina

Analito	Equação	R ²	r
Protodioscina	$y = 11493x - 1303,8$	0,99536	0,99767

R² = coeficiente de determinação; r = coeficiente de correlação.

5.6.4. Limite de detecção (LOD) e menor limite de quantificação (LOQ)

A validação do método de protodioscina tem os valores de LOD e LOQ apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Limites de detecção e de quantificação do método.

Analito	Limite de Detecção (µg/mL)	Limite de Quantificação (µg/mL)
Protodioscina	0,03	0,1

5.6.5. Exatidão

Nos ensaios de recuperação, os valores obtidos estão descritos na Tabela 8 e a média da recuperação obtida está na Tabela 9.

Tabela 8. Limites de detecção e de quantificação do método.

Analito	RECUPERAÇÃO %*
	Alta = 10,0 µg/mL
Protodioscina	11,10
	Média = 5,0 µg/mL
Protodioscina	8,17
	Baixa = 1,0 µg/mL
Protodioscina	7,30

*valores da média das três repetições

Tabela 9. Recuperação média

Analito	RECUPERAÇÃO MÉDIA %*
Protodioscina	106,38

*valores da média das repetições

5.6.6. Precisão

Por meio da análise da dispersão dos resultados, a repetitividade e a reprodutibilidade foram analisadas com as concentrações baixa (1,0 µg/mL), média (5,0 µg/mL) e alta (10,0 µg/mL); no mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente. Os valores são expressos por meio do desvio padrão relativos (RSD) apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10: Repetitividade expressa pelo desvio padrão relativo de protodioscina nas diferentes concentrações.

Analito	REPETITIVIDADE * RSD (%)
	Alta = 10,0 µg/mL
Protodioscina	8,8
	Média = 5,0 µg/mL
Protodioscina	9,49
	Baixa = 1,0 µg/mL
Protodioscina	13,26

*valores da média das três repetições

Tabela 11. Reprodutibilidade expressa pelo desvio padrão relativo de protodioscina nas diferentes concentrações.

Analito	REPRODUTIBILIDADE RSD %*
	Alta = 10,0 µg/mL
Protodioscina	11,10
	Média = 5,0 µg/mL
Protodioscina	8,17
	Baixa = 1,0 µg/mL
Protodioscina	7,30

*valores da média das três repetições

5.6.7. Aplicação do método

O método para detecção e quantificação da técnica foi aplicado em outros dois surtos de fotossensibilização em ovinos, um no Ceará e outro em Minas Gerais. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de protodioscina encontrada em amostras de *Brachiaria* dos surtos no Ceará e em Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais.

Amostra	Cidade	mg/Kg	%
<i>B. decumbens</i>	Ceará	11.190,80	1,119
<i>B. decumbens</i>	Ceará	7.147,40	0,715
<i>B. decumbens</i>	C. Lafaiete/MG	7.225,66	0,723

6. DISCUSSÃO

6.1. SINAIS CLÍNICOS

O diagnóstico de fotossensibilização hepatógena por *B. ruziziensis* foi baseado nos sinais clínicos e nos achados necroscópicos e histopatológicos. Também foram realizadas contagem de esporos de *Pithomyces chartarum* e dosagem da saponina protodioscina nas amostras de folhas de *B. ruziziensis*.

Os sinais clínicos apresentados pelos ovinos estudados são condizentes com os sinais relatados por alguns autores como a apatia, anorexia, icterícia, prurido da pele, fotofobia, descarga ocular serosa, edema subcutâneo no rosto e ouvido; na pele de áreas mal pigmentadas existem lesões caracterizadas por eritema, perda de pelos e crostas (Brum *et al.*, 2007; Saturnino *et al.*, 2010; Albernaz *et al.* 2010; Castro *et al.*, 2011; Lemos *et al.*, 2011; Mustafa *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012; Faccin *et al.*, 2014). Estes mesmos autores descreveram que as áreas de pele lesadas e irregulares pela fotossensibilização evoluem para necrose e destruição, associado em muitos casos à deformidade dos ouvidos devido à cicatrização dessas lesões. No presente caso, os animais apresentaram crostas nas orelhas e necrose à histopatologia (descrito a seguir), mas não chegaram a apresentar deformação e cicatrização levando a deformidade da região.

Seixas *et al.* (2016) estudaram casos provenientes tanto do Brasil, mantidos em pastagens de *Brachiaria* quanto de Açores, Portugal, onde não há áreas cultivadas de

quaisquer espécies de braquiária. Apartir disso tentam dividir os sinais clínicos entre animais intoxicados por saponinas e por esporidesmina. Porém, ao consultarmos a literatura, há sobreposição dos sinais clínicos, onde animais intoxicados por saponina ou esporidesmina, apresentam sinais clínicos semelhantes. Além disso, Fejér e Mariychuk (2016) analisaram amostras de *Tribulus terrestris* coletadas em Portugal e encontraram alto teor de saponinas esteroidais totais (até 4,40%), das quais protodioscina (até 2,70%). Assim, não há como garantir que os animais estudados por Seixas *et al.* (2016) não ingeriram protodioscina e outras saponinas esteroidais.

Como observado neste estudo, a sintomatologia clínica observada apresentou sinais relativos aos dois agentes, segundo a diferenciação proposta por Seixas *et al.* (2016). Isto ressalta a importância da contagem de esporos e dosagem de protodioscina para fechar o diagnóstico, conforme será discutido adiante.

6.2. MORTALIDADE

Em surto causado por *B. decumbens* relatado por Oliveira *et al.* (2012), a mortalidade foi de 34,2% entre ovelhas e cordeiros introduzidos na pastagem. No Estado do Pará, em dois surtos de fotossensibilização hepatógena em ovinos por *B. brizantha*, as taxas de mortalidade foram de 35,39% e 12,5%, respectivamente (Albernaz *et al.*, 2010). Esses valores são similares ao surto aqui descrito de fotossensibilização por *B. ruziziensis*, com morbidade de 20,8% (15/72) e mortalidade de 13,88% (10/72).

Em relato de Dubé *et al.* (2016) envolvendo cabras em Cuba, foi verificada morbidade de 50% e mortalidade de 16%, sendo esta associada à colestase aguda atribuída à ingestão de capim híbrido de *B. ruziziensis* e *B. brizantha*, conhecido como Cv. Mulato. No entanto, não foi determinado o seu conteúdo de protodioscina, mesmo tendo associado a causa da morte à presença de protodioscina. Há relatos cuja mortalidade foi de 42,85% (Santos Junior, 2008), enquanto Saturnino *et al.* (2010) reportaram 45,8% de mortalidade em intoxicação experimental.

6.3.BIOQUÍMICA SÉRICA

A gama-glutamyltransferase se encontra na membrana de células epiteliais biliares e de hepatócitos, o aumento sérico desta enzima ocorre em casos de colestase, onde a estase de ácidos biliares nos ductos estimula a síntese e liberação desta enzima (Stockham e Scott, 2011). A média do valor de GGT do GFTS foi estatisticamente maior do que o GSF e GSC no dia 3 de fevereiro (Tabela 1), mas no dia 9 (Tabela 2) esta diferença não permaneceu, porém, numericamente o valor de GGT do GFTS permaneceu acima dos valores de referência. A permanência da alteração do valor de GGT do GFTS pode representar continuidade da colestase (Kaneko *et al.*; 2008). A icterícia observada nas amostras pode auxiliar na comprovação da provável colestase.

Alguns autores descrevem o aumento sérico de GGT como sendo o melhor indicador da presença de intoxicação, pois seu aumento ocorre em casos de colestase e lesão do epitélio biliar, e tende a permanecer aumentado por um período mais longo (Fagliari *et al.*, 1994; Castro *et al.*, 2007; Santos Junior, 2008; Saturnino *et al.*, 2010).

De acordo com a análise apresentada na tabela 1 e 2, não houve diferença estatística entre os valores de AST dentro dos grupos, porém, numericamente o GFTS tem o maior valor de média e este está acima do valor de referência, tanto no dia 03 quanto no dia 09 de fevereiro. Demonstrando alteração hepática como já relatado por outros autores onde os valores aumentados de GGT e AST são detectados tanto nos casos naturais como nos experimentais de intoxicação por *Brachiaria* spp em bovinos e ovinos (Mendonça *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2007; Santos Junior *et al.*, 2008; Saturnino *et al.* 2010).

Santos Júnior (2008) descreve que aumentos consideráveis de AST e GGT não podem ser correlacionados com o diagnóstico e prognóstico da intoxicação, quando os casos são analisados individualmente, ou, uma vez que ovinos sem sinais clínicos apresentaram elevações nos níveis de atividade destas enzimas.

Os níveis de globulinas, nos dias de análise, 03 e 09/fev, foram diferentes no grupo GSC em comparação aos grupos GSF e GFTS. O GSC apresenta globulinas abaixo dos valores de referência. Isso teria que ser investigado em relação às condições de pastejo ou criação as quais este animal foi submetido.

Há diferença estatística entre os valores de ureia no dia 9 entre o GSF e o GSC, porém ambos estão dentro dos valores de referência. A diferença pode ocorrer devido à diferença na alimentação e ao metabolismo proteico secundário ao conteúdo de proteína na alimentação (Stockham e Scott, 2011), mas nada patológico visto que os valores estão normais.

Sobre a creatinina, o GFTS demonstrou diferença estatística em relação aos grupos GSF e GSC nos dois dias de análise, onde numericamente o de GFTS está dentro dos valores de referência, e os grupos GSF e GSC estão abaixo dos valores de referência. A creatinina baixa acontece em animais caquéticos ou não é clinicamente significativa (Stockham e Scott, 2011), isso vai variar de acordo com o estado clínico do paciente, neste caso, a baixa de creatinina possivelmente não tem significado.

O GSC apresentou diferença estatística em relação ao GFTS e GSF nos valores da glicose; porém, os três grupos se encontram dentro dos valores de referência. A diferença pode ser justificada pelo fato de que os grupos que tiveram contato com a *B. ruzizensis* podem ter período de inapetência gerando algum grau de diminuição dos níveis de glicose. Não se pode descartar a possibilidade de diminuição da produção da glicose (Stockham e Scott, 2011), uma vez que pode haver comprometimento hepático destes animais.

6.4. HISTOPATOLOGIA

As principais alterações macroscópicas consistem em escore corporal baixo, crostas nas bordas das orelhas, fígado de coloração amarelada, mucosa ictérica, padrão lobular

marcado e vesícula vesical distendida (Brum *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2007; Saturnino *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2011; Albernaz *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012; Mustafa *et al.*, 2012; Faccin *et al.*, 2014).

Seixas *et al.* (2016) descreveram diferenças entre as lesões causadas por cada agente, e compararam amostras de fígado de animais que ingeriam *Brachiaria* spp. e amostras de animais coletadas em Portugal, onde não há cultivo desta forragem e os casos de fotossensibilização são associados à micotoxina produzida por *P. chartarum*, esporidesmina. Os autores descreveram que em grande parte das amostras de Portugal, macroscopicamente possuem áreas de intensa fibrose, atrofia no lobo esquerdo e nas bordas, espessamento das vias biliares, além de nódulos de regeneração. Porém, não relataram se foram coletadas amostras das forragens presentes na região e se foi feita contagem dos esporos ou dosagem de protodioscina. Já no presente caso, macroscopicamente o animal apresentava icterícia generalizada, lesões crostosas na face e orelhas, os rins e fígado se apresentaram firmes e esverdeados, o fígado não apresentou nenhum sinal de fibrose ou nódulos de regeneração.

Algumas divergências são encontradas na literatura em relação aos achados histopatológicos. Seixas *et al.* (2016) citaram a relevância da presença de lesões fibróticas no fígado de animais atingidos pela esporidesmina. No caso apresentado por Rosa *et al.* (2016), foram evidenciadas lesões hepáticas fibróticas em caprinos que, segundo os autores, foram causadas pela saponina. Porém, neste trabalho não houve avaliação direta do conteúdo de protodioscina presente e da contagem de esporos de *P. chartarum*.

Riet-Correa *et al.* (2011) sugeriram que há diferenças significativas quando a intoxicação é causada pela esporidesmina ou ação da saponina protodioscina. No caso de intoxicação pela ingestão da planta *Brachiaria* spp, apresentam células espumosas e, ocasionalmente, cristais em ductos biliares. Já Seixas *et al.* (2016) descrevem que não há diferenças significativas entre animais afetados por saponinas ou esporidesmina.

Diversos autores descrevem os achados histopatológicos incluindo ruptura do arranjo trabecular dos hepatócitos com infiltrado de macrófagos espumosos e, que podem se juntam a ponto de formarem células gigantes multinucleadas, aumento de volume dos hepatócitos, necrose hepatocelular individual e estase biliar. Há presença de fibrose periportal, cristais birrefringentes no interior dos canais biliares, proliferação do ducto biliar e infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (Brum *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2007, 2011; Albernaz *et al.*, 2010; Lemos *et al.*, 2011; Riet-Correa *et al.*, 2011; Mustafa *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012; Faccin *et al.*, 2014).

Ao exame histológico no caso em estudo, o fígado apresentou lesões já citadas na literatura onde descrevem casos de fotossensibilização causado tanto por saponina, quanto por esporidesmina. Estes achados incluem infiltrados difusos de macrófagos espumosos, raras células multinucleadas, aumento discreto de volume dos hepatócitos (megalocitose), compatível com o quadro de hepatite histiocítica com macrófagos espumosos aguda difusa acentuada. Também apresentou tendência à formação fibrose entre fileiras de hepatócitos no espaço porta.

Em experimento de Cruz *et al.* (2001), a colangite multifocal na tríade portal foi induzida ao administrarem extratos fracionados de *B. decumbens*, positivos para saponina, à ovinos. Além disso, levou a presença de infiltrado inflamatório, proliferação de ductos biliares, e presença de cristais. Foi avaliada a contagem de esporos de *P. chartarum* e estavam em níveis inferiores aos detectáveis. Deve ser ressaltado que os cristais birrefringentes quando ausentes, não descarta a intoxicação (Souza *et al.*, 2010). A presença de cristais depositados no sistema biliar dos animais intoxicados foi a principal lesão relatada também nos casos em que a contagem de esporos foi baixa (Graydon *et al.*, 1991).

No fragmento de pele analisado, foi observada área focalmente extensa de perda de epitélio de revestimento que se estende para a derme superficial e profunda,

característica de necrose epidermal e dermal. As fibras colágenas esparsas, característico de edema, e presença de infiltrado neutrofílico, restos celulares e trombos vasculares oclusivos, compatível com o quadro de necrose epidermal e dermal focalmente extensa aguda acentuada com trombos oclusivos. Essas características estão de acordo com as lesões relatadas por Lemos *et al.* (1996) e Faccin *et al.* (2014), que descreveram que as lesões cutâneas são caracterizadas por hiperqueratose e paraqueratose, necrose coagulante epidérmica, detritos necróticos, aglomerados bacterianos, infiltrado inflamatório neutrofílico e necrose dos vasos dérmicos.

6.5. CONTAGEM ESPOROS DE *Pithomyces chartarum*

Há autores que querem comprovar a relação da fotossensibilização com a presença de saponinas; em contrapartida, há autores que atribuem à esporidesmina, produzida por *P. chartarum*, a responsabilidade pela intoxicação (Seixas *et al.*, 2016).

Diversos trabalhos avaliaram a quantidade de esporos do fungo *P. chartarum* e a produção de esporidesmina, no qual encontraram baixa quantidade de esporos, de cerca de 5.500 esporos por grama de folhas frescas (Collin *et al.*, 1998; Santos Junior., 2008; Mustafa *et al.*, 2012).

Nas amostras do presente estudo avaliadas entre os meses de Fevereiro e Abril, as contagens de esporos variaram entre 50.000 a 1.605.000 esporos/g de planta, ultrapassando valores citados como responsáveis por intoxicação na literatura, o que pode justificar a sintomatologia apresentadas pelos animais do estudo.

6.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A concentração de protodioscina em *B. decumbens* e *B. brizantha* em diferentes estádios de crescimento foi dosada por diversos autores; porém, os resultados são divergentes,

mostrando diferenças não significativas e até mesmo níveis muito baixos ou indetectáveis em alguns casos de surto (Riet-Correa *et al.*, 2011; Gracindo *et al.*, 2014).

Isso leva ao questionamento da atribuição da *Brachiaria* spp. como sendo tóxica pela presença de protodioscina e do grau de confiabilidade dos métodos de medição empregados anteriormente (Pérez *et al.*, 2016). Desta forma, é essencial a mensuração dos níveis da protodioscina em braquiárias utilizando metodologias analíticas comprovadamente confiáveis e reproduzíveis.

A seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão devem ser estudados durante o processo de validação (Ribani *et al.*, 2004; Demoliner, 2008; INMETRO, 2009; Amparo, 2013; ANVISA, 2017). Ao realizar essas etapas para validação do método de detecção e quantificação de protodioscina no presente estudo, a técnica foi considerada adequada para a pesquisa da saponina em *B. ruziziensis*.

Não foram observados interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção da protodioscina, na avaliação da seletividade. Isso garante que o pico de resposta seja exclusivamente do analito de interesse, como exigido pela ANVISA (2017).

Para o estudo da linearidade, foram utilizadas cinco concentrações diferentes da substância química, estando de acordo com o número mínimo exigido pela ANVISA (2017). O coeficiente de correlação linear (r) é utilizado para mostrar se a reta está adequada como modelo matemático. O valor usualmente requerido pelo INMETRO (2003) é maior que 0,90, enquanto 0,990 é requerido pela ANVISA (2017), para garantir menor dispersão do conjunto de pontos experimentais. Assim, o valor de r obtido por meio da equação da reta no presente estudo foi superior ao valor recomendado pelo INMETRO (2003) e pela ANVISA (2017).

A exatidão do método avaliado foi adequada, pois, por meio de ensaios de recuperação, os valores encontrados estão de acordo com os critérios estabelecidos pelo AOAC Internacional (2016).

Para a determinação da precisão, o método foi validado de forma adequada, seguindo o número de concentrações e repetições determinados pela ANVISA (2017). Os valores dos coeficientes de variação obtidos nos estudos de repetibilidade e reprodutibilidade apresentaram valores inferiores a 15%, valor recomendado pela United States Food and Drug Administration (US-FDA, 2001). O método de LC/MS-MS validado apresentou valores de LOD de 0,03 µg/mL e de LOQ de 0,1 µg/mL. A partir disso, o método validado está adequado para a detecção e a quantificação da protodioscina devido a sua alta sensibilidade de detectar compostos em níveis traços mesmo em matrizes complexas.

6.7. PROTODIOSCINA

Como a protodioscina não possui cromóforo, isso impede detecção sensível por UV, apresentando sinal baixo neste tipo de detecção. Deste modo, o uso de espalhamento de luz evaporativo (ELS) vem sendo utilizada como alternativa, pois tolera as interferências das impurezas, e a eluição gradiente da fase móvel melhora a precisão da determinação das saponinas (Ganzera *et al.*, 2001). Outra forma eficaz de detecção é por meio de MS (Yang *et al.*, 2003).

Por outro lado, Lee *et al.* (2010) descreveram um método utilizando HPLC para dosagem de protodioscina em aspargos que emprega o detector de UV. Os limites de detecção e de quantificação para a protodioscina foram de 1,6 µg/mL e 3,13 µg/mL, respectivamente, e a linearidade foi observada entre 3,13 µg/mL e 1000,0 µg/mL. Assim, estes autores concluem que o detector UV poderia ser utilizado para a detecção de protodioscina de forma eficiente em aspargos ou seus subprodutos. No mesmo sentido, Lozano *et al.* (2017) mostram que os limites de detecção e de quantificação

para a protodioscina foram de 2,8 µg/mL e 8,3 µg/mL, equivalentes a 0,05% e 0,16% na planta, respectivamente; a linearidade foi confirmada entre 10 e 1.000 µg/mL. Inicialmente tentamos reproduzir esta metodologia para amostras de *Brachiaria*, mas não foi possível obter resultados reprodutíveis (dados não apresentados). Isso mostra a necessidade de desenvolver metodologia própria para detecção e quantificação de protodioscina especificamente em *Brachiaria* spp.

As técnicas analíticas utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS ou MS/MS) são consideradas como as mais adequadas para uso na análise e identificação simultâneas de diferentes saponinas em mistura (Wang *et al.*, 2007; Dinchev *et al.*, 2008).

6.7.1. Concentrações tóxicas de protodioscina

Alguns surtos de fotossensibilização foram relatados em ovinos que foram alimentados com *Brachiaria* spp. contendo 0,3% a 2,56% (Castro *et al.*, 2011); 0,3% a 2,56% (Mustafa *et al.*, 2012; 0,88% (Albernaz *et al.*, 2010); 2,36% de protodioscina (Brum *et al.*, 2007) e em cabras ingerindo 1,54% de protodioscina (Silveira *et al.*, 2009). Porém, bovinos não apresentaram sinais clínicos mesmo sendo alimentado com *Brachiaria* spp. contendo 1,09% (Moreira *et al.*, 2009a) e 1,63% (Brum *et al.*, 2007) de protodioscina. Lee *et al.* (2009) dosaram três amostras de braquiária causando fotossensibilização em ovinos, duas amostras de *B. decumbens* e uma de *B. brizantha* continham 1,55% e 1,15% e 0,628% de saponina, respectivamente.

No presente estudo, a variação da concentração de protodioscina em amostras de *B. ruziziensis* foi de 0,001% a 0,093% em amostras de simulado (na altura da ingestão dos animais) e 0,003% a 0,442% em amostra de brotação. Dentre as amostras de brotação, tivemos valores como 0,201% e 0,442%, que são compatíveis com 0,3% de Castro *et al.* (2011) e Mustafa *et al.* (2012).

Há poucos estudos e relatos sobre intoxicação causada por braquiária onde houve dosagem de saponina nas pastagens. Os trabalhos disponíveis demonstram uma grande amplitude no nível de protodioscina presente necessário para levar à fotossensibilização em ovinos. Pelo fato dos ovinos serem a espécie mais susceptível à intoxicação, mesmo níveis baixos podem levá-los à apresentação do quadro clínico (Mustafa *et al.*, 2012).

Por outro lado, Riet-Correa *et al.* (2011) sugerem que o envenenamento de ovelhas ocorre na presença de altas dosagens, geralmente acima de 1% de saponina nas pastagens. No entanto, os mesmos autores esclarecem que um limiar de toxicidade ainda não foi estabelecido.

Toda essa incerteza sobre o diagnóstico de fotossensibilização é influenciado por diversos fatores como a falta de dados, susceptibilidade de animais jovens e resistência de animais que já tiveram contato com pastagens de braquiária. Além disso, as pastagens coletadas no momento da apresentação dos sinais clínicos, provavelmente não representa a concentração de saponina que os animais ingeriram no momento da intoxicação (Riet-Correa *et al.*, 2011).

6.8. IDADE DA PLANTA E CLIMA

Os casos de fotossensibilização nos ovinos estudados começaram no mês de Setembro, após o início das chuvas. Isso está de acordo com trabalhos que associam os surtos de fotossensibilização ao aumento da pluviosidade e ao consumo de pastos em início de brotação (Lemos *et al.* 1996; Mendonça *et al.* 2008; Moreira *et al.* 2009; Albernaz *et al.*, 2010), porém há relatos de ocorrência de surtos em qualquer época do ano (Mustafa, 2009; Souza *et al.*, 2010),

No presente surto, as amostras de *B. ruziziensis* no período de brotação apresentaram, em alguns piquetes, maiores dosagens de saponinas, mas quando se compara as médias entre brotação e simulado, não houve diferenças.

Santos Junior (2008) e Castro *et al.* (2009) afirmam que o maior teor de protodioscina é encontrado na planta em brotação. Ainda, Barbosa-Ferreira *et al.* (2011), Ferreira *et al.* (2011) e Goulart (2017) descrevem maior concentração de protodioscina em plantas jovens em relação a plantas velhas. Por outro lado, Brum *et al.* (2009) avaliaram as a quantidade de saponinas e encontrou quantidades maiores de protodioscina em braquiária madura durante a quebra de sementes.

No presente estudo, o animal necropsiado estava no piquete 3, se alimentando do tipo recombinante 2 RII. Após a quantificação da protodioscina, foi detectado 653,93 mg/Kg (0,065%) na amostra de Brotação e 51,03 mg/Kg (0,005%) na amostra de Simulado. A contagem de esporos de *P. chartarum* encontrada neste mesmo paddock foi de 1.345.000 esporo/g, o clima no momento da coleta da amostra era de temperatura mínima de 16° C e umidade relativa de 93,25% (dados do clima obtidos do INMET), o que corrobora com os dados fornecidos pela literatura como condições ideais para crescimento do fungo. Assim, é provável que a fotossensibilização pela *B. ruziziensis* aqui descrita tenha sido causada pela associação da esporidesmina produzida pelo fungo com a protodioscina da planta.

7. CONCLUSÕES

O método por LC-MS/MS validado é confiável e sensível para detecção e quantificação simultânea da protodioscina na gramínea *Brachiaria ruziziensis*.

Brachiaria ruziziensis apresentou baixas concentrações da saponina protodioscina em comparação com outros tipos de *Brachiaria* spp. apresentados na literatura, enquanto as contagens de esporos de *Pithomyces chartarum* foram consideradas elevadas.

A fotossensibilização observada nos ovinos alimentados com a *B. ruziziensis* provavelmente é decorrente da ação de esporidesmina produzida pelo fungo *P. chartarum*. Por outro lado, as concentrações da saponina protodioscina presentes na *B. ruziziensis* foram consideradas insuficientes para promover a fotossensibilização.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há necessidade de realização de estudos mais abrangentes sobre a produção de esporidesmina por esporos de *P. chartarum* encontrados no Brasil.

É essencial a realização da contagem de esporos ou dosagem da protodioscina na *Brachiaria* spp. antes de atribuí-los como causa da fotossensibilização. Não é possível afirmar com precisão apenas por meio dos achados clínicos e histopatológicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, V. U.; BASHA, A. *Spectroscopic Data of Steroidal Glycosides: Stigmastanes, Furostanes, Spirostanes*. New York: Springer, v. 2, 2006. 685p.

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. *Pesq. Vet. Bras.* v. 30, p. 741-748. 2010.

ALVARIZA, F. R. Intoxicação por *Pithomyces chartarum*. In: RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M.D.; SCHILD, A.L. *Intoxicações por plantas e micotoxinoses em animais domésticos*. Montevideo: Hemisfério Sul, 1993. v. 1, p. 93-101.

ÁLVAREZ, M. C. L. Estúdio etnobotânico de plantas tóxicas para animais y toxilología de *Brachiaria* spp. em los Llanos Orientales de Colombia. 2017. 200f. Tesis (Doctor en Ciencias Salud Animal) – Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Bogotá.

AMPARO, M. R. *Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC MS para quantificação de fluorquinolonas em matrizes aquosas*. 2013. 75f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Universidade de São Paulo, São Carlos.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *RE n° 899*, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *RE n° 166*, 2017.

AOAC International, “Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements”, p.9, 2016.

BARBOSA-FERREIRA, M.; BRUM, K. B.; FERNANDES, C.E.S.; et al. Variations of saponin level x maturation in *Brachiaria brizantha* leaves. In: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A.L.; WIERENGA, T. (Eds.), *Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins*. CAB International, Wallingford, U.K. 2011. p. 118-123.

BARBOSA-FERREIRA, M.; LIMA, F. G.; LEE, S. T.; et al. Análise de saponina protodioscina por hplc-esi-ms em *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria híbrida* cv. mulato durante 16 meses. *Vet. e Zootec.* 2011, v. 18, n. 4 Supl. 3, p. 580–583, 2011.

BRIDGES, C. H.; CAMP, B. J.; LIVINGSTON, C. W.; et al. Kleingrass (*Panicum*

coloratum L.) Poisoning in Sheep. *Vet. Pathol.*, v. 24, p. 525–531, 1987

BARS, J. L.; OSWALD, E.; BARS, P.L. *et al.* Ecotoxinogenesis of *Pithomyces chartarum*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v.7, n.1, p. 19-21. 1990.

BRIDGES, C. H.; CAMP, B. J.; LIVINGSTON, C. W.; BAILEY, E. M. Kleingrass (*Panicum coloratum* L.) poisoning in sheep. *Veterinary Pathology*, v. 24, n. 6, p. 525-531, 1987.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, 2003.

BROOK, P. J. Ecology of the fungus *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M. B. Ellis in pasture in relation to facial eczema disease of sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 6, n. 3-4, p. 147-228, 1963.

BROOK, P. J. *Pithomyces chartarum* in pasture, and measures for prevention of facial eczema. *Journal of Stored Products Research*, v. 5, p. 203-209, 1969.

BRUM, K. B.; HARAGUCHI, M.; LEMOS, R. A. A.; *et al.* Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 27, n. 1, p. 39–42, 2007.

BRUM, K.; HARAGUCHI, M.; GARUTTI, M.; *et al.* Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. *Ciência Rural*, v. 39, n. 1, p. 279–281, 2009.

CASTRO, M. B.; MOSCARDINI A. R. C.; RECKZIEGEL G. C.; *et al.* *Susceptibilidade de ovinos à intoxicação por Brachiaria decumbens*. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ESPECIALISTAS EM PEQUEÑOS RUMINANTES Y CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS, 5. 2007. Buenos Aires, Argentina, p. 57-59. (Abstract)

CASTRO, M. B.; SANTOS JR, H. L.; MUSTAFA, V. S., *et al.* *Brachiaria spp poisoning in sheep in Brazil: Experimental and epidemiological findings*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON POISONOUS PLANTS, 8. 2009. João Pessoa, PB. p. 12. (Abstract)

CASTRO, M. B.; SANTOS JUNIOR, H. L.; MUSTAFA, V.S.; *et al.* *Brachiaria spp. poisoning in sheep in Brazil: experimental and epidemiological findings*. In: Riet-Correa, F.; Pfister, J.; Schild, A.L.; *et al.* (Eds.). *Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins*. CAB International, Wallingford, U.K. 2011, p. 110-117.

CHLARADLA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v. 31, p. 623–636, 2008.

COLLIN, R. G.; ODRIOZOLA, E.; TOWERS, N. R. Sporidesmin production by *Pithomyces chartarum* isolates from Australia, Brazil, New Zealand and Uruguay. *Mycological Research*, v. 102, n. 2, p. 163–166, 1998.

CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V.; et al. Experimentally induced cholangiohepatopathy by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria decumbens*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, p. 170–172, 2001.

CRUZ, L. C. H. *Micologia veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010. 348p.

DE OLIVEIRA, C. H. S.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; et al. Hepatic photosensitization in buffaloes intoxicated by *Brachiaria decumbens* in Minas Gerais state, Brazil. *Toxicon*, v. 73, p. 121–129, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.001>>. Acesso em: 12 Dez. 2017.

DE SOUZA, S. V. C. *Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos*. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DEMOLINER, A. *Otimização e validação de metodologia analítica empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para determinação de multiclassas de agrotóxicos e metabólicos em água de superfície e de abastecimento público*. 2008. 130f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

DI MENNA, M. E.; BAILEY, J. R. *Pithomyces chartarum* spore counts in pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* v. 5, p. 343-351, 1973.

DI MENNA, M. E.; SMITH, B. L.; MUES, C. O. A history of facial eczema (pithomycotoxicosis) research. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 52, n. 4, p. 345–376, 2009.

DIAS-FILHO, M. B. Growth and biomass allocation of the C grasses *Brachiaria brizantha* and *B. humidicola* under shade. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 12, p. 2335–2341, 2000.

DINCHEV, D.; JANDA, B.; EVSTATIEVA, L.; et al. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry*, v. 69, n. 1, p.

176–186, 2008.

DINGLEY, J. M. *Pithomyces chartarum*, its occurrence morphology, and taxonomy. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 5, n. 1–2, p. 49–61, 1962.

DIRECTIVE 657, EC. European Commission. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities* L 221/8. Bruxelas, 12 ago. 2002.

DOBEREINER, 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*, v. 11, p. 87–94, 1976.

DRIEMEIER, D.; COLODEL, E. M.; SEITZ, A. L.; et al. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. *Toxicon*, v. 40, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

DRIEMEIER, D.; DE BARROS, S. S.; PEIXOTO, P. V.; et al. Estudos histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, n. 1, p. 29–34, 1998.

DRIEMEIER, D.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V.; et al. Relação entre macrófagos espumosos (“foam cells”) no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 19, n. 2, p. 79–83, 1999.

DUBÉ, D. C.; FIGUEREDO, J. M.; PERCEDO, M. I.; et al. Toxicosis por pasto Mulato (*Brachiaria ruziziensis* - *Brachiaria brizantha*) en cabras de la provincia Artemisa. *Revista de Salud Animal*, v. 38, n. 1, p. 19–24, 2016. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253570X2016000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em: 22 Nov. 2017.

EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics*. 2. ed. Teddington: LGC, 2014. 70 p.

FACCIN, T. C.; RIET-CORREA, F.; RODRIGUES, F. S.; et al. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naive and experienced sheep. *Toxicon*, v. 82, p. 1–8, 2014.

FAGLIARI, J. J.; OKUDA, H. T.; KUCHEMUCK, M. R. G.; et al. Estudo de alguns constituintes sanguíneos de bovinos intoxicados naturalmente pela micotoxina espirodesmina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 46, n. 5, p. 457-475, 1994.

FEJÉR, J.; MARIYCHUK, R. Content of rutin and steroidal saponins extracted from different genotypes of puncture vine *Tribulus terrestris* L. *Naukovij Visnik Užgorods'kogo Unìversitetu, Seriâ «Himiâ»*, v.36, n.2, p.26-28, 2016.

FERREIRA, M. B.; BRUM, K. B.; FERNANDES, C.; et al. Variations in saponin concentration in *Brachiaria brizantha* leaves as a function of maturation: preliminary data. In: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; et al. (Eds). *Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins*. CAB International: Wallingford, UK, 2011, pp. 118-123.

FIELD, B.; JORDAN, F.; OSBOURN, A.. First encounters: deployment of defence-related natural products by plants. *The New phytologist*, v. 172, n. 2, p. 193–207, 2006.

FLÅØYEN, A. Do steroidal saponins have a role in hepatogenous photosensitization diseases of sheep? *Advances in experimental medicine and biology*, v. 405, p. 395–403, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910722>> Acesso em: 10 Dez. 2017.

FONSECA-FILHO, L. B.; ENDO, V. Y.; SILVA, T. M.; et al. Intoxicação por ingestão de *Brachiaria decumbens* em bovinos no Brasil e achados patológicos decorrentes: Revisão. *Pubvet medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 11, n. 6, p. 601–606, 2017.

FURLAN, F. H.; COLODEL, E. M.; LEMOS, R. A. A.; et al. Poisonous Plants Affecting Cattle in Central-Western Brazil. *Plants poisonous to cattle in Brazil season*, v. 2, p. 1–13, 2012.

FREITAS, V. S.; NETO, F. B. Qualitative Comparative Analysis (QCA): usos e aplicações do método, *Revista Política Hoje*, 2ed, v. 24, p. 103-117, 2015.

GANZERA, M.; BEDIR, E.; KHAN, I. A. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *J Pharm Sci*, v. 90, n. 11, p. 1752–1758, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745732>> Acesso em 18 Nov. 2017.

GOMAR, M. S.; DRIEMEIER, D.; COLODEL, E. M.; et al. Lectin histochemistry of foam cells in tissues of cattle grazing *Brachiaria* spp. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, v. 52, n. 1, p. 18–21, 2005.

GONÇALEZ, E.; SOTO-BLANCO, B. Considerações sobre esporidesmina, micotoxina hepatotóxica produzida pelo *Phitomyces chartarum*. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 65, n. 1, p. 127-132, 1998. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/215573549_Sporidesmin_a_hepatotoxic_mycotoxin_is_produced_by_the_fungi_Pithomyces_chartarum_Consideracoes_sobre_espo>

ridesmina_micotoxina_hepatotóxica_produzida_pelo_Phito­myces_chartarum> Acesso em 3 Dez. 2017.

GOULART, D. S. Padronização para colheita e conservação de amostras de braquiária para quantificação de saponina e toxicidade subcrônica da Diosgenina em *Cavia porcellus*. 2017. 94f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GRACINDO, C. V. *Avaliação do desempenho e da toxicidade em ovinos mantidos em pastagens de Brachiaria decumbens, Brachiaria brizantha, Panicum maximum var Aires e Andropogon gayanus var Planaltina*. 2010. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/8251/1/2010_CristianeVinhaesGracindo.pdf>. Acesso em: 11 Nov. 2017.

GRACINDO, C. V.; LOUVANDINI, H.; RIET-CORREA, F.; *et al.* Performance of sheep grazing in pastures of *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum*, and *Andropogon gayanus* with different protodioscin concentrations. *Tropical Animal Health and Production*, v. 46, n. 5, p. 733–737, 2014.

GRAYDON, R. J.; HAMID, H.; ZAHARI, P.; *et al.* Photosensitisation and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. *Australian veterinary journal*, v. 68, n. 7, p. 234–6, 1991.

HALDER, C. A.; TABER, R. A.; CAMP, B. J. Absence of sporidesmin production by twelve Texas isolates of *Pithomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 212–215, 1981.

HARE, M. D.; TATSAPONG, P.; PHENGPHEP, S. Herbage yield and quality of *Brachiaria* cultivars, *Paspalum atratum* and *Panicum maximum* in north-east Thailand. *Tropical Grasslands*, v. 43, p. 65–72, 2009.

HOLLAND, P. T.; MILES, C. O.; MORTIMER, P. H.; *et al.* Isolation of the Steroidal Saponin Epismilagenin from the Bile of Sheep Affected by *Panicum dichotomiflorum* Toxicosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, n. 11, p. 1963–1965, 1991.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. *Saponins: chemistry and pharmacology of natural products*. Cambridge: Cambridge University, 1995. 549p.

IBGE. Produção pecuária 2015. *Produção Pecuária Municipal*, v. 43, p. 1–49, 2015.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados*. 1. ed. Brasileira. Rio de Janeiro. 2009. 78 p.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 2000. 79- 83 p.

KANEKO J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS. M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Academic Press, San Diego. 2008, 916 p.

LAJIS, N. H.; ABDULLAH, A. S. H.; SALIM, S. J. S.; et al. Epi-Sarsasapogenin and epi-smilagenin: two saponinins isolated from the rumen content of sheep intoxicated by *Brachiaria decumbens*. *Steroids*, v. 58, n. 8, p. 387–389, 1993.

LÁU, H. D.. Efeitos tóxicos de *Lantana camara* e de *Pithomyces chartarum* em búfalos. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, v. 54, p. 1–18, 1990.

LEE, E. J.; YOO, K. S.; PATIL, B. S. Development of a Rapid HPLC-UV Method for Simultaneous Quantification of Protodioscin and Rutin in White and Green Asparagus Spears. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 9, p. 703–709, 2010.

LEE, S. T.; MITCHELL, R. B.; WANG, Z. R.; et al. Isolation, characterization, and quantification of steroidal saponins in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 6, p. 2599–2604, 2009.

LEE, S. T.; MITCHELL, R.B.; GARDNER, D. R.; et al. Measurement of steroidal saponins in *Panicum* and *Brachiaria* grasses in the USA and Brazil. In: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; et al. (Eds). *Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins*. CAB International: Wallingford, UK, 2011, pp. 142-147.

LEMOS, R. A. A.; FERREIRA, L. C. L.; SILVA, S. M.; et al. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagens com *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural*, v.26, n. 1, p. 109-113, 1996.

LEMOS, R. A. A.; NAKAZATO, L.; HERRERO JUNIOR, 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*, v. 28, n. 3, p. 507-510, 1998.

LEMOS, R. A. A.; NOGUEIRA, A. P. A.; SOUZA, R. I. C.; et al. *Brachiaria* spp. poisoning in ruminants in Mato Grosso do Sul, Brazil. In: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; et al. (Eds). *Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins*. CAB International: Wallingford, UK, 2011, p. 129-132.

LIMA, F. G. *Fatores que interferem nas concentrações de saponinas em braquiárias e intoxicação experimental em bovinos*. 2012. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

LIMA, F. G.; HARAGUCHI, M.; PFISTER, J. A.; et al. Weather and plant age affect the levels of steroidal saponin and *Pithomyces chartarum* spores in *Brachiaria* grass main forage source for ruminants. *International Journal of Poisonous Plant Research.*, v. 2, p. 45–53, 2012.

LIMA, F. G.; LEE, S. T. S.; PFISTER, J. A.; et al. The effect of ensiling and haymaking on the concentrations of steroidal saponin in two *Brachiaria* grass species. *Ciência Rural*, v. 45, n. 5, p. 858–866, 2015.

LOW, S. Signal Grass (*Brachiaria decumbens*) Toxicity in Grazing Ruminants. *Agriculture*, v. 5, n. 4, p. 971–990, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2077-0472/5/4/971/>>. Acesso em: 12 Dez. 2017.

LOZANO, M.; MARTINEZ, N.A; DIAZ, G. Content of the Saponin Protodioscin in *Brachiaria* spp. from the Eastern Plains of Colombia. *Toxins*, v. 9, n. 7, art. 220, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/9/7/220>>. Acesso em: 20 Dez. 2017.

MARASAS, W. F. O.; ADELAAR T. F.; KELLERMAN T. S.; et al. First report of facial eczema in sheep in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 39, p. 107- 112, 1972.

MCDONOUGH, S. P.; WOODBURY, A. H.; GALEY, F. D.; et al. Hepatogenous Photosensitization of Sheep in California Associated with Ingestion of *Tribulus Terrestris* (Puncture Vine). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 6, n. 3, p. 392–395, 1994. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879400600324>>. Acesso em: 10 Dez. 2017.

MEAGHER, L. P.; WILKINS, A. L.; MILES, C. O.; COLLIN, R. G.; 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*, v. 38, n. 4, p. 271–274, 1996.

MENDONÇA, F. S.; CAMARGO, L. M.; FREITAS, S. H.; et al. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens*. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 4, p. 1034–1041, 2008.

MILES, C. O.; WILKINS, A. L.; ERASMUS, G. L.; et al. Photosensitivity in South Africa. VII. Chemical composition of biliary crystals from a sheep with experimentally induced geeldikkop. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 61, n. 3, p. 215–

222, 1994.

MILES, C. O.; WILKINS, A. L.; MUNDAY, S. C.; et al. Identification of Insoluble Salts of the β -d-Glucuronides of Episarsasapogenin and Epismilagenin in the Bile of Lambs with Alvelo and Examination of *Nartheceium ossifragum*, *Tribulus terrestris*, and *Panicum miliaceum* for Sapogenins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, n. 6, p. 914–917, 1993.

MILES, C. O.; WILKINS, A. L.; MUNDAY, S. C.; et al. Identification of the Calcium Salt of Epismilagenin β -d-Glucuronide in the Bile Crystals of Sheep Affected by *Panicum dichotomiflorum* and *Panicum schinzii* Toxicoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, n. 9, p. 1606–1609, 1992.

MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement*. [S.l: s.n.], 1996.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; INMAN, A. O.; MAK, V.; et al. Effect of selective lipid extraction from different body regions on epidermal barrier function. *Pharm Res*, v. 18, n. 7, p. 992–998, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11496960>>. Acesso em: 22 Nov. 2017.

MOREIRA, C. N.; BANYS, V. L.; PINTO, A. S.; et al. Bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon* : desempenho, avaliação da quantidade de esporos do fungo *Pithomyces chartarum* e teor de saponina das pastagens. *Ciencia Animal Brasileira*, v. 10, n. 1, p. 184–194, 2009.

MORRIS, C. A.; TOWERS, N. R.; SMITH, B. L.; et al. Progeny testing bulls for susceptibility to facial eczema. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 34, n. 4, p. 413–417, 1991.

MORTIMER, P. H.; RONALDSON, J. W. Fungal toxin – induced photosensitization. In: KEELER, R. F.; TU, A. T. *Handbook of natural toxins*, New York; Marcel Dekker, v.1: Plant and fungal toxins, p. 361-420, 1983.

MUSTAFA, V. S. *Caracterização da intoxicação natural por Brachiaria spp . em ovinos no Brasil Central*. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal – Universidade de Brasília, Brasília.

MUSTAFA, V. S.; MOSCARDINI, A. R. C.; BORGES, J. R. J.; et al. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 12, p. 1272–1280, 2012.

NAZÁRIO, W.; MANDORINO, I.; MARAVOLTA, V. A.; et al. Fotosensibilização em ovinos mantidos em pastagem de *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard, no

Estado de São Paulo, com provável participação do fungo *Pithomyces chartarum*. *Rev. Brasil. Med. Vet.*, v. 7, n. 7, p. 216-218, 1985.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A*, v. 967, n. 1, p. 147–162, 2002.

OLIVEIRA, C. H. S. *Fotossensibilização hepatógena em búfalos (Bubalus bubalis) em pastagens de Brachiaria decubens no estado de Minas Gerais*. 2011a. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, R. S.; FERREIRA, E. A.; PINHEIRO, E. E. G.; et al. Intoxicação espontânea por *Brachiaria decumbens* em ovinos no Estado da Bahia. *Arquivos de Pesquisa Animal*, v. 1, n. 2, p. 58–63, 2012.

PÉREZ, A. J.; HUSSAIN, S. M.; PECIO, Ł.; et al. Ultrahigh-performance liquid chromatography-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry based metabolomics reveals key differences between *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha*, two similar pastures with different toxicities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 22, p. 4686–4694, 2016.

PIRES, V. S.; TAKETA, A. T. C.; GOSMANN, G.; et al. Saponins and sapogenins from *Brachiaria decumbens* Stapf. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 2, p. 135–139, 2002.

PUPIN, R. C.; MELO, G. K. A.; HECKLER, R. F.; et al. Identification of lamb flocks susceptible and resistant against brachiaria poisoning. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 5, p. 383–388, 2016.

PURCHIO, A.; CORREA, B.; GALHARDO, M.; et al. Ocorrência de surto de eczema facial em ovinos, na região de São Manuel, Estado de São Paulo. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v. 25, n. 1, p. 135–141, 1988.

QUIN, J. I.; RIMINGTON, C.; ROETS, G. C. S. Studies on the photosensitization of animals in South Africa. VIII. The formation of phylloerytrins in the digestive tracts of various domesticated animals. *Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, v. 4, p. 463-471, 1935.

QUINN, J. C.; KESSELL, A.; WESTON, L. A. Secondary plant products causing photosensitization in grazing herbivores: Their structure, activity and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 1, p. 1441–1465, 2014.

- REED, J. D.; KRUEGER, C.; RODRIGUEZ, G. Secondary plant compounds and forage evaluation. In: GIVES, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; et al. *Forage Evaluation in Ruminant*. Wallingford: CAB International, p. 433-448, 2000.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771 – 780, 2004.
- RIET-CORREA, B.; CASTRO, M. B.; DE LEMOS, R. A.; et al. *Brachiaria* spp. Poisoning of ruminants in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 3, p. 183–192, 2011.
- RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C. Intoxicações por plantas e micotoxinas. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; et al. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol. 2, Cap. 3. Editora Pallotti: Santa Maria, RS, 2007, p. 219.
- RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C. Intoxicações por plantas e micotoxinas. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; et al. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol. 2, Cap. 3. Editora Pallotti: Santa Maria, RS, 2007, p. 219.
- RODRIGUES, V.C. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de fármacos em amostras de água, superficial e tratada, utilizando a cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas Tandem (UPLC-MS/MS). 2011. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- ROSA, F. B.; RUBIN, M. I. B.; MARTINS, T. B.; et al. Spontaneous poisoning by *Brachiaria decumbens* in goats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.36, n.5, p.389-396, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2016000500389&lng=en&nrm=iso>. Access em: 20 de Dezembro, 2017.
- ROWE, L. D. Photosensitization problems in livestock. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, v. 5, n. 2, p. 301–323, 1989. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30978-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30978-6)>. Acesso em: 10 Dez. 2017.
- RUSSOMANNO, O. M. R.; PORTUGAL, M. A. S. C.; COUTINHO, L. N. et al. *Leptosphaerulina chartarum* (= *pithomyces chartarum*) e seu envolvimento no eczema facial. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.70, n.3, p.385-390, 2003.
- SALAM A.; RAJION, M. A. Dietary factors affecting entero-hepatic function of ruminants in the tropics. *Animal Feed Science and Technology*, v. 69, n. 97, p. 79–90, 1997.

SANTE. Commission of the European Communities. *Document n° SANTE/11945/2015*: Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Bruxelas, 31 dez 2015. 46 p.

SANTOS JUNIOR, H. L. *Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento de Brachiaria decumbens em ovinos*. 2008. 70f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

SATURNINO, K. C.; MARIANI, T. M.; BARBOSA-FERREIRA, M.; et al. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 3, p. 195–202, 2010.

SEIXAS, J. N.; PINTO, C. A.; RODRIGUES, A.; et al. Estudo comparativo das intoxicações por *Brachiaria* spp. e *Pithomyces chartarum* em bovinos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 38, n. 2, p. 1–10, 2016.

SEIFFERT, N. F. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Circular técnica, n. 1, 74p. 1980.

SILVEIRA, J. A. S.; ALBERNAZ, T. T.; SILVA, N. S. E.; et al. Fotossensibilização hepatógena em caprinos associada a ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. *Ciência Animal Brasileira*, v. 1, n. 9, p. 336–341, 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7797/5586>>. Acesso em: 22 Dez. 2017.

SMITH, B. L. Effects of low dose rates of sporidesmin given orally to sheep, *New Zealand Veterinary Journal*, v.48, p.176-181, 2000

SMITH, B. L.; EMBLING, P. P.; GRAVETT.; I. M. *Pithomyces chartarum* spore counts in rumen contents and faeces of sheep exposed to autumn pasture at three different grazing pressures, *Journal of Applied Toxicology*, v. 7, n.3, p.179-184, 1987.

SMITH, B. L.; EMBLING, P. P. Facial eczema in goats: The toxicity of sporidesmin in goat and its pathology. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 39, p. 18-22, 1991.

SMITH, E.; KISS, F.; PORTER, R. M.; et al. A review of UVA-mediated photosensitivity disorders. *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 11, n. 1, p. 199–206, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C1PP05191A>>. Acesso em: 20 Dez. 2017.

SOUZA, R. I. C.; RIET-CORREA, F.; BRUM, K. B.; et al. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 12, p. 1036–1042, 2010.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO NETO, J. *Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária*. Barueri: Manole, 2008. 942 p.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*, 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SYNGE, R. L. M.; WHITE, E. P. Photosensitivity diseases in New Zealand, *New Zealand Journal of Agricultura Research*, v. 3, n.6, p.907-921, 1960.

SZAKIEL, A.; PAÇKOWSKI, C.; HENRY, M. Influence of environmental biotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*, v. 10, n. 4, p. 493–502, 2011.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; et al. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, Roca: São Paulo, p. 335-354. 2006.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. D.; et al. Plantas/micotoxinas fotossensibilizantes. In: *Ibid.* (Eds), *Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção*. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro. p.323-335, 2012.

TÓTH, B.; CSÓSZ, M. ; DIJKSTERHUIS, J.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. *Pithomyces chartarum* as a pathogen of wheat, *Journal of Plant Pathology*, v.89, n. 3, p.405-408, 2007.

United States Food and Drug Administration (US-FDA), Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services; *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, May, 2001.

VILELA, H. *Pastagem: seleção de plantas forrageiras, implantação e adubação*. Viçosa: Aprenda Fácil, 2005. 283p.

WALLAART, T. E.; PRAS, N.; QUAX, W. J. Isolation and identification of dihydroartemisinic acid hydroperoxide from *Artemisia annua*: A novel biosynthetic precursor of artemisinin. *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 8, p. 1160–1162, 1999.

WANG, T.; LIU, Z.; LI, J.; et al. Determination of protodioscin in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 848, n. 2, p. 363–368, 2007.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K.. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production - A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 21, p. 8093–8105, 2005.

YAMORI, W.; SAKATA, N.; SUZUKI, Y.; et al. Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice. *Plant Journal*, v. 68, n. 6, p. 966–976, 2011.

YANG, D .J.; LU, T. J.; HWANG, L.S. Simultaneous determination of furostanol and spirostanol glycosides in taiwanese yam (*Dioscorea* spp.) cultivars by high performance liquid chromatography, *Journal of Food and Drug Analysis* v.11, n.4, p.271-276, 2003.