

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

Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistema de pastejo

Nome: Karine Bonucielli Brum
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Clorinda Soares Fioravanti

Goiânia
2006

KARINE BONUCIELLI BRUM

Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistema de pastejo

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

Área de Concentração:
Sanidade Animal

Orientadora:
Prof^a Dr^a Maria Clorinda Soares Fioravanti

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Beneval Rosa
Dr^a Mitsue Haraguchi

Goiânia
2006

Aos meus pais, Jussara e Flávio, que
acreditaram em mim, sempre me
incentivaram e apoiaram.

Ao meu noivo muito amado
Marcos Barbosa Ferreira.
Che rohayhu!

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Maria Clorinda Soares Fioravanti, exemplo de dedicação ao trabalho, sempre disposta a ensinar, orientar e ajudar os alunos de graduação e pós-graduação;

À amiga Cíntia e Ricardo que me receberam em sua casa em Goiânia com muito carinho mesmo sem me conhecer;

À amiga Raquel, colega de apartamento, sempre “alto astral”, distraída (nunca sabe onde está a chave do carro!) e com um grande coração;

Ao Yuki e o Tory, os mimosos gatinhos, nossos companheiros de apartamento, sempre de plantão nos divertindo com suas travessuras;

Ao amigo Valtuir da Silva Cardoso: motorista, colhedor de sangue, auxiliar de laboratório, “distrador” de peão chato.... Sem a tua ajuda as colheitas no campo teriam sido bem mais difíceis;

Aos professores do setor de patologia da EV da UFG;

Aos amigos funcionários do setor de patologia da EV da UFG Antonio Souza da Silva, João Vilela Teixeira e Silvana Aurélio;

Aos funcionários do laboratório de Patologia Clínica da EV da UFG: Helton Freires Oliveira, Maria Francisca e Wesley Francisco Neves;

Aos funcionários de campo da EV da UFG;

Ao Gerson Luis Barros, secretário da Pós-Graduação da EV da UFG;

Ao Prof Dr Beneval Rosa, meu primeiro orientador na EV da UFG;

Ao Médico Veterinário Antônio Silva Pinto da loja “Natural” de Jataí;

Aos proprietários das fazendas que gentilmente nos permitiram realizar esse experimento com seus animais;

Aos funcionários das fazendas que colaboraram durante as colheitas de campo;

Aos acadêmicos Juscelino e Ester; minha equipe de trabalho de campo mais constante, junto com o Valtuir;

Ao Murillo e demais alunos que me auxiliaram esporadicamente nas colheitas de campo e na realização dos exames laboratoriais;

À amiga Cissa e Alessandro, que me hospedaram e receberam com muito carinho em sua casa em Jataí durante as colheitas;

À Flávia e família que nos receberam em sua casa em Jataí;

A Coordenação do curso de Medicina Veterinária do campus de Jataí da UFG que nos permitiu utilizar suas dependências mesmo em horários pouco convencionais (sábados, domingos, feriados e às vezes até altas horas da noite);

A Dr^a Mitsue Haraguchi (sempre paciente ao tentar ensinar alguma coisa de química a uma veterinária) e ao Instituto Biológico;

A Prof^a Dr^a Silvana Lima Górnaiak e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP;

Aos colegas de pós-graduação e amigos: Adilson, Andréia, Anuzia, Bruno, Ediane, Gabriela, João, Kellen, Liandra, Liliana, Marcos, Marlos, Paulo Henrique, Renata, Suzana e Valter;

Ao Prof. Luiz Fernando Fleury do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFG, sempre pronto a nos ajudar com os diagnósticos complicados;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ocupo muito de mim com o meu desconhecer.
Sou um sujeito letrado em dicionários.
Não tenho que 100 palavras.
Pelo menos uma vez por dia me vou no Moraes ou
no Viterbo —
A fim de consertar a minha ignorãça,
mas só acrescenta.
Despesas para a minha erudição tiro nos almanaques:
— Ser ou não ser, eis a questão.
Ou na porta dos cemitérios:
— Lembra que és pó e que ao pó voltarás.
Ou no verso das folhinhas:
— Conhece-te a ti mesmo.
Ou na boca do povinho:
— Coisa que não acaba no mundo é gente besta
e pau seco.
Etc
Etc
Etc
Maior que o infinito é a encomenda.

...

Manoel de Barros

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
CAPÍTULO 2 - Spectrophotometric analysis of steroidal saponin from <i>Brachiaria forages</i>	20
INTRODUCTION.....	20
MATERIALS AND METHODS.....	22
RESULTS.....	23
DISCUSSION.....	24
REFERENCES.....	27
CAPÍTULO 3 - Crystal associated cholangiopathy in sheep grazing <i>Brachiaria decumbens</i> containing the saponin protodioscin.....	33
ABSTRACT.....	33
INTRODUCTION.....	34
MATERIAL AND METHODS.....	35
RESULTS.....	36
DISCUSSION.....	37
CONCLUSION.....	38
REFERENCES.....	38
CAPÍTULO 4 - Saponinas e <i>Pithomyces chartarum</i> como agentes hepatotóxicos de bovinos criados extensivamente na região sudoeste do Estado de Goiás.....	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
4.1 INTRODUÇÃO.....	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.2.1 Caracterização das propriedades.....	49
4.2.4 Determinação do índice pluviométrico.....	50
4.2.2 Colheita e avaliação do soro.....	51
4.2.3 Colheita e avaliação das pastagens que os bovinos eram mantidos.....	52
4.2.5 Análise estatística dos dados.....	54
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.3.1 Ganho de peso	56

4.3.2 Provas de função hepática.....	58
4.3.3 Número de esporos nas pastagens.....	65
4.3.4 Determinação e quantificação da saponina protodioscina.....	68
4.3.5 Relação entre fotossensibilização, quantidade de esporos e quantidade de saponinas.....	73
4.4 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS.....	76
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
ANEXOS.....	86

CAPÍTULO 1

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O termo fotossensibilização refere-se à sensibilidade exagerada da pele a luz solar, induzida pela presença de um agente fotodinâmico. Ocorre principalmente em áreas de pele despigmentada ou desprotegida de pêlo ou lã e o aparecimento das lesões é muito rápido (YAGER & SCOTT, 1993; TOKARNIA et al., 2000).

A fotossensibilização é classificada de acordo com a origem do agente fotodinâmico envolvido em: primária quando o agente é adquirido pré-formado; porfírica, congênita ou tipo II, na qual o agente é formado durante a síntese de pigmentos endógenos aberrantes; hepatógena ou tipo III que é secundária a um dano hepático que causa perturbações no mecanismo de eliminação da filoteritina (CLARE, 1952).

O tipo de fotossensibilização mais observado em bovinos é a hepatógena, sendo que os principais agentes envolvidos nos casos espontâneos descritos no Brasil são plantas tóxicas e algumas micotoxinas (TOKARNIA et al., 2000). Algumas espécies como *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria humidicola* e, especialmente, *Brachiaria decumbens* têm sido descritas como causadoras de fotossensibilização hepatógena em bovinos, ovinos, caprinos e eqüinos (GRAYDON et al., 1991; SCHENCK et al., 1991; SMITH & MILES, 1993; MEAGHER et al., 1996; LEMOS et al., 2002).

As espécies de *Brachiaria* sp (Gramineae) são importantes forrageiras de regiões tropicais como a África, Ásia, Austrália e América do Sul. Segundo FERRAZ (2003), no Brasil há aproximadamente 95 milhões de hectares (ha) cultivados com espécies de *Brachiaria*, sendo constituídos, principalmente de *Brachiaria brizantha* (60 milhões ha), *Brachiaria decumbens* (25 milhões ha), *Brachiaria humidicola* e outras (10 milhões de ha). No entanto, MACEDO (2005) relata que a estimativa é de que existam, aproximadamente, 60 milhões de ha de pastagens cultivadas na região do Cerrado brasileiro e em torno de 51 milhões de ha são ocupados por capins desse gênero, sendo 30 milhões de ha com *B.*

brizantha, 15 milhões de ha com *B. decumbens* e seis milhões de ha com *B. humidicola* e outras.

Dois tipos de *B. decumbens* foram introduzidos no Brasil, ambas de origem africana. O primeiro tipo chegou em 1952 através do Instituto de Pesquisas Experimentais Agropecuárias do Norte (IPEAN), tem origem africana e seu plantio era feito por estolhos (NOBRE & ANDRADE, 1976). O segundo tipo também africano, no entanto, proveniente da Austrália é a *B. decumbens* cv. Basilisk, ou braquiária australiana, que foi introduzida no país em 1972 e seu plantio era feito por sementes de alto poder germinativo (NOBRE & ANDRADE, 1976; ALCÂNTARA, 1986). A *B. brizantha* cv. Marandu tem origem nas regiões vulcânicas da África, por isso requer solos mais férteis. Foi introduzida no Brasil em 1967, mas só ficou disponível no mercado brasileiro a partir de 1977.

Os casos de fotossensibilização em bovinos, no Brasil, foram observados em pastagens formadas com as sementes do segundo tipo de *B. decumbens*, sendo descritos pela primeira vez em 1975 (NOBRE & ANDRADE, 1976; CAMARGO et al., 1976). A doença foi diagnosticada, também, em bovinos que eram mantidos em pastagens de *B. brizantha* (SCHENK & SCHENK, 1993; LEMOS et al., 1996c).

Alguns pesquisadores acreditam que os princípios tóxicos sejam saponinas esteroidais litogênicas que estão presentes na própria planta (SMITH & MILES, 1993; LEMOS et al., 1996a; LEMOS et al., 1996b; LEMOS et al., 1996c; CRUZ et al., 2000). Outros atribuem seus efeitos tóxicos a presença do fungo *Phitomyces chartarum* produtor da toxina esporidesmina (NOBRE & ANDRADE, 1976; TOKARNIA et al., 1979; FAGLIARI, 1990; FIORAVANTI, 1999).

1.1 Saponinas esteroidais

As saponinas esteroidais são glicosídeos com núcleo tipo furostanólico ou espirostanólico, que contém uma ou várias cadeias de açúcares. Seu nome deriva da propriedade mais característica desse grupo de compostos, que é a formação de espuma persistente e abundante quando em solução aquosa. Isso é possível graças a sua estrutura, composta de uma parte lipofílica, denominada aglicona ou sapogenina, e outra parte hidrofílica, que é formada pelas cadeias de

açúcar. As saponinas são produtos do metabolismo vegetal secundário, que apesar de não serem essenciais para a vida da planta produtora, garantem vantagens para sua sobrevivência no ecossistema a que pertence (SANTOS, 2000).

As saponinas de *Brachiaria decumbens* são derivadas das sapogeninas diosgenina (25R) e yamogenina (25S) (MEAGHER et al., 1996; CRUZ et al., 2000) que após passarem pelo metabolismo no trato gastro-intestinal dos animais vão resultar na sapogeninas epismilagenina e episarsasapogenina, respectivamente, que são as responsáveis pela formação dos cristais biliares. O mecanismo provável de formação dos cristais biliares envolve a hidrólise dos açúcares da saponina pelo metabolismo rumenal, seguida pela redução da dupla ligação (C5 – C6), depois epimerização do radical 3- β -OH para 3- α -OH e, finalmente, ocorre a conjugação com o ácido glicurônico. Os glicuronídeos de epismilagenina e episarsasapogenina se ligam com os íons de cálcio e formam sais insolúveis que se depositam nos ductos biliares na forma de cristais (MILES et al., 1991).

Saponinas esteroidais derivadas de diosgenina e yamogenina tem sido identificadas em *B. decumbens* e seus metabólitos tem sido isolados no rúmen de ovinos que se alimentam da mesma (SALAM ABDULLAH et al., 1992; SMITH & MILES, 1993). CRUZ et al. (2000) reproduziram experimentalmente colangiopatia associada a cristais em ovinos, os alimentado com *B. decumbens* e analisaram o capim, o conteúdo de rúmen e de vesícula biliar para a presença de sapogeninas. Esses autores identificaram a diosgenina como principal sapogenina presente no capim. No rúmen encontraram epismilagenina, episarsasapogenina e uma mistura de esmilagenina e sarsasapogenina. Na bile foram observados compostos semelhantes à epismilagenina e episarsasapogenina.

Foi conseguida a reprodução de sinais clínicos de colangiopatia associada a cristais em uma ovelha que ingeriu *B. decumbens* por 89 dias e lesões histológicas, sem sinais clínicos, compatíveis com a enfermidade em outros ovinos que ingeriram a planta por 77 e 150 dias (DRIEMEIER et al., 2002).

Um surto de colangiopatia associada a cristais foi observado em um grupo de 1.600 bovinos vindos do Pantanal de Mato Grosso, introduzidos em pastagem de *B. decumbens*, no qual adoeceram 70 e morreram 30 animais

(LEMOS et al., 1997). Os primeiros sinais clínicos foram observados, em cinco animais, dez dias após a entrada na pastagem, entretanto, cinco dias depois começaram as chuvas e novos casos da enfermidade ocorreram. As amostras de *B. decumbens* colhidas no piquete tinham menos de 5.000 esporos de *P. chartarum* por grama de pasto.

Em outra reprodução experimental de colangiohepatopatia associada a cristais, em ovinos, por meio da administração de extratos fracionados de *B. decumbens*, não foi conseguida a reprodução de sinais clínicos da doença nem alterações na bioquímica clínica (CRUZ et al., 2001). Os autores atribuíram esse fato a presença de lesões histológicas multifocais consistentes com o padrão da enfermidade, porém que não prejudicaram a excreção da filoeitrina.

NOORDIN et al. (1989) tentaram reproduzir fotossensibilização hepatógena em bovinos com alimentação espontânea de *B. decumbens*, por quatro semanas, mas não tiveram sucesso e concluíram que a gramínea não é tóxica para bovinos. Esses pesquisadores também administraram líquido ruminal, de ovinos intoxicados com a planta, para bovinos fistulados e, nesse caso, conseguiram alterações em alguns parâmetros séricos que indicaram disfunção hepática e renal, no entanto não foram observados sinais clínicos e não realizaram avaliação histológica dos animais do experimento.

A protodioscina, uma saponina esteroidal, foi isolada pela primeira vez por HARAGUCHI et al. (2003) das folhas de *B. decumbens* (Figura 1). Ela difere da dicotomina, uma saponina esteroidal isolada anteriormente de *Panicum dichotomiflorum*, pela ausência de uma molécula de ramnose. A dicotomina é descrita como responsável por surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos na Nova Zelândia (MUNDAY et al., 1993). MEAGHER et al. (1996) mostrou por ESI-MS (do inglês “electrospray ionization mass spectra”) no extrato etanólico de *P. dichotomiflorum* um íon pseudo-molecular m/z 1193, que corresponde a $(M-H)^-$ (perda de H^+ de um composto de peso molecular 1194). O extrato de *B. decumbens* mostrou um íon pseudo-molecular m/z 1047 com estrutura semelhante a da dicotomina sem a presença de uma molécula de ramnose.

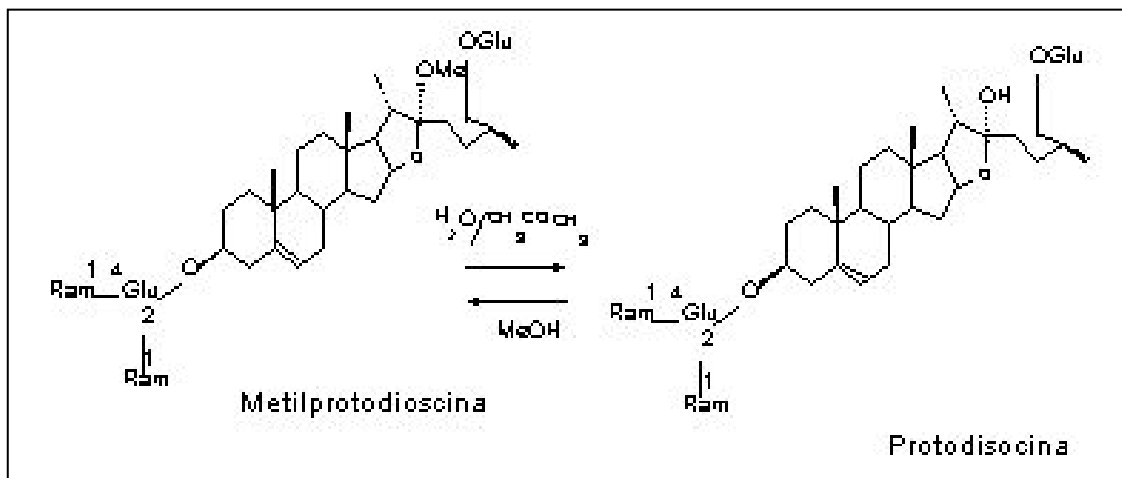


FIGURA 1 - Estrutura da metilprotodioscina e protodioscina

1.1.2 Epidemiologia

Surtos da intoxicação por espécies de *Brachiaria* em ovinos e caprinos sem a presença de níveis considerados tóxicos de esporos de *P. chartarum* foram descritos na Indonésia (GRAYDON et al., 1991), Malásia (ABAS-MAZNI et al., 1985) e África (OPASINA, 1985). No Brasil, são descritos casos clínicos em bovinos, ovinos e caprinos no Estado de Mato Grosso do Sul (LEMOS et al., 1996a; LEMOS et al., 1997; LEMOS et al., 1998) e Rio Grande do Sul (SEITZ et al., 2004).

São afetados principalmente bezerros recém desmamados, ou próximos ao desmame, mas bovinos adultos também podem adoecer. São descritos casos em bezerros lactentes, embora não seja a ocorrência mais comum. Ovinos de qualquer idade são sujeitos a intoxicação (GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996a; LEMOS et al. 1996b; LEMOS et al., 1996c; LEMOS et al., 2002). A morbidade é bastante variável e a mortalidade, normalmente, é baixa, mas podem ocorrer perdas expressivas. A enfermidade pode ocorrer em qualquer época do ano, mas em algumas situações como primeiro contato com a planta, ocorrência prévia de queimadas, pastos diferidos (reserva de alimento para o período de escassez de forragem) e secas prolongadas parecem predispor a ocorrência da intoxicação (LEMOS et al., 2002).

1.1.3 Sinais clínicos

Após um período de exposição ao sol, os animais apresentam inquietação, balançam a cabeça e as orelhas, esfregam ou coçam as áreas afetadas em objetos e procuram a sombra. As lesões de pele iniciam com eritema, seguido de edema, fotofobia e dor. Ocorre espessamento das partes afetadas da pele, com presença de exsudato e formação de crostas. O resultado é necrose e gangrena seca deixando a pele lesada com aspecto de casca de árvore que, finalmente, se desprende. São observados diferentes graus de icterícia, bilirrubinemia e bilirrubinúria (GRAYDON et al., 1991; TOKARNIA et al., 2000; LEMOS et al., 2002).

As lesões são mais graves nas regiões dorsais do corpo e nas partes expostas ao sol quando o animal se deita (RADOSTITS et al., 2000). As orelhas apresentam-se contorcidas e com os bordos voltados para cima, podendo haver ulcerações na parte ventral da língua, ceratite, opacidade de córnea e cegueira (LEMOS et al., 2002). Há aumento significativo nos níveis séricos de gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) nos casos de intoxicação pela gramínea (LEMOS et al., 1996a; LEMOS et al., 2002).

1.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico é feito pela associação do quadro clínico, epidemiológico, achados de necropsia e histopatológicos. Quando os animais são expostos ao sol apresentam inquietação, balançam a cabeça e as orelhas, esfregam ou coçam as áreas afetadas em objetos e procuram a sombra. As lesões de pele iniciam com eritema, seguido de edema, fotofobia e dor. Ocorre espessamento das partes afetadas da pele, com presença de exsudato e formação de crostas. O resultado é a necrose e gangrena seca deixando a pele lesada com aspecto de casca de árvore que, finalmente, se desprende. São observados diferentes graus de icterícia, bilirrubinemia e bilirrubinúria (GRAYDON et al., 1991; TOKARNIA et al., 2000; LEMOS et al., 2002).

As lesões são mais graves nas regiões dorsais do corpo e nas partes expostas ao sol quando o animal se deita (RADOSTITS et al., 2000). As partes mais afetadas são o úbere e os tetos, o focinho, a vulva, a barbeta, entre as

pernas, os flancos, e o períneo. As orelhas apresentam-se contorcidas e com os bordos voltados para cima. Os animais podem desenvolver ulcerações na parte ventral da língua, ceratite, opacidade de córnea e cegueira (LEMOS et al., 2002). Em casos graves podem ocorrer mortes em 2-3 dias sem que o animal apresente lesões de pele características. O período compreendido entre a ingestão da planta e o aparecimento dos sinais clínicos é bastante variável, podendo ser de dias a meses (GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996a; LEMOS et al., 1996b; LEMOS et al., 1996c; LEMOS et al., 1997). Há um aumento significativo nos níveis séricos de gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) (LEMOS et al., 2002).

Na necropsia além das lesões de pele, de língua e oculares descritas anteriormente, o fígado pode estar amarelado e aumentado de volume, sendo que podem ser observadas em casos mais crônicos extensas áreas de fibrose. A vesícula biliar pode se apresentar distendida e com bile viscosa e espessa. Os rins podem estar escurecidos e a urina também pode estar com coloração escura (acastanhada). Diversos graus de icterícia podem ser observados (LEMOS et al., 2002).

Microscopicamente as principais alterações são observadas no fígado e se caracterizam pela presença de cristais birrefringentes, opticamente ativos na luz de canalículos e ductos biliares, associados a colangite e pericolangite e proliferação das vias biliares. Em casos mais crônicos pode haver proliferação de tecido fibroso principalmente na região centroacinar. Também são observadas células gigantes multinucleadas com citoplasma espumoso que têm tendência a se agruparem, principalmente na região periacinar (DRIEMEIER et al., 1998). É bastante comum a presença dessas células em meio à fibrose nos casos de intoxicação por *Brachiaria* sp, embora possam ser observadas em fígados de animais sadios que se alimentem da mesma (LEMOS et al., 2002).

As saponinas presentes nas plantas podem ser quantificadas por métodos biológicos e espectrofotométricos. Os métodos biológicos não proporcionam resultados exatos já que algumas espécies de plantas possuem saponinas que não são detectadas com esses testes (OLESZEK, 2002).

Os métodos espectrofotométricos para identificação e quantificação de saponinas e/ou sapogeninas incluem a cromatografia em camada delgada (CCD),

a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês HPLC). A CCD em fase normal ou reversa proporciona excelente método qualitativo. A CLAE em colunas de fase reversa constitui a melhor e mais utilizada técnica para determinação de saponinas e/ou sapogeninas (OLESZEK, 2002).

1.2 *Pithomyces chartarum*

Pithomyces chartarum (Berk. & Curt.) M. B. Ellis (Dematiaceae) é um fungo saprófita, cosmopolita, observado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. É encontrado preferencialmente em matéria vegetal morta de pastagens nativas e, principalmente, nas cultivadas. O fungo é caracterizado por possuir micélio septado, de paredes finas, ramificado e anastomosado que forma conidióforos curtos (10 μ). Cada conidióforo origina um único conídio (esporo). Estes têm formato de barril, paredes grossas, coloração marrom e, normalmente, três septos transversais e 0 - 2 septos longitudinais, com dimensões de 15 a 30 μ por 9,5 a 16 μ (DINGLEY, 1962; TOKARNIA et al., 1979; KELLERMAN, COETZER, 1985). Não é possível classificar as espécies do fungo mediante comparação de número de septos e tamanho dos esporos porque alguns estudos de morfologia mostraram grande variação entre as espécies, influenciadas por fatores como temperatura e substrato de crescimento (DINGLEY, 1962).

O fungo é encontrado saprofiticamente em mais de 60 tipos de plantas e foi isolado de diversos tipos de forrageiras, como: *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria humidicola*, *Brachiaria ruziziensis*, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria dictioneura*, *Panicum maximum* (capim colônia), *Melinis minutiflora* (capim gordura), *Hyparrhenia rufa* (capim jaraguá), *Digitaria decumbens* (capim pangola), *Pennisetum purpureum* (capim napier ou elefante), *Setaria anceps* e *Cynodon dactylon* (MALAVOLTA et al., 1980; SEIFFERT, 1980; RUSSOMANNO et al., 1985; SCHENK et al., 1991).

Sob condições ambientais favoráveis são produzidos muitos conídios (esporos) que contém esporidesmina, uma toxina hepatotóxica (KELLERMAN et al., 1990; KELLY, 1993; ALVARIZA, 1993). A temperatura ideal para o crescimento do fungo é de 24°C. No entanto, temperaturas médias de 18°C

associadas à umidade relativa de 80%, dias nublados, com chuvas e abundante matéria vegetal morta permitem que o fungo complete o ciclo inteiro em três a quatro dias (ALVARIZA, 1993).

Contagens de 40.000 esporos por grama de pasto conseguem provocar sinais clínicos em bovinos e podem morrer com quantidades de 100.000, ou mais, esporos por grama de pasto. Em média um grama de esporos contém 0,8 mg de esporidesmina. Doses de 0,8 mg/kg de toxina são suficientes para que os animais desenvolvam sinais clínicos e doses de 1 mg/kg são capazes de causar morte (ALVARIZA, 1993).

Laboratorialmente, os meios de cultura constituídos de feno de *Brachiaria* proporcionam maior esporulação que o meio de batata-sacarose-ágar. A alternância de luz fluorescente e ausência de luz também favorece a ocorrência de esporulação. O crescimento do talo misceliano é otimizado nas temperaturas de 21 a 27°C (MALAVOLTA et al., 1983).

A produção de esporidesmina está relacionada com a esporulação do fungo. Em vista disso, a contagem dos conídeos nas pastagens é um bom indicador da toxidez nas mesmas. No entanto, é necessário que se determine a capacidade da cepa em produzir a esporidesmina (CRUZ, 1986). Há cepas que não são produtoras da toxina e quando avaliadas laboratorialmente com cepas produtoras da toxina na mesma placa de ágar e em folhas secas do capim *Panicum* sp (*ryegrass*), as não produtoras se sobressaíram e a quantidade de toxina produzida foi reduzida consideravelmente (COLLIN, TOWERS, 1995).

Além disso, há estudos que indicam que as cepas produtoras da toxina da Nova Zelândia são geneticamente diferentes das cepas não produtoras da esporidesmina da África do Sul e da América (BEEVER & PARKES, 1993).

No Brasil, tem-se conseguido poucos isolamentos do fungo e esses têm falhado em produzir esporidesmina. Em um estudo feito com 51 isolados de amostras de pastagens brasileiras formadas de *Brachiaria* sp que produziram casos de fotossensibilização, sendo 21 do Estado de Goiás e 30 do Mato Grosso, somente um dos isolados desse último Estado produziu esporidesmina (COLLIN et al., 1997). MEAGHER et al. (1996) observaram que amostras de *B. decumbens* que causaram surto de fotossensibilização hepatógena continham menos que

5.500 esporos de *P. chartarum* por grama de pasto seco e nenhum dos 21 isolados do fungo produziram esporidesmina.

1.2.3 Epidemiologia

Há casos da intoxicação pela esporidesmina na África do Sul (KELLERMAN & COETZER, 1985), Austrália (KELLERMAN et al., 1990), Nova Zelândia (PERCIVAL, 1959), Argentina (REGALADO, 1981) e Uruguai (ALVARIZA, 1993), porém nenhum deles ocorreu em pastagens do gênero *Brachiaria* sp. No Brasil, são descritos casos nos Estados de Mato Grosso, Goiás, São Paulo e Minas Gerais em bovinos e ovinos mantidos em pastagens de *B. decumbens* (TOKARNIA et al., 1979; FAGLIARI, 1990; FIORAVANTI, 1999).

O acúmulo de matéria vegetal morta no solo associado a dias nublados e com chuvas propiciam o crescimento do fungo e a produção da micotoxina (ALVARIZA, 1993).

São afetados, principalmente, bovinos com menos de 24 meses e ovinos de qualquer idade (NOBRE, ANDRADE, 1976; TOKARNIA et al., 1979; FAGLIARI, 1990). Bezerros lactantes (com menos de dois meses) podem ser acometidos, embora não seja a categoria mais comumente afetada (FAGLIARI, 1990).

As diversas espécies animais não têm a mesma sensibilidade para a ação de toxinas como, por exemplo, para a intoxicação por *Senecio brasiliensis* que os bovinos são muito mais sensíveis que ovinos e caprinos (TOKARNIA et al., 2000). Ao contrário, na intoxicação pela esporidesmina, sabe-se que os ovinos são mais sensíveis do que os bovinos (MORTIMER et al., 1978) e estes são, aparentemente, mais sensíveis que os caprinos (SMITH & EMBLING 1991; MORRIS et al., 2004). Algumas raças de ovinos e caprinos são mais sensíveis que outras (SMITH et al., 1980; SMITH & EMBLING 1991). Entre os caprinos, os da raça Saanen são mais susceptíveis do que os da raça Feral e animais cruzados Feral x Angorá (SMITH & EMBLING 1991). Os ovinos da raça Merino são mais resistentes porque seu sistema de enzimas microssomais, responsáveis pela metabolização de drogas, é mais ativo do que os de outras raças (SMITH et al., 1980). A razão para a maior resistência dos caprinos, em relação aos ovinos e

bovinos, parece estar associada com a maior capacidade do sistema de detoxificação dessa espécie animal (SMITH & EMBLING 1991).

1.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico é feito pela associação do quadro clínico, epidemiológico, achados de necropsia e histopatológicos. Os sinais clínicos são observados por volta de 10 a 14 dias após a introdução dos animais na pastagem contaminada e consistem naqueles já descritos para fotossensibilização causada por *Brachiaria* sp (KELLERMAN et al., 1990). A evolução é variável, sendo que os animais podem morrer entre dois e cinco dias após o início dos sinais clínicos ou podem levar até mais de 30 dias para se recuperarem das lesões de pele (FAGLIARI, 1990).

Segundo FAGLIARI et al. (1993a) e FAGLIARI et al. (1993b) a esporidesminotoxicose pode ter quatro formas de apresentação clínica, em bovinos. Na forma subclínica o animal apresenta somente perda de peso (2,52 %), níveis de gama glutamiltransferase (GGT) elevados e colangite. Na forma aguda observam-se lesões cutâneas leves e a morte pode ocorrer dois a cinco dias após o início dos sinais clínicos. Na forma crônica moderada, os sinais clínicos aparecem gradativamente e evoluem para a cura em oito a 30 dias, sendo observadas lesões cutâneas leves, colangite, aumento nos níveis de GGT e perda de peso (28,01 %). Na forma crônica grave, os sinais clínicos aparecem gradativamente e regredem espontaneamente entre trinta e cinqüenta dias, sendo que o animal apresenta lesões cutâneas severas, icterícia, acentuada perda de peso (39,28 %), aumento nos níveis de GGT e colangite. A aspartato aminotransferase (AST) também se encontra aumentada (HANSEN et al., 1994).

Em um estudo feito por FIORAVANTI (1999) foi observada uma prevalência de 64% de incidência subclínica da intoxicação pela esporidesmina e correlação negativa entre o ganho de peso e a presença de lesões hepáticas em animais sem sinais clínicos.

À necropsia pode ser observada icterícia generalizada na carcaça, fígado aumentado de tamanho com coloração amarelada, vesícula biliar distendida com edema de parede e mucosa com lesões ulcerativas e

inflamatórias (ALVARIZA, 1993). Os ductos biliares extra-hepáticos estão espessados e bastante evidentes. Em casos mais crônicos pode haver áreas esbranquiçadas no fígado e aumento da consistência do órgão alguns ductos biliares intra-hepáticos podem estar obstruídos, devido à proliferação de tecido fibroso e parênquima hepático adjacente a eles pode estar atrofiado, necrosado e com fibrose (KELLY, 1993). Podem ser observadas também hemorragias no epicárdio, petéquias nos rins, cistite e urina escura decorrente de hemoglobinúria (ALVARIZA, 1993).

As lesões microscópicas ocorrem principalmente nos ductos biliares, se caracterizando por colangite, pericolangite, bilestase, proliferação de ductos biliares e tecido fibroso (ALVARIZA, 1993, FIORAVANTI, 1999). Há vacuolização de hepatócitos, especialmente, na região centroacinar. Não há grande quantidade de células inflamatórias e os principais tipos celulares presentes são linfócitos e histiócitos. As lesões no parênquima hepático são mínimas, mas pode haver necrose de hepatócitos e vasos sangüíneos adjacentes aos ductos biliares das áreas portais afetadas e outras áreas de necrose, provavelmente, decorrentes da obstrução biliar (ALVARIZA, 1993; KELLY, 1993).

No estudo realizado por FIORAVANTI (1999) foram observados, também, macrófagos espumosos multinucleados nas formas subclínica e clínica da enfermidade.

A contagem de esporos na pastagem é considerada a melhor forma de medir a toxicidade das mesmas e o método utilizado é o descrito por DIMENNA, BAILEY (1973).

1.3 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser feito com outras causas de fotossensibilização hepatógena, que no Estado de Goiás incluem intoxicações por outras plantas como o tamboril (*Enterolobium* sp), o barbatimão (*Stryphnodendrum* sp), e o chumbinho (*Lantana* sp), pela micotoxina aflatoxina e a dermatofilose (causada pelo *Dermatophilus congolensis*).

Considerando a importância de *B. decumbens* e *B. brizantha* como forrageiras para a região Centro-Oeste é importante conhecer quais são os

fatores epidemiológicos envolvidos na ocorrência da intoxicação, visando estabelecer metas para um possível controle e, principalmente, profilaxia da enfermidade. Para tanto, é necessário estabelecer os níveis de saponinas presentes nessas plantas ao longo do ano, ao mesmo tempo em que se verifica a quantidade de esporos do fungo, *P. chartarum*, nas pastagens e, também, estabelecer se há relação desses fatores com o indício de lesões hepáticas.

Os objetivos deste trabalho foram:

- realizar o isolamento e quantificação da saponina protodioscina nas diferentes fases do ciclo vegetativo de *B. decumbens* e *B. brizantha*, verificando se a fase de desenvolvimento interferiu na quantidade de saponina da planta e se houve diferença na quantidade de saponina entre as duas espécies de *Brachiaria*;
- estudo de casos clínicos, em ruminantes, com contagem de esporos do fungo e dosagem de saponinas nas pastagens a fim de determinar o agente etiológico da enfermidade;
- avaliação de rebanhos bovinos mantidos em pastos de *Brachiaria* sp e quantificação da saponina esteroide protodioscina e esporos presentes nas pastagens ao longo do ano. Nessa última fase, foi feita avaliação da quantidade da saponina e de esporos e se houve diferenças com relação à estação do ano; avaliou-se a presença de alterações hepáticas, por meio da determinação da atividade sérica de gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) e dos valores de bilirrubina; verificou-se a existência de uma relação entre a quantidade da saponina e o número de esporos do fungo *Pithomyces chartarum* e a presença de lesões hepáticas e foi averiguado se a saponina estava presente em outras plantas forrageiras que os bovinos ingeriram.

REFERÊNCIAS

1. ABAS-MAZNI, O., SHARIF, H., KHUSAHRY, M. et al. Photosensitization in goats grazed on *Brachiaria decumbens*. **Mardi Reacearch Bulletin**, Selangor, West Malaysia, v. 13, n. 2, p. 203-206, 1985.
2. ALCÂNTARA, P. B. Origem das braquiárias e suas características morfológicas de interesse forrageiro. In: PEDREIRA, J. V. S.; MEIRELLES, N. M. F. (ed.). Encontro sobre capins do gênero *Brachiaria*. **Anais...**, Nova Odessa, 1986. 312 p.
3. ALVARIZA, F. R. Intoxicação por *Pithomyces chartarum*. In: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C.; SCHILD, A. L. (Ed.). **Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos**. Pelotas: Editorial Hemisfério Sul do Brasil, 1993, cap. 3, p. 93-101.
4. BEEVER, R. E.; PARKES, S. L. Variation of *Pithomyces chartarum*, causal agent of facial eczema. Proceedings of a Symposium on Mycotoxicosis of Grassland Farming. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 41, n. 4, p. 212-224, 1993.
5. CAMARGO, W. V. A.; NAZARIO, W.; FERNÁNDEZ, N. S.; AMARAL, R. E. M. Fotossensibilização em bovinos de corte. Provável participação do fungo *Pithomyces chartarum*, na etiologia do processo. **Biológico**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 249-261, 1976.
6. CLARE, N. T. **Photosensitization in diseases of domestic animals**. Inglaterra: Larnport Gilbert, 1952. 58p.
7. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (ed.). **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. 279 p.
8. COLLIN, R. G.; TOWERS, N. R. Competition of a sporidesmin-producing *Pithomyces* strain with a non-toxicogenic *Pithomyces* strain. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 43, n. 4, p. 149-152, 1995.
9. CRUZ, L. C. H. Isolamento do *Pithomyces chartarum* de *Brachiaria decumbens* e alguns fatores que influem sobre a esporulação. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 5, p. 139-142, 1986.
10. CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V. S.; COLODEL, E. M.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazin *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 42, n. 3, p. 142-145, 2000.
11. CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V. S.; SCHENKEL, E. P. Experimentally induced cholangiopathy by dosing sheep with fractionated

- extracts from *Brachiaria decumbens*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Stillwater, v. 13, p. 170-172, 2001.
12. DiMENNA, M. E.; BAILEY, J. R. *Pithomyces chartarum* spore counts in pasture. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 16, n. 3, p. 343-351, 1973.
 13. DINGLEY, J. M. *Pithomyces chartarum*, its occurrence, morphology and taxonomy. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 5, p. 49-61, 1962.
 14. DRIEMEIER, D.; BARROS, S. S.; PEIXOTO, P. V.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; BRITO, M. F. Estudos histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos ("foam cells"). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 29-34, 1998.
 15. DRIEMEIER, D.; COLODEL, E. M.; SEITZ, A. L.; BARROS, S. S.; CRUZ, C. E. F. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p. 1027-1031, 2002.
 16. FAGLIARI, J. J. **Estudo epidemiológico, clínico e laboratorial da intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina**. 1990. 107f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
 17. FAGLIARI, J. J.; OLIVEIRA, J. A.; KUCHEMUCK, M. R. G. CURI, P. R. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. III. Desenvolvimento ponderal de bovinos intoxicados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 3, p. 283-289, 1993a.
 18. FAGLIARI, J. J.; KUCHEMUCK, M. R. G. CURI, P. R. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 3, p. 275-282, 1993b.
 19. FERRAZ, F. M. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. In: NAKAMAE, I. J. (ed.) **Anualpec – Anuário da Pecuária Brasileira**, 10^a ed., São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2003, p. 55-56.
 20. FIORAVANTI, M. C. S. **Incidência, avaliações clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos**. 1999. 256f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
 21. GRAYDON, R. J.; HAMID, H.; ZAHA, R. I. P.; GARDINER, C. Photosensitization and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep

- grazing *Brachiaria decumbens*. **Australian Veterinary Journal**, Queensland, v. 68, n. 7, p. 234-236, 1991.
22. HANSEN, D. E.; McCOY, R. D.; HEDSTROM, O. R.; SNYDER, S. P.; BALLERSTEDT, P. B. Photosensitization associated with exposure to *Pithomyces chartarum* in lambs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Shaumburg, v. 204, n. 10, p. 1668-1671, 1994.
23. HARAGUCHI, M.; CUNHA, H. A.; MIMAKI, Y.; BRUM, K. B.; LEMOS, R. A. A.; YOKOSUKA, A., SASHIDA, Y. Furostanol glicosídicos nas folhas de *Brachiaria decumbens*. **Proceedings of the 26th Annual meeting of the Chemical Brazilian Society** PN-066, 2003.
24. KELLERMAN, T. S.; COETZER, J. A. W. Hepatogenous photosensitivity diseases in South Africa, **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 52, n. 3, p. 157-173, 1985.
25. KELLERMAN, T. S.; COETZER, J. A. W.; NANDÉ, T. W. **Plant Poisonings and Micotoxicosis of Livestock in Southern Africa**. 2.ed. Cape Town: Oxford University, 1990. 243 p.
26. KELLY, W. R. Liver and biliary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C; PALMER, N. **Pathology of domestic Animals**, 4.ed. San Diego: Academic, 1993. v. 2. cap. 2, p. 319-406.
27. LEMOS, R. A. A.; PURISCO, E. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena. In: LEMOS, R. A. A.; BARROS, N.; BRUM, K. B. (Org.). **Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte: perguntas e respostas**. Campo Grande: UFMS, 2002. 292 p.
28. LEMOS, R. A. A.; FERREIRA, L. C. L.; SILVA, S. M.; NAKAZATO, L.; SALVADOR, S. C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 109-113, 1996a.
29. LEMOS, R. A. A.; NAKAZATO, L.; HERRERO JR, G. O.; SILVEIRA, A. C.; PORFÍRIO, L. C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 507-510, 1998.
30. LEMOS, R. A. A.; OLIVEIRA, V. A.; HERRERO JR, G. O.; FERREIRA, M. B.; ALMEIDA, A. J. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bovinos lactentes associada a ingestão de *Brachiaria decumbens*. Abstracts: XV PANVET. **Abstracts...** Campo Grande, 1996b. p. 170.
31. LEMOS, R. A. A.; OSÓRIO, A. L. A. R.; RANGEL, J. M. R.; HERRERO JR, G. O. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bezerros ingerindo *Brachiaria brizantha*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63 (supl.), p. 22, 1996c.

32. LEMOS, R. A. A.; SALVADOR, S. C.; NAKAZATO, L. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 39, n. 6, p. 376-377, 1997.
33. MACEDO, M. C. M. Pastagens no Ecossistema Cerrados: Evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia – A produção animal e o foco no agronegócio, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiás: Universidade Federal de Goiás, 2005. p. 56-84.
34. MALAVOLTA, V. M. A.; AMARAL, R. E. M.; RIPINSKAS, O. M. Plantas hospedeiras e distribuição geográfica do fungo *Pithomyces chartarum* (erk. & Curt.) M.B. Ellis no Brasil. **Biológico**, v.46, n.3/4, p.59-76, 1980.
35. MALAVOLTA, V. M. A.; RUSSOMANO, R. E. M. A.; CHIBA, S. Estudos sobre o fungo *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M. B. Ellis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.50, n.1/4, p.65-79, 1983.
36. MEAGHER, L. P.; MILES, C. O.; FAGLIARI, J. J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 38, n. 4, p. 271-274, 1996.
37. MILES, C. O.; MUNDAY, S. C.; HOLLAND, P. T.; SMITH, B. L.; EMBLING, P. P.; WILKINS, A. L. Identification of a saponin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 39, p. 150-152, 1991.
38. MORRIS, C. A.; TOWERS, N. R.; HOHENBOKEN, W. D.; MAQBOOL, N.; SMITH, B. L.; PHUA, S. H. Inheritance of resistance to facial eczema: a review of research findings from sheep and cattle in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 52, n. 5, p. 205-215, 2004.
39. MORTIMER, P. H.; MENNA, M. E.; M. E.; WHITE, E. P. Pithomycotoxicosis. "Facial eczema" in cattle. In: WYLLIE, T. D.; MOREHOUSE, L. G. (ed.) **Micotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedic Handbook**, New York: Marcel Dekker. 1978, v. 2, p. 63-72.
40. MUNDAY, S. C.; WILKINS, A. L.; MILES, C. O.; HOLLAND, P. T. Isolation and structure elucidation of dichotomin, a furostanol saponin implicated in hepatogenous photosensitization of sheep grazing *Panicum dichotomiflorum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 41, p. 267-271, 1993.

41. NOBRE, D.; ANDRADE, S. O. Relação entre fotossensibilização em bovinos jovens e a gramínea *Brachiaria decumbens* Stapf. **Biológico**, São Paulo, v. 42, n. 11/12, p. 249-258, 1976.
42. NOORDIN, M. M.; SALAM ABDULLAH, A.; RAJION, M. A. Experimental *Brachiaria decumbens* toxicity in cattle. **Veterinary Research Communication**, Amsterdam, v. 13, p. 491-494, 1989.
43. OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, n. 967, p. 147-162, 2002.
44. OPASINA, B. A. Photosensitization jaundice syndrome in West African dwarf goats and sheep. **Trop Grasslands**, Brisbane, v. 19, p. 120-123, 1985.
45. PERCIVAL, J. C. Photosensitivity diseases in New Zealand. XVII. The association of *Sporidesmium bakeri* with facial eczema. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, n. 5, p. 1041-1056, 1959.
46. RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**, 9 ed. Sydney: W.B. Saunders, 2000. 1877 p.
47. REGALADO, A. M. Intoxicación por *Pithomyces chartarum* em bovinos em el partido de Dareaux, Buenos Aires. **Gaceta Veterinária de Buenos Aires**, Buenos Aires, T. XLIII, n. 361, p. 471-473, 1981.
48. RUSSOMANO, O. M. R.; AMARAL, R. E. M.; MALAVOLTA, V. M. A.; ALCÂNTARA, V. B. G.; SCHAMMASS, E. A. Ocorrência do fungo *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M. B. Ellis em forrageiras pastoreadas por bovinos. **Revista de Agricultura**, v.60, n.3, p.249-265, 1985.
49. SALAM ABDULLAH, A. LAJIS, N. H.; BREMNER, J.B. ; DAVIES, N. W.; MUSTAPHA, W.; RAJION, M. A. Hepatotoxic constituents in the rumen of *Brachiaria decumbens* intoxicated sheep. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 34, n. 2, p. 154-155, 1992.
50. SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora da UFRGS e Editora da UFSC, 2000. p 323-354.
51. SCHENK, M. A. M.; NUNES, S. G.; SILVA, J. M.; Ocorrência de fotossensibilização em eqüinos mantidos em pastagens de *Brachiaria humidicola*. **Comunicado Técnico**, EMBRAPA-CNPQC, Campo Grande, n. 40, p. 1-4, 1991.

52. SCHENK, M. A. M.; SCHENK, J. A. P. Fotossensibilização hepatógena em bovinos: aspectos gerais. **Comunicado Técnico**, EMBRAPA-CNPGC, Campo Grande, n. 19, p. 1-7, 1993.
53. SEIFFERT, N. F. **Gramíneas Forrageiras do Gênero *Brachiaria***. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGC. 1980. 83p. (CNPGC. Circular Técnica. 01).
54. SEITZ, A. L.; ROZZA, D. B.; FELTRIN, C.; TRAVERSO, S. D.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D. Fotossensibilização por *Brachiaria decumbens* em ovinos no Rio Grande do Sul. In: 1º Simpósio Latino-Americano de Plantas Tóxicas, 2004, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Pesquisa Veterinária Brasileira, 2004. 24 (supl): 67.
55. SMITH, B. L.; EMBLING, P. P. Facial eczema in goats: the toxicity of sporidesmin in goats and its pathology. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 39, p. 18-22, 1991.
56. SMITH, B. L.; MILES, C. O. A letter to the editor: a role for *Brachiaria decumbens* in heoatogenous photosensitization of ruminants? **Veterinary and Human Toxicolgy**, Manhattan, v. 35, n. 3, 1993.
57. SMITH, B. L.; STAMBRIDGE, T. A.; EMBLING, P. P. Sheep breed differences in pentobarbitone sleeping-time and response to experimental sporidesmin intoxication. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 28, p. 35-36, 1980.
58. TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 310 p.
59. TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia: a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: INPA, 1979. 95 p.
60. YAGER, J. A.; SCOTT, D .W. The skin and appendages. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C; PALMER, N. **Pathology of domestic Animals**, 4 ed. San Diego: Academic, 1993. v. 2, cap. 5, p. 531-738.

CAPÍTULO 2

Spectrophotometric analysis of steroidal saponin from *Brachiaria* forages

K.B. Brum^{1*}, M. Haraguchi³, M.B. Garutti³, F.N. Nóbrega³, B. Rosa² and M.C.S. Fioravanti¹

¹*Departamento de Medicina Veterinária and* ²*Departamento de Produção Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 131, Goiânia, Goiás, Brasil, CEP 74001-970;* ³*Instituto Biológico - Centro de P & D de Sanidade Animal, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, São Paulo, São Paulo, Brasil, CEP 04014-002*

**Correspondence: Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 131, Goiânia, Goiás, Brasil, CEP 74001-970*

E-mail: kbbrum@gmail.com

Keywords: Brachiaria sp, photosensitization, protodioscin, spectrophotometry, steroidal saponins

Abbreviations: ha, hectare; TLC, thin layer chromatography

INTRODUCTION

Photosensitization outbreaks in ruminants are an economic problem of great importance in several countries of the world. The most common is the hepatogenous photosensitization due to ingestion of toxic principle produced by

plant, fungus or alga which affects the entero-hepatic system and can to produce impaired growth, decreased weight gain and milk production, abortions, sequels (scars that undervalue the leather, deformations, blindness) and mortality of animals. These economic losses are very difficult to be calculated but reveals great impact, being difficult to identify and quantify, since mortality is not common at this case (Abdullah and Rajion, 1997).

In Brazil, there are around 95 millions hectare (ha) cultivated with *Brachiaria* species being constituted by *B. brizantha* (60 millions ha), *Brachiaria decumbens* (25 millions ha) and others (10 millions ha) which are used to livestock (Ferraz, 2003). The outbreaks of hepatogenous photosensitization have been described in cattle, sheep, goat and horse grazing, mainly, *B. decumbens* cv Basilisk (Graydon *et al.*, 1991; Schenk *et al.*, 1991; Smith and Miles, 1993; Lemos *et al.*, 1996a; Lemos *et al.*, 1996b; Lemos *et al.*, 1997; Lemos *et al.*, 1998; Meagher *et al.*, 1996; Fioravanti, 1999).

Ruminants which develop hepatogenous photosensitization due to *Brachiaria* sp ingestion present histologic lesions of cholangiohepatopathy characterized by birefringent crystals deposition in bile ducts and hepatocytes, similar to those occurring in the intoxications by *Panicum* sp (Bridges *et al.*, 1987; Holland *et al.*, 1991), *Nartheceium ossifragum* (Ceh and Hauge, 1981), *Agave lecheguilla* (Camp *et al.*, 1988), and *Tribulus terrestris* (Glastonbury *et al.*, 1984; Jacob and Peet, 1987), which contain litogenic saponins. This indicates the possibility of *Brachiaria* pasture contains those active principles too (Smith and Miles, 1993; Lemos *et al.*, 1996a; Lemos *et al.*, 1996b; Lemos *et al.*, 1997; Lemos *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 2000). These crystals have been reported as being insoluble salts of sapogenin

glucuronides originated from the saponins present in the corresponding plants (Miles *et al.*, 1991; Miles *et al.*, 1994).

Cholangiopathy associated with crystals was reproduced by supplying sheep with *B. decumbens* and its fractionated extract (Cruz *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2001). Different sapogenins were found in samples of this pasture, ruminal content and bile. In both experiments, *Pithomyces chartarum* spores quantity was very low. In addition, recently, a furostanolic steroidal saponin known as 25R- e 25S-protodioscin isomers in *B. decumbens* leaves was isolated for the first time (Haraguchi *et al.*, 2003).

Saponins are present in more than a hundred species of plants whose concentrations can vary due to several factors such as age, phase of vegetative cycle and environmental stress (Oleszek, 2002).

Because of the great relevance of *B. brizantha* cv Marandu and *B. decumbens* cv Basilisk as forages to Brazilian savannah regions, it is important to establish the saponins level present in these plants during their vegetative cycle. Such data will be able to help in pastures and animals management, in order to clear the photosensitization etiopathogeny caused by *Brachiaria* sp.

MATERIALS AND METHODS

In two plots (2 m x 3 m), located at Veterinary School at Universidade Federal de Goiás, Goiás State, Brazil, previously fertilized (Vilela *et al.*, 2002), it was sown *B. brizantha* cv Marandu and *B. decumbens* cv Basilisk, produced by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Cerrados (Goiânia, Goiás State, Brazil), on 11/20/2002 and 01/15/2003, respectively. A month after sowing, ammonium sulphate (500 Kg/ha) was applied in surface, without incorporation, in

both plots. The growth of these plants was weekly followed and sampled at four vegetal development phases (growth, bloom, fructification and after fall of seed), including the seeds.

Each sample of different phase was cut 3 cm high, dried in oven at 50° C and crushed. Ten grams of powder of each growing phase were extracted with 96% ethanol. The ethanolic extract was concentrated under reduced pressure and successively partitioned in several immiscible solvents: water/ethylic ether, water/ethyl acetate and water/butanol saturated with water. The ether-soluble, ethyl acetate-soluble and butanol-soluble solutions were evaporated to dryness to obtain their respective residues. The butanol-soluble residue containing saponin was submitted to thin layer chromatography (TLC) using silica gel 60 GF254 glass plate (Merck® S.A.), developed in chloroform, methanol and water system (16:9:2). The spots were visualized by spraying with 10% aqueous sulphuric acid and with Ehrlich reagent after heating to 110° C for 10 min and compared with protodioscin isomers isolated from *B. decumbens* (Haraguchi *et al.*, 2003). Calibration curve and level of protodioscin isomers in butanolic residues of both *Brachiaria* leaves (Figure 1) were obtained by spectrophotometer method using Ehrlich reagent (Merck® S.A.) and the reading was performed at 515 nm using spectrophotometer U-2001 (Shimadzu®) (Gjulemetowa *et al.*, 1982).

RESULTS

Thin layer chromatography plate applied with the butanolic fraction from *B. brizantha* cv Marandu and *B. decumbens* cv Basilisk from each phase of vegetative cycle showed spots similar to protodioscin isomers standard (R_f 0.28, R_f 0.34) through spray with 10% aqueous sulphuric acid and Ehrlich reagent,

however, the seeds did not contain protodioscin isomers. These data corroborated the occurrence of furostanol-like steroidal saponin indicated here as protodioscin isomers previously described in *B. decumbens* leaves (Haraguchi *et al.*, 2003). The absorbance in calibration curve measured was linearly proportional to saponin concentration, at the interval of 0.1 to 0.4 mg/ml, in accordance with the expression $A=0.2661c+0.0053$, being $r^2= 0.9999$ (A = absorbance; c = protodioscin isomers concentration) (Figure 1). Thus, the estimated protodioscin isomers level in *B. brizantha* and *B. decumbens* grass in different vegetative cycle stages varied from 0.53% to 2.09%, being higher level in the end of *B. brizantha* and *B. decumbens* vegetative cycle in comparison with the other phases (Table 1).

DISCUSSION

Diosgenin and yamogenin, sapogenins obtained of *B. decumbens* by acid hydrolysis, showed higher quantities in younger plants when compared with mature ones (Meagher *et al.*, 1996). However, the protodioscin isomers levels in *B. brizantha* and *B. decumbens* detected at the present study, showed risen during the maturation of the plant. Despite this, it was observed that sapogenins content can vary in the same species when they are cultivated in different sites (Meagher *et al.*, 1996). Therefore, concentrations of saponin in the plant can vary due to several factors such as environmental stress and the plant age besides phase of the vegetative cycle (Oleszek, 2002).

A hepatogen photosensitization outbreak was recently described in sheep grazing *B. decumbens* pasture (Brum *et al.*, 2004). The protodioscin isomers dosage was performed in the paddock where these animals were kept and in a neighbor paddock formed with the same type of grass, however with no sick

animals. The saponin level was greater in the sheep paddock than in the neighbor paddock (2.36% and 1.63%, respectively), however, the plants were at the bloom stage when the outbreak occurred, and not with seed fall, which would be the phase with higher saponin concentration according to the results obtained from the present study.

Due to the presence of high level of steroidal saponin at the end of *B. brizantha* and *B. decumbens* vegetative cycle in relation to other phases, it may be possible to suggest that this phase is the most favourable to the occurrence of intoxication in ruminants in these studied pastures. However, the occurrence of an outbreak in sheep (Brum *et al.*, 2004) at the bloom phase suggests that for this animal specie, it is not necessary that the plants contain the maximum level of saponin or that the plant would produce greater saponin quantity at that moment. Because of this, it is necessary to study the steroidal saponin level in relation to vegetative stage of *Brachiaria* pastures and the liver alterations occurring in ruminants, in order to determine the role of saponins as responsible for outbreaks in these animals.

In conclusion, the determination of protodioscin isomers levels using Ehrlich method by spectrophotometric analysis in the vegetative cycle of *B. brizantha* and *B. decumbens* grasses are pioneer in literature and, this way, can help to control the occurrence of photosensitization in ruminants maintained at this pastures.

Acknowledgements. To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by financial support.

REFERENCES

- Abdullah, S.A. and Rajion, M.A., 1997. Dietary factors affecting entero-hepatic function of ruminants in the tropics, *Animal Feed Science Technology*, 69, 79-90
- Bridges, C.H., Camp, B.J., Livingston, C.W. and Bailey, E.M., 1987. Kleigrass (*Panicum coloratum* L.) poisoning in sheep, *Veterinary Pathology*, 24, 525-531
- Brum, K.B., Haraguchi, M., Lemos, R.A.A. and Fioravanti, M.C.S., 2004. Colangiopatia associada a cristais em ovinos mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens*, In: *Anais do 1º Simpósio Latino-Americano de Plantas Tóxicas*, (Pesquisa Veterinária Brasileira, 24, suplemento), 14
- Camp, B.J., Bridges, C.H., Hill, D.W., Patamalai, B. and Wilson, S., 1988. Isolation of steroidal sapogenin from the bile of a sheep fed *Agave lecheguilla*, *Veterinary and Human Toxicology*, 30, 533-535
- Ceh, L. and Hauge, J.G., 1981. Alvelo – producing saponins. I. Chemical studies, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22, 391-402
- Cruz, C., Driemeier, D., Pires, V.S., Colodel, E.M., Taketa, A.T.C. and Schenkel, E.P., 2000. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil, *Veterinary and Human Toxicology*, 42, 142-145
- Cruz, C., Driemeier, D., Pires, V.S. and Schenkel, E.P., 2001. Experimentally induced cholangiopathy by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria decumbens*, *Veterinary Diagnostic Investigation*, 13, 170-172
- Ferraz, F.M., 2003. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. In: Nakamae IJ (ed), *Anualpec – Anuário da Pecuária Brasileira*, (FNP Consultoria e Agroinformativos, São Paulo, SP), 55-56

- Fioravanti, M.C.S., 1999. *Incidência, avaliações clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos*, (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista)
- Gjulemetowa, R., Tomowa, M., Simowa, M., Pangarowa, T. and Peewa, S., 1982. Über die Bestimmung von Furostanolsaponinen im Präparat Tribestan, *Pharmazie*, 37, 296
- Glastonbury, J.R.W., Doughty, F.R., Whitaker, S.J. and Sergeant, E., 1984. A syndrome of hepatogenous photosensitization, resembling geldikkop, in sheep grazing *Tribulus terrestris*, *Australian Veterinary Journal*, 61, 314-316
- Graydon, R.J., Hamid, H., Zaha, R.I.P. and Gardiner, C., 1991. Photosensitization and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*, *Australian Veterinary Journal*, 68, 234-236
- Haraguchi, M., Cunha, H.A., Mimaki, Y., Brum, K.B., Lemos, R.A.A., Yokosuka, A. and Sashida, Y., 2003. Furostanol glicosídicos nas folhas de *Brachiaria decumbens*, Anais da 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas PN-066
- Holland, P.T., Miles, C.O., Mortimer, P.H., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D. and Smith, B.L., 1991. Isolation of the steroidal sapogenina epismilagenin from the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1963-1965
- Jacob, R.H. and Peet, R.L., 1987. Poisoning of sheep and goats by *Tribulus terrestris* (caltrop), *Australian Veterinary Journal*, 64, 288-9

- Lemos, R.A.A., Ferreira, L.C.L., Silva, S.M., Nakazato, L. and Salvador, S.C., 1996a. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*, *Ciência Rural*, 26, 109-113
- Lemos, R.A.A., Nakazato, L., Herrero Jr, G.O., Silveira, A.C. and Porfírio, L.C., 1998. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul, *Ciência Rural*, 28, 507-510
- Lemos, R.A.A., Osório, A.L.A.R., Rangel, J.M.R. and Herrero Jr, G.O., 1996b. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bezerros ingerindo *Brachiaria brizantha*, *Arquivos do Instituto Biológico*, 63 (supl), 22
- Lemos, R.A.A., Salvador, S.C. and Nakazato, L., 1997. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil, *Veterinary and Human Toxicology*, 39, 376-377
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Erasmus, G.L., Kellerman, T.S. and Coetzer, J.A.W., 1994. Photosensitivity in South Africa. VII. Chemical composition of biliary crystals from a sheep with experimentally induced geeldikkop, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 61, 215-222
- Miles, C.O., Munday, S.C., Holland, P.T., Smith, B.L., Embling, P.P. and Wilkins, A.L., 1991. Identification of a sapogenin glucoronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis, *New Zealand Veterinary Journal*, 39, 150-152
- Meagher, L.P., Miles, C.O. and Fagliari, J.J., 1996. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible, *Veterinary and Human Toxicology*, 38, 271-274

- Oleszek, W.A., 2002. Chromatographic determination of plant saponins, *Journal of Chromatography A*, 967, 147-162
- Schenk, M.A.M., Nunes, S.G. and Silva, J.M., 1991. Ocorrência de fotossensibilização em eqüinos mantidos em pastagens de *Brachiaria humidicola*, *Comunicado Técnico*, (EMBRAPA-CNPGC, Campo Grande), 40, 1-4
- Smith, B.L. and Miles, C.O., 1993. A letter to the editor: a role for *Brachiaria decumbens* in hepatogenous photosensitization of ruminants?, *Veterinary and Human Toxicology*, 35
- Vilela, L., Soares, W.V., Sousa, D.M.G. and Macedo, M.C., 2002. Calagem e adubação para pastagens, In: Sousa, D.M.G. and Lobato, E. (eds), *Cerrado – correção do solo e adubação*, (EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF), 367-382

Table 1: Age of plants (days) and protodioscin isomers percentage (%) in *B. brizantha* and *B. decumbens* samples in different phases of vegetative cycle

Phases of vegetative cycle	<i>B. brizantha</i>		<i>B. decumbens</i>	
	Age of plants (days)	Protodioscin isomers (%)	Age of plants (days)	Protodioscin isomers (%)
Seeds	0	0	0	0
Grown	56	0.53	56	0.92
Bloom	96	1.03	62	0.95
Fructification	141	0.82	86	0.82
Seed fall	218	2.09	162	1.94

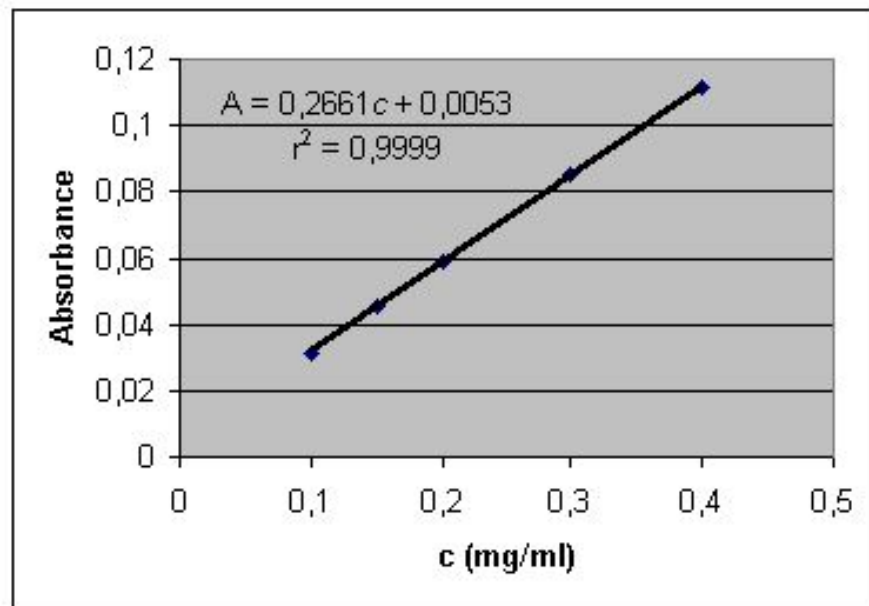


Figure 1. Calibration curve and level of protodioscin isomers in *Brachiaria* sp leaves obtained by spectrophotometer method. A= absorbance; c= protodioscin isomers concentration

CAPÍTULO 3

Crystal associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscinK.B. Brum^{a*}, M. Haraguchi^b, R.A.A. Lemos^c, F. Riet-Correa^d, M.C.S. Fioravanti^a^aUniversidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Caixa Postal 131, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brasil^bInstituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, São Paulo, SP, Brasil, CEP 04014-002^cUniversidade Federal de Mato Grosso do Sul, Núcleo de Ciências Veterinárias, Av. Senador Felinto Müller, 2443, Jd.

Ipiranga, Caixa Postal 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil

^dCentro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brasil CEP 58700-000**Abstract**

An outbreak of hepatogenous photosensitization is reported in a flock of 28 sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Mato Grosso do Sul State, Central-Western Brazil. Seven lambs and an adult sheep were affected and 6 of them died. Two surviving affected lamb and one lamb without clinical signs had increased serum values of gamma glutamyltransferase, bilirubin, and cholesterol. In two adult unaffected sheep those parameters were within normal values. Serum levels of aspartate aminotransferase, total proteins and albumin were within normal values in the 5 animals. An adult sheep submitted to necropsy presented moderate body condition, unilateral corneal opacity, drying of the muzzle, moderate jaundice, increased lobular pattern of the liver, and distended gallbladder. Histological lesions were epithelial degeneration, necrosis, and hyperplasia of small bile ducts. Mild amounts of foamy macrophages were observed, mainly in the centroacinar zone. Diffuse swelling and vacuolation were observed in hepatocytes. Crystal negative images were observed within the bile ducts, foamy macrophages, and lumen of some renal tubules. The heart had multifocal areas of degeneration and necrosis of the muscle fibers. Samples of pasture (*Brachiaria decumbens*) contained 2.36% of protodioscin. No *Pithomyces chartarum* spores were found in the pasture. Samples from a similar neighboring pasture (*B. decumbens*) grazing by cattle without photosensitization had 1.63% of protodioscin isomers. Outbreaks of photosensitization caused by *Brachiaria* spp

* Corresponding author. Tel.: (0xx62) 3521-1598
Email: kbbrum@gmail.com (K.B. Brum)

34 are common in cattle in the Brazilian cerrado (savanna) where there are
35 approximately 51 million hectares of *Brachiaria* spp pastures. Sheep farming has
36 been recently developed in this region, and the number of sheep is increasing
37 significantly. Because sheep are more susceptible than cattle to lithogenic
38 saponins intoxication by *Brachiaria* should be an important limiting factor for sheep
39 industry.

40

41 **Keywords:** sheep, photosensitization, *Brachiaria decumbens*, protodioscin,
42 steroidal saponin, cholangiopathy

43

44 **1. Introduction**

45 *Brachiaria* species are important forages from tropical regions such Africa,
46 Asia, Australia and South America. In the Brazilian Cerrado (savanna) there are
47 around 51 millions hectares of *Brachiaria* spp., mainly *Brachiaria brizantha*
48 (30millions ha), *Brachiaria decumbens* (15 millions ha), *Brachiaria humidicola* and
49 others (seis millions ha) (Macedo, 2005).

50 In Brazil, spontaneous cases of hepatogenous photosensitization by *Brachiaria*
51 *decumbens* had been reported in cattle (Meagher et al., 1996; Lemos et al., 1997),
52 sheep (Lemos et al., 1996a), and goats (Lemos et al., 1998). Intoxication by
53 *Brachiaria brizantha* is reported in cattle (Lemos et al., 1996b) and in sheep
54 (Lemos, personal communication). Initially, the disease was attributed to
55 sporodesmin produces by *Phitomyces chartarum* spores in the pastures (Nobre
56 and Andrade, 1976; Fioravanti, 1999), however histologic alterations of
57 cholangiohepatopathy associated to crystals similar to those found in intoxications
58 by *Panicum* spp (Bridges et al., 1987), *Nartheicum ossifragum* (Ceh and Hauge,
59 1981), *Agave lecheguilla* (Camp et al., 1988) and *Tribulus terrestris* (Glastonbury
60 et al., 1984) suggested that *Brachiaria* spp intoxication was due lithogenic
61 saponins contained in the plant (Lemos et al., 1996a; Lemos et al., 1997; Lemos
62 et al., 1998). The yamosgenin and diosgenin, steroidal sapogenins, were identified
63 as the toxic principles of *B. decumbens* (Smith and Miles, 1993; Cruz et al., 2000),
64 and the disease was reproduced in sheep through administration of fractionated
65 extracts of *B. decumbens* (Cruz et al., 2001).

66 The aims of this work were to describe an outbreak of hepatogenous
67 photosensitization in sheep grazing *B. decumbens* and to establish whether, in this
68 case, the photosensitization was caused by higher levels of protodioscin, a
69 steroidal saponin isolated in *B. decumbens* (Haraguchi et al., 2003), or by spores
70 of *P. chartarum* present in the grass.

71

72 **2. Material and methods**

73 An outbreak of hepatogenous photosensitization occurred at the end of
74 November 2003 in a lot of 28 sheep (15 ewes 9 lambs and 4 sheep of unknown
75 age) of Santa Inês breed in a farm located in the municipality of Campo Grande,
76 Mato Grosso do Sul State, Brazil (20° 22' S latitude and 54° 45' W longitude). The
77 flock coming from Northeastern Brazil had been introduced in the farm 50 days
78 before the occurrence of the outbreak. The epidemiologic data and clinical sign of
79 the affected sheep were observed in a visit to the farm, 22 days after the
80 observation of the first case.

81 Blood samples for biochemical analysis were taken from 5 sheep of the flock.
82 Three samples were from young animals, 2 affected lambs (n° 1, 2) and 1
83 apparently healthy lamb (n° 3), and the two other samples were from apparently
84 healthy adult ewes (n° 4 and 5). Serum samples were assayed for gamma
85 glutamyltransferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), conjugated (CB),
86 unconjugated (UCB) and total (TB) bilirubin, cholesterol (Chol), total proteins (TP)
87 and albumin (Alb). Enzymatic activities were determined or had their values
88 corrected at 37° C, and standardized commercial reagents were used (Labtest
89 Diagnóstica S.A., Lagoa Santa Minas Gerais State, Brazil).

90 One adult sheep was necropsied. For histological examination, selected
91 tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed routinely for
92 inclusion in paraffin, cut at 5 µm and stained with haematoxylin and eosin (H & E)
93 to be examined using light microscopy.

94 At the time of the visit to the farm, a sample of leaves of the pasture (*B.*
95 *decumbens*) grazing by the sheep and from a neighboring similar pasture (*B.*
96 *decumbens*) grazing by cattle without clinical signs of photosensitization were cut
97 close to the soil in 20 sites of the paddock to determine the protodioscin levels, a
98 saponin of *B. decumbens*. The samples were dried, ground and extracted in 96%

99 ethanol. The concentrated ethanolic extract was dissolved in water and partitioned
100 with butanol saturated with water. The butanol-soluble residue containing saponin,
101 in according to Haraguchi et al. (2003), was submitted to semiquantitative analyze
102 by spectrophotometer method using Ehrlich reagent (Gjulemetowa et al., 1982) and
103 compared with protodioscin standard, previously isolated from *B. decumbens*
104 (Haraguchi et al., 2003).

105 The number of *Phithomyces chartarum* spores in the pastures were
106 determined by the method described by di Menna and Bailey (1973).

107

108 **3. Results**

109 All sheep were in a pasture of *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk of about 1
110 hectare. The pasture was green and at the bloom phase. The flock was
111 supplemented with a protein-energy-mineral mixture. In a neighboring pasture of
112 1.5 hectares grazing by 124 adult cattle without photosensitization *B. decumbens*
113 had more amounts of dry leaves. It was part of a pasture rotation system in which
114 the animals stayed for 8 days.

115 Six lambs and an adult sheep had clinical signs characterized by anorexia,
116 depression, dry muzzle, dermatitis of the ears and face, and ocular and nasal
117 yellowish secretion. Five lambs and an adult sheep died after a clinical
118 manifestation period of up to five days. The three lambs examined (n^o 1, 2 and 3)
119 had increased values of GGT, CB, UCB, TB and cholesterol, but in the two adult
120 healthy sheep these parameters were within normal concentrations (Table 1).

121 At necropsy, an adult sheep presented moderate body condition, unilateral
122 corneal opacity, dry muzzle, moderate jaundice, increased lobular pattern of the
123 liver and distended gallbladder.

124 Histologically, the main alteration observed in the liver was the presence of
125 cholesterol-like, needle-shaped, crystals negative images in the lumen of some
126 bile ducts, associated with a periductular moderate infiltration of mononuclear
127 inflammatory cells (Figure 1). In the small bile ducts the epithelial cells were
128 degenerated or necrotic. Proliferation of bile duct cells was also observed. There
129 was a diffuse severe swelling and vacuolation of hepatocytes. A mild amount of
130 foamy cells was observed, mainly in the centroacinar zone, some of them also
131 containing crystals negative images. The heart presented multifocal areas of

132 degeneration and necrosis of muscular fibers associated with connective tissue
133 proliferation and mild infiltration of mononuclear cells. In the kidneys, cholesterol-
134 like, needle-shaped, crystals negative images were observed in the lumen of some
135 tubules, occasionally with presence of giant multinucleate cells.

136 No *Pithomyces chartarum* spores were found in the sample of pasture from the
137 sheep paddock, and only 5,000 spores per g of pasture, were found in the
138 paddock grazed by cattle. The levels of protodioscin of *B. decumbens* were 2.36%
139 and 1.63% for the sheep and cattle paddocks, respectively.

140

141 **4. Discussion**

142 The observation of a crystal associated cholangiopathy in sheep grazing
143 *Brachiaria decumbens*, and the absence of *Pithomyces chartarum* spores in the
144 pasture demonstrated that the disease was caused by the ingestion steroidal
145 lithogenic saponins. The identification of high amounts of protodioscin, a furostanol
146 steroid saponin, for the first time in *B. decumbens* causing photosensitization,
147 suggests that this substance is the main cause of the disease. In previous papers
148 the substances identified in the pastures or in the rumen content of affected
149 animals were diosgenin and yamogenin sapogenins and their metabolites
150 smilagenin, sarsasapogenin epislaminogenin, and episarsapogenin (Cruz et al.,
151 2000; Meagher et al., 1996). In the rumen the sapogenins, diosgenin and
152 yamogenin, are metabolized to epismilagenin and episarsasapogenin, which are
153 conjugated with glucuronic acid and then combine with salts of Ca^{2+} to form
154 crystals in biliary ducts. Crystal formation probably involves the hydrolysis of the
155 sugars from the saponin followed by reduction of the 5-6 double bond,
156 epimerization of the 3- β -OH to 3- α -OH and finally conjugation with the glucuronic
157 acid. (Miles et al., 1991).

158 On the serum biochemistry, the rise on GGT, CB, UCB, and cholesterol in the
159 affected and unaffected lambs indicate liver damage due to cholestasis. By the
160 contrary in the adult two adult animals GGT, CB, UCB, and cholesterol were within
161 normal values. These results and the fact that only one adult sheep was affected
162 confirm previous reports that young sheep are more susceptible to the intoxication
163 than adult sheep (Button et al., 1987).

164 The gross and histologic lesions observed were similar to those reported
165 previously in animals grazing *Brachiaria* species (Graydon et al., 1991; Lemos et
166 al., 1996a; Lemos et al., 1996b; Cruz et al., 2000; Driemeier et al., 2002). Foamy
167 macrophages, mainly in the liver, but also in hepatic and mesenteric lymph nodes
168 and gut are observed in affected and healthy animals grazing *Brachiaria* spp
169 (Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999; Fioravanti 1999; Riet-Correa et al.,
170 2002). Histologically and ultrastructurally these cells present negative crystals
171 images (Driemeier et al., 1998) suggesting that they are formed in consequence of
172 the crystal phagocytosis. These foamy macrophages have not been reported in
173 the intoxication by other plants containing lithogenic saponins, except for the
174 report of hypertrophic Kupffer's cells containing crystals observed in the
175 intoxication by *Panicum coloratum* (Bridges et al., 1987).

176 Outbreaks of photosensitization caused by *Brachiaria* spp are common in cattle
177 in the Brazilian cerrado (savanna) where there are approximately 51 million
178 hectares of *Brachiaria* spp. pastures. Sheep farming has been recently developed
179 in this region, and the number of sheep is increasing significantly. Because sheep
180 are more susceptible than cattle to lithogenic saponins, intoxication by *Brachiaria*
181 should be an important limiting factor for sheep industry.

182

183 **5. Conclusion**

184 The high levels of protodioscin saponin in *B. decumbens* grazed by sheep with
185 crystal associated cholangiopathy demonstrate that this furostanol steroid saponin
186 is the main responsible for photosensitization caused by this grass species.

187

188 **Acknowledgements.** To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
189 Superior (CAPES) by financial support and to veterinary Luciano G. de Oliveira by
190 contribution for the accomplishment of this work. This work was financially
191 supported by the Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Grant
192 N° 7697102600.

193

194 **References**

195 Bridges, C.H., Camp, B.J., Livingston, C.W., Bailey, E.M., 1987. Kleigrass
196 (*Panicum coloratum* L.) poisoning in sheep. Vet. Pathol. 24, 525-531.

- 197 Button, C., Paynter, D.I., Shiel, M.J., Corlson, A.R., Paterson, P.J., Lyford, R.L.,
198 1987. Crystal-associated cholangiohepatopathy and photosensitization in lambs.
199 Austr. Vet. J. 64 (6), 176-180.
- 200 Camp, B.J., Bridges, C.H., Hill, D.W., Patamalai, B., Wilson, S., 1988. Isolation of
201 steroidal sapogenin from the bile of a sheep fed *Agave lecheguilla*. Vet. Hum.
202 Toxicol. 30, 533-535.
- 203 Ceh, L., Hauge, J.G., 1981. Alvelid – producing saponins. I. Chemical studies. Acta
204 Vet. Scand. 22, 391-402.
- 205 Cruz, C., Driemeier, D., Pires, V.S., Colodel, E.M., Taketa, A.T.C., Schenkel, E.P.
206 2000. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced
207 cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. Vet. Hum.
208 Toxicol. 42, 142-145.
- 209 Cruz, C., Driemeier, D., Pires, V.S., Schenkel, E.P., 2001. Experimentally induced
210 cholangiopathy by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria*
211 *decumbens*. Vet. Diag. Invest. 13, 170-172.
- 212 di Menna, M.E., Bailey, J.R., 1973. *Pithomyces chartarum* spore counts in pasture.
213 N. Z. J. Agric.Res. 16, 343-351.
- 214 Driemeier, D., Barros, S.S., Peixoto, P.V., Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., Brito,
215 M.F., 1998. Estudo histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e
216 linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”).
217 Pesq. Vet. Bras. 18, 29-34.
- 218 Driemeier, D., Döbereiner, J., Peixoto, P.V., Brito, M.F., 1999. Relação entre
219 macrófagos espumosos (“foam cells”) no fígado de bovinos e ingestão de
220 *Brachiaria* spp no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 19, 79-83.
- 221 Driemeier, D., Colodel, E.M., Seitz, A.L., Barros, S.S., Cruz, C.E.F., 2002. Study of
222 experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*.
223 Toxicon. 40, 1027-1031.
- 224 Fioravanti, M.C.S., 1999. Incidência, avaliações clínica, laboratorial e
225 anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos. Tese
226 (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e
227 Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

- 228 Gjulemetowa, R., Tomowa, M., Simowa, M., Pangarowa, T., Peewa, S., 1982.
229 Über die bestimmung von furostanolsaponinen im Präparat Tribestan. Pharmazie.
230 37, 296.
- 231 Glastonbury, J.R.W., Doughty, F.R., Whitaker, S.J., Sergeant, E., 1984. A
232 syndrome of hepatogenous photosensitization, resembling geldikkop, in sheep
233 grazing *Tribulus terrestris*. Austr. Vet. J. 61, 314-316.
- 234 Graydon, R.J., Hamid, H., Zaha, R.I.P., Gardiner, C., 1991. Photosensitization and
235 crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*.
236 Austr. Vet. J. 68, 234-236.
- 237 Haraguchi, M., Cunha, H.A., Mimaki, Y., Brum, K.B., Lemos, R.A.A., Yokosuka, A.,
238 Sashida, Y., 2003. Furostanol glicosídicos nas folhas de *Brachiaria decumbens*.
239 Proceedings of the 26th Annual meeting of the Chemical Brazilian Society PN-066.
- 240 Lemos, R.A.A., Ferreira, L.C.L., Silva, S.M., Nakazato, L., Salvador, S.C., 1996a.
241 Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem
242 com *Brachiaria decumbens*. Ciência Rural. 26, 109-113.
- 243 Lemos, R.A.A., Osório, A.L.A.R., Rangel, J.M.R., Herrero Jr, G.O., 1996b.
244 Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bezerros ingerindo
245 *Brachiaria brizantha*. Arq. Inst. Biol. 63 (supl), 22.
- 246 Lemos, R.A.A., Salvador, S.C., Nakazato, L., 1997. Photosensitization and crystal
247 associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil.
248 Vet. Hum. Toxicol. 39, 376-377.
- 249 Lemos, R.A.A., Nakazato, L., Herrero Jr, G.O., Silveira, A.C., Porfírio, L.C., 1998.
250 Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos
251 sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. Ciência Rural.
252 28, 507-510.
- 253 Macedo, M.C.M., 2005. Pastagens no Ecosystema Cerrados: Evolução das
254 pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: 42^a Reunião Anual da
255 Sociedade Brasileira de Zootecnia – A produção animal e o foco no agronegócio,
256 Goiânia. Goiás: Universidade Federal de Goiás, 56-84.
- 257 Meagher, L.P., Miles, C.O., Fagliari, J.J., 1996. Hepatogenous photosensitization
258 of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the
259 absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. Vet. Hum.
260 Toxicol. 38, 271-274.

- 261 Nobre, D., Andrade, S.O., 1976. Relação entre fotossensibilização em bovinos
262 jovens e a gramínea *Brachiaria decumbens* Stapf. *Biológico*. 42, 249-258.
- 263 Riet-Correa, G., Riet-Correa, F., Schild, A.L., Driemeier, D., 2002. Wasting and
264 death in cattle associated with chronic grazing of *Brachiaria decumbens*. *Vet.*
265 *Hum. Toxicol.* 44 (3), 179-180.
- 266 Smith, B.L., Miles, C.O., 1993. A role for *Brachiaria decumbens* in hepatogenous
267 photosensitization of ruminants. *Vet. Hum. Toxicol.* 35, 256-257.
- 268

269 Table 1. Gamma glutamyltransferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST),
 270 bilirubin (conjugated (CB), unconjugated (UCB) and total (TB) bilirrubin,
 271 cholesterol (Chol), total proteins (TP) and albumin (Alb) serum content in sheep
 272 naturally poisoned with *B. decumbens*

Test	Sheep*					Reference values**
	1	2	3	4	5	
GGT (U/l)	271	224	218	48	58	20 – 52
AST (U/l)	148	300	240	42	50	60 – 280
CB (mg/dl)	2.26	1.75	1.0	0.15	0.1	0 – 0.27
UCB (mg/dl)	4.07	1.44	2.18	0.365	0.37	0 – 0.12
TB (mg/dl)	6.33	3.19	2.2	0.515	0.4	0.1 – 0.5
TP (g/dl)	7.1	6.8	7.5	7.2	7.5	6 – 7.9
Alb (g/dl)	2.5	2.7	2.4	2.8	2.7	2.4 – 3.0
Chol (mg/dl)	100	134	103	49	53	52 – 76

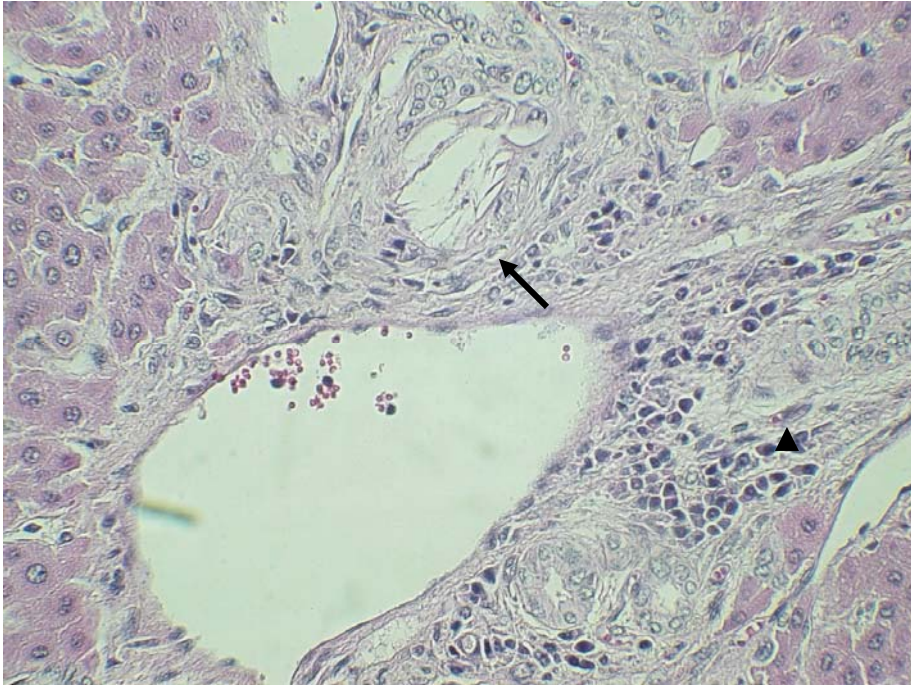
273 * Sheep n° 1 and 2 were affected lambs, n° 3 was an apparently unaffected lamb, and n° 3 and 4
 274 were apparently healthy ewes

275 **Kaneko et al 1997

276

277

278



279

280

281

282

283

Figure 1. Liver. Adult sheep. Crystal negative images in bile ducts (arrow), and peri-ductal infiltrated inflammatory constituted by mononuclear cells (arrowhead) are observed. H&E 400x.

284

285

286

287

CAPÍTULO 4

Saponinas e *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos de bovinos criados extensivamente, na região sudoeste do Estado de Goiás

BRUM, Karine Bonucielli; HARAGUCHI, Mitsue; SOUZA, Juscelino Neres; CAMPOS, Ester; PIRES, Murillo Assis; PINTO, Antônio Silva; SILVA, Luiz Antônio Franco; FIORAVANTI, Maria Clorinda Soares

RESUMO

As espécies de *Brachiaria* sp são importantes forrageiras de regiões tropicais. No Brasil, há aproximadamente 51 milhões de hectares que são fontes de alimentação para os animais de produção. As espécies *B. decumbens* e *B. brizantha* têm sido descritas como causadoras de fotossensibilização hepatógena em ruminantes. Inicialmente a enfermidade foi atribuída ao fungo *P. chartarum*, mas estudos recentes sugerem ser as saponinas esteroidais contidas nas forrageiras os princípios tóxicos responsáveis pela fotossensibilização. Os objetivos gerais desse trabalho foram: verificar se a quantidade da saponina protodioscina e a quantidade de esporos variaram com a época do ano (seca e chuva); determinar a presença de alterações hepáticas, por meio da dosagem sérica de gama glutamiltransferase e aspartato aminotransferase; verificar se houve relação entre a quantidade da saponina e o número de esporos do fungo *P. chartarum* como indicativo da presença de lesões hepáticas; e averiguar se a saponina estava presente em outras plantas forrageiras que os bovinos ingeriram. Foram feitas seis visitas (colheitas) a cada dois meses, em dez fazendas localizadas nos municípios de Jataí, Mineiros e Perolândia, na região oeste do Estado de Goiás, e foi realizada a pesagem dos animais e colheita de sangue (para a determinação sérica da atividade de gama glutamiltransferase, aspartato aminotransferase e dos valores de bilirrubina) nessa ocasião. Em cada fazenda foram acompanhados 20 bovinos. Para a realização das dosagens séricas foram utilizados kits comerciais padronizados. A contagem dos esporos do fungo foi feita segundo técnica padrão. A fração butanólica do extrato etanólico de cada amostra de capim foi submetida à cromatografia de camada delgada (CCD) e análise espectrofotométrica através do reagente de Ehrlich em 515 nm. A média de todos os valores bioquímicos avaliados permaneceram dentro do intervalo de confiança dos valores utilizados como padrão de normalidade. Em relação às provas de função hepática somente a AST apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na colheita 3, no início da estação das chuvas, período em que maior número de animais apresentou elevação na atividade sérica da enzima. O número de esporos de *P. chartarum* encontrados nas pastagens variou de zero a 40.000 esporos por grama de forrageira e a maior quantidade foi observada no mês de julho, no meio da estação seca. Foi isolada saponina esteroideal protodioscina somente das folhas de *B. decumbens* e *B. brizantha*, sendo que a maior quantidade de saponinas foi observada em março, final da estação das chuvas, e a menor quantidade ocorreu em julho, no meio da estação seca, demonstrando grande variação nos teores de saponinas durante o período experimental,

sugerindo uma relação com a precipitação pluviométrica e/ou ciclo de vida das espécies de *Brachiaria* avaliadas.

Palavras-chave: Bioquímica sanguínea, *Brachiaria* sp, espectrofotometria, esporidesmina, fotossensibilização, protodioscina

ABSTRACT

Brachiaria species are important forages to tropical areas. In Brazil, there are around 51 millions of hectare that are feeding sources to livestock. Outbreaks of hepatogenous photosensitization have been reported in ruminants grazing *B. decumbens* and *B. brizantha*. Initially, the disease was attributed to the presence of *Pithomyces chartarum* spores, but recent studies suggest that the steroidal saponins contained in the forage are responsible to photosensitization outbreaks. General objectives were: to verify if the quantity of protodioscin, a steroidal saponin, and the spores quantity had varied during the year; to determine the presence of hepatic alterations, by seric dosage of gamma glutamyltransferase and aspartate aminotransferase activities and bilirubin values; to verify if there was a relation between the quantity of saponina and number of *P. chartarum* spores, like an indicative of hepatic alterations; and to inquire if the saponina was present in other forages that was grazing by the animals. Six harvests was realized each two month, in ten farms located in Jataí, Mineiros and Perolândia cities, southwestern region of Goiás State and it was carried through the weigh of the animals and harvest of blood in this occasion. In each farm twenty bovines had been sampled. For the accomplishment of seric dosages standardized commercial reagents were used. The spore count was made second a standard technique. The butanol-soluble residue containing saponina was submitted to thin layer chromatography and spectrophotometric analysis using Ehrlich reagent in 515 nm. The average of all biochemistry values had remained inside of the normality parameter. About hepatic alterations tests, only aspartate aminotransferase show statistical difference ($p < 0,05$) on third harvest, in first month of rain period, when the greatest number of animals had increased this enzyme activity. The number of *P. chartarum* spores found in the pastures varied of 0 to 40.000 spores/g of grass and the biggest amount was observed in the July month (dry season). Protodioscin was isolated only in *B. decumbens* and *B. brizantha* leaves; the biggest amount of saponins was observed in March, in the rain season, and the lowest amount in July, demonstrating great variation in levels of saponins during the experiment, suggesting a relation between the pluviometric precipitation and/or cycle of life in these species of *Brachiaria* evaluated.

Key-words: serum sanguineous biochemistry, *Brachiaria* sp, spectrophotometry, sporidesmin, photosensitization, protodioscin

4.1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Brachiaria* sp são importantes forrageiras de regiões tropicais como a África, Ásia, Austrália e América do Sul. Segundo FERRAZ (2003), no Brasil há aproximadamente 95 milhões de hectares (ha) cultivados com espécies de *Brachiaria*, sendo constituídos, principalmente de *Brachiaria brizantha* (60 milhões ha), *Brachiaria decumbens* (25 milhões ha), *Brachiaria humidicola* e outras (10 milhões de ha). No entanto, MACEDO (2005) relata que a estimativa é de que existam, aproximadamente, 60 milhões de ha de pastagens cultivadas na região do Cerrado brasileiro e em torno de 51 milhões de ha são ocupados por capins desse gênero, sendo 30 milhões de ha com *B. brizantha*, 15 milhões de ha com *B. decumbens* e seis milhões de ha com *B. humidicola* e outras.

Casos de fotossensibilização hepatógena no Brasil foram observados em bovinos mantidos em pastagens formadas com *B. decumbens* cv Basilisk, ou braquiária australiana, sendo descritos pela primeira vez em 1975 (CAMARGO et al., 1976; NOBRE & ANDRADE, 1976).

Inicialmente, a doença foi atribuída à presença do fungo *Pithomyces chartarum*, produtor da toxina esporidesmina (NOBRE & ANDRADE, 1976; TOKARNIA et al., 1979; FAGLIARI et al., 1990; FIORAVANTI, 1999). Alterações histológicas de colangiohepatopatia associada a cristais semelhantes às encontradas nas intoxicações por *Panicum* sp (BRIDGES et al., 1987; HOLLAND et al., 1991; MILES et al., 1991), *Nartheicum ossifragum* (CEH & HAUGE, 1981), *Agave lecheguilla* (CAMP et al., 1988) e *Tribulus terrestris* (GLASTONBURY et al., 1984; JACOB & PEET, 1987) têm sido observadas em animais que desenvolvem fotossensibilização em pastagens de *Brachiaria* (LEMOS et al., 1996a, LEMOS et al., 1997; LEMOS et al., 1998). Essas plantas contêm saponinas esteroidais litogênicas (CRUZ et al., 2000; CRUZ et al., 2001), o que leva alguns pesquisadores a acreditarem que as saponinas presentes nas plantas do gênero *Brachiaria*, também, sejam as responsáveis pela enfermidade (SMITH & MILES, 1993; LEMOS et al., 1996a; LEMOS et al., 1997; LEMOS et al., 1998).

As saponinas de *Brachiaria decumbens* são derivadas das saponinas diosgenina (25R) e yamogenina (25S) (MEAGHER et al., 1996;

CRUZ et al., 2000) que após passarem pelo metabolismo no trato gastro-intestinal dos animais vão resultar em epismilagenina e episarsasapogenina, respectivamente, sapogeninas responsáveis pela formação dos cristais biliares (MILES et al., 1991).

A protodioscina, uma saponina esteroidal, foi isolada pela primeira vez por HARAGUCHI et al. (2003) das folhas de *B. decumbens* (Figura 1). Ela difere da dicotomina, saponina esteroidal isolada anteriormente de *Panicum dichotomiflorum*, pela ausência de uma molécula de ramnose. A dicotomina é descrita como responsável por surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos na Nova Zelândia (MUNDAY et al., 1993). MEAGHER et al. (1996) mostraram por ESI-MS (do inglês “electrospray ionization mass spectra”) no extrato etanólico de *P. dichotomiflorum* um íon pseudo-molecular m/z 1193, que corresponde a (M-H)⁻ (perda de H⁺ de um composto de peso molecular 1194). O extrato de *B. decumbens* mostrou um íon pseudo-molecular m/z 1047 compatível com estrutura semelhante a da dicotomina sem a presença de uma molécula de ramnose.

P. chartarum (Berk. & Curt.) M. B. Ellis (Dematiaceae) é um fungo saprófita, cosmopolita, observado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. É encontrado preferencialmente em matéria vegetal morta de pastagens nativas e, principalmente, nas cultivadas. Sob condições ambientais favoráveis são produzidos muitos esporos que contém esporidesmina, uma toxina hepatotóxica (KELLERMAN et al., 1990; ALVARIZA, 1993; KELLY, 1993).

Como a produção de esporidesmina está relacionada com a esporulação do fungo, a contagem dos esporos nas pastagens é um bom indicador da toxidez das mesmas. No entanto, é necessário que se determine a capacidade da cepa em produzir a esporidesmina (CRUZ, 1986). Em média um grama de esporos contém 0,8 mg de esporidesmina. Doses de 0,8 mg/kg de toxina são suficientes para que os animais desenvolvam sinais clínicos e doses de 1 mg/kg são capazes de causar a morte de animais (ALVARIZA, 1993).

São afetados, principalmente, bovinos com menos de 24 meses em especial bezerros recém desmamados, ou próximos ao desmame, mas bovinos adultos também podem adoecer (NOBRE, ANDRADE, 1976; TOKARNIA et al., 1979; FAGLIARI, 1990; LEMOS et al., 2002). São descritos casos em bezerros

lactentes, embora não seja a ocorrência mais comum (FAGLIARI, 1990; LEMOS et al., 1996b; LEMOS et al., 1996c).

A morbidade é bastante variável e a mortalidade, normalmente, é baixa, mas podem ocorrer perdas expressivas. A enfermidade pode ocorrer em qualquer época do ano, mas em algumas situações como primeiro contato com a planta, ocorrência prévia de queimadas, pastos diferidos (reserva de alimento para o período de escassez de forragem), secas prolongadas e ocorrência de precipitações pluviométricas associadas a acúmulo de matéria vegetal morta no solo parecem predispor a ocorrência da enfermidade (FAGLIARI, 1990; ALVARIZA, 1993; LEMOS et al., 2002).

Após um período de exposição ao sol, os animais apresentam inquietação, balançam a cabeça e as orelhas, esfregam ou coçam as áreas afetadas em objetos e procuram a sombra. As lesões de pele iniciam com eritema, seguido de edema, fotofobia e dor. Ocorre espessamento das partes afetadas da pele, com presença de exsudato e formação de crostas. O resultado é necrose e gangrena seca deixando a pele lesada com aspecto de casca de árvore que, finalmente, se desprende. São observados diferentes graus de icterícia, bilirrubinemia e bilirrubinúria (SMITH & O'HARA, 1978; GRAYDON et al., 1991; TOKARNIA et al., 2000; LEMOS et al., 2002).

Tanto na intoxicação pela gramínea quanto pela esporidesmina, os animais afetados apresentam perda de peso podendo ser observados níveis elevados de gama glutamiltransferase, aspartato aminotransferase e/ou bilirrubina (LEMOS et al., 1996a, FAGLIARI et al., 1993a; FAGLIARI et al., 1993b; HANSEN et al., 1994; FIORAVANTI, 1999). Segundo RADOSTITS et al. (2000) a determinação dos níveis séricos das enzimas hepáticas é um bom indicador de lesão nos hepatócitos. Muitas vezes os animais não apresentam sinais clínicos aparentes, mas a ingestão de doses menores, da esporidesmina e/ou saponina, por tempo prolongado causam enfermidade subclínica que provocam perdas econômicas consideráveis. Em um estudo feito por FIORAVANTI (1999) foi observada uma prevalência de 64% de incidência subclínica da intoxicação pela esporidesmina e correlação negativa entre o ganho de peso e a presença de lesões hepáticas em animais sem sinais clínicos.

Os objetivos deste trabalho foram verificar se a quantidade da saponina protodioscina e a quantidade de esporos variaram com a época do ano (seca e chuva); determinar a presença de alterações hepáticas, por meio da determinação da atividade sérica de gama glutamiltransferase e aspartato aminotransferase e dosagem de bilirrubina; verificar se houve relação entre a quantidade da saponina e o número de esporos do fungo *P. chartarum* como indicativo da presença de lesões hepáticas; e averiguar se a saponina estava presente em outras plantas forrageiras que os bovinos ingeriram.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Caracterização das propriedades

Nos anos de 2001 e 2002 foram distribuídos questionários para 60 produtores rurais, a fim de realizar a caracterização epidemiológica da fotossensibilização hepatógena em rebanhos bovinos no Estado de Goiás. A partir disso, verificou-se que a enfermidade ocorria em todas as regiões do Estado. Essa informação permitiu a escolha de 10 fazendas localizadas na região sudoeste do Estado de Goiás, nos municípios de Jataí, Mineiros e Perolândia, para a realização do experimento. Essas fazendas tinham histórico de ocorrência de fotossensibilização e eram formadas, predominantemente, com gramíneas do gênero *Brachiaria*. Em sete, das 10 fazendas, foi relatado que o período que normalmente acontecem os casos clínicos de fotossensibilização é o período das chuvas.

O Quadro 1 mostra a lista das fazendas com os tipos de pastagens que os bovinos ingeriram durante o período experimental. Em cada fazenda, foi acompanhado um grupo de 20 bovinos, sendo que seis grupos eram compostos por animais de corte (Nelore, anelrados ou mestiços) e quatro grupos de animais leiteiros (na maior parte da raça Holandesa), identificados com brincos numerados, com idades variando entre sete e 40 meses.

QUADRO 1 – Tipos de pastagens ingeridas pelos bovinos durante o período experimental separadas por fazenda

Fazenda	Pastagem
1	<i>B. decumbens</i> e <i>B. humidicola</i>
2	<i>B. decumbens</i> , <i>B. brizantha</i> e capim nativo (“capim do brejo”)
3	<i>B. decumbens</i> , <i>B. brizantha</i> , <i>B. humidicola</i> , <i>Panicum maximum</i> cv Tanzânia e <i>Hyparrhenia</i> sp
4	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>
5	<i>Andropogon</i> sp e <i>B. humidicola</i>
6	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>
7	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>
8	<i>Andropogon</i> sp, <i>B. humidicola</i> e <i>B. decumbens</i>
9	<i>Andropogon</i> sp, <i>B. brizantha</i> , <i>B. humidicola</i> e <i>B. decumbens</i>
10	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>

O período experimental iniciou em julho de 2003 e terminou em maio de 2004, totalizando seis visitas (numeradas de 1 a 6) em cada fazenda, sendo que em cada visita procedeu-se uma colheita. As colheitas foram realizadas nos meses de julho, setembro e novembro de 2003 e janeiro, março e maio de 2004, sempre na primeira quinzena do mês. As colheitas de número 1, 2 e 6 compreenderam o período seco e as de número 3, 4 e 5 o período chuvoso. As colheitas de amostras de pastagem e sangue, bem como as pesagens dos bovinos foram executadas no mesmo dia. As pesagens foram realizadas somente nas fazendas de gado de corte, por meio de balança eletrônica ou de balança mecânica. Nas fazendas de gado leiteiro as pesagens não foram realizadas porque não havia balança. Para a avaliação estatística do peso, foram considerados somente os animais de corte que estiveram presentes em todas as colheitas (n = 74 observações) e as fazendas em que foi possível a realização da pesagem dos animais em todas as colheitas (Fazendas 1, 2, 7 e 8).

4.2.2 Determinação do índice pluviométrico

Os dados referentes às precipitações pluviométricas mensais (mm) do município de Jataí, do período de junho de 2003 a maio de 2004 foram fornecidos pelo MAPA – Instituto Nacional de Meteorologia, 10º Distrito de Meteorologia de Goiânia – GO/TO, Estação meteorológica 83464, Jataí - GO.

As fazendas localizadas nos municípios de Mineiros e Perolândia ficavam numa distância máxima de 80 km do município de Jataí, o que possibilitou a utilização do índice pluviométrico da Estação meteorológica de Jataí.

4.2.3 Colheita e avaliação do soro

Para diagnosticar as alterações da função hepática foram utilizadas provas determinantes da excreção (bilirrubinas) do órgão e da integridade celular (enzimas GGT e AST).

O sangue dos animais foi colhido em tubos de vacutainer[®], descartáveis, de vidro siliconizado, com tampa e sem anticoagulante, para a determinação das atividades séricas de gama glutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e dosagem da bilirrubina. O sangue foi centrifugado no local da colheita, para a obtenção do soro. As amostras de soro foram conservadas sob congelamento até a execução dos exames laboratoriais. As determinações de GGT, AST e bilirrubina foram feitas no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFG. A quantificação da atividade enzimática foi determinada ou teve seu valor corrigido para a temperatura de 37°C e utilizaram-se reagentes comerciais padronizados. Para a leitura das reações de GGT e AST foi utilizado um analisador bioquímico automático (espectrofotômetro) marca Bioplus[®], modelo Bio-2000 IL – A. Para a leitura das reações de bilirrubina foi utilizado um espectrofotômetro digital modelo 35D, marca Coleman[®].

4.2.3.1 Gama glutamiltransferase (GGT)

A atividade sérica da GGT foi determinada pelo método cinético utilizando-se como substrato glutamil-p-nitroanilida (Labtest[®]). Fez-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm.

4.2.3.2 Aspartato aminotransferase (AST)

A atividade sérica da AST foi determinada pelo método ultra-violeta (UV) otimizado, sem piridoxal fosfato (Labtest®). Fez-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm.

4.2.3.3 Bilirrubina direta e total

Os teores séricos de bilirrubina direta (BD) e bilirrubina total (BT) foram determinados pelo método colorimétrico direto (Jendrassik-Grof). Fez-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

4.2.4 Colheita e avaliação das pastagens que os bovinos eram mantidos

As amostras das pastagens foram colhidas rente ao solo (a 3 cm do solo) em 20 locais do piquete. Toda a pastagem colhida foi misturada e, em seguida, retirou-se a amostra a ser analisada. A quantidade aproximada de 450 g da pastagem fresca foi encaminhada ao Instituto Biológico localizado na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil, para a identificação e a dosagem semiquantitativa das saponinas.

4.2.4.1 Contagem de esporos

A identificação morfológica dos esporos (Figura 1) do fungo *Pithomyces chartarum* (Berk & Curt) M. B. Ellis, baseou-se na descrição de DINGLEY (1962). Para a contagem de esporos utilizou-se a técnica descrita por DIMENNA & BAILEY (1973). Para tanto, misturou-se uma quantidade de matéria vegetal (60 g) com um volume dez vezes maior de água (600 ml). Agitou-se bem por um minuto e contou-se em câmara de hematimetria (Neubauer). A quantidade de esporos contados em 2 mm³ multiplicado por 5.000 equivale à quantidade de esporos presentes em 1 grama de forrageira.

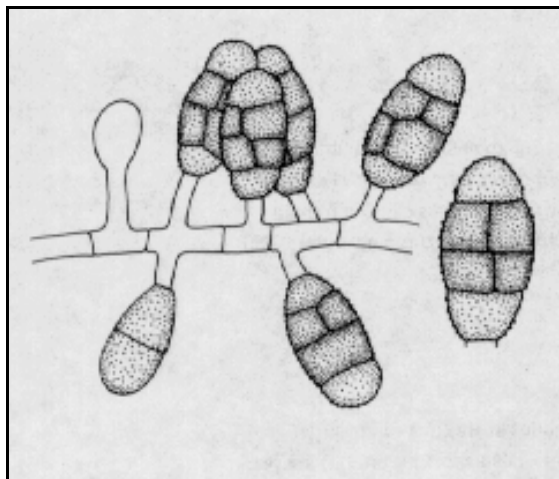


FIGURA 1 – Esporos de *Pithomyces chartarum*
 Fonte: www.botany.utoronto.ca

4.2.4.2 Determinação dos teores da saponina

As plantas colhidas foram secas em estufas à temperatura de 50°C e moídas. Posteriormente, 10g do pó das plantas, foi extraído sob maceração em etanol 96% durante um dia e filtrado. O processo foi repetido por duas vezes. O extrato etanólico reunido foi concentrado em rotaevaporador sob baixa pressão à temperatura de 50°C para a obtenção do resíduo do extrato etanólico. Em seguida, este foi dissolvido em água e filtrado para separação do resíduo insolúvel em água. A solução aquosa filtrada foi fracionada sucessivamente por partição em solventes imiscíveis: água / éter etílico, água / acetato de etila e água/ butanol saturado com água. O extrato etéreo foi descartado. O extrato do acetato de etila e o extrato butanólico foram concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 50°C e secos para obtenção de seus respectivos resíduos.

O resíduo do extrato butanólico, que contém a saponina, foi submetido à cromatografia de camada delgada (CCD) em placas de plástico impregnada com sílica-gel 60 GF254 (Merck®), desenvolvida no sistema de solventes constituídos de clorofórmio: metanol: água (16:9:2). Para tanto, foi utilizada uma amostra pesando 10 mg do resíduo butanólico, previamente dissolvida em 1 ml de etanol sendo, em seguida, aplicada 5 µl dessa solução na placa cromatográfica.

As manchas foram visualizadas através de revelação com solução de ácido sulfúrico 10% e reativo de Ehrlich, ambas sob aquecimento a 110° C por 10

minutos, comparada com o padrão da saponina protodioscina, previamente isolada de *B. decumbens* (HARAGUCHI *et al.*, 2003) e tiveram seus Fatores de retenção (Rf) calculados. O Rf é a distância da origem (local de aplicação da amostra) até o centro da mancha na placa cromatográfica, dividido pela distância total percorrida pela fase móvel (COLLINS *et al.*, 1997).

A curva analítica e os níveis de protodioscina nas folhas de *Brachiaria* sp (Figura 2) foram obtidos por método espectrofotométrico, usando reagente de Ehrlich (Sigma[®]) e a leitura foi realizada em 515 nm (GJULEMETOWA *et al.*, 1982) usando espectrofotômetro U-2001 (Shimadzu Co[®]).

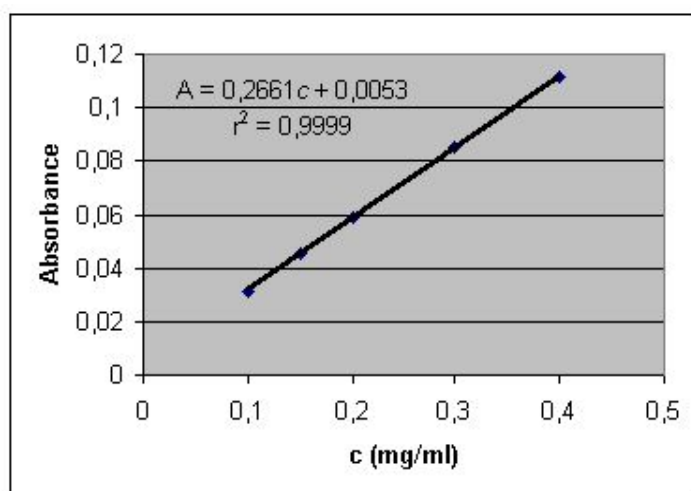


FIGURA 2 – Curva de calibração e nível de protodioscina nas folhas de *Brachiaria decumbens* obtidas por espectrofotometria.

A= absorvância; c= concentração de protodioscina

4.2.5 Análise estatística dos dados

Foi realizada a estatística descritiva dos valores obtidos da atividade sérica das enzimas GGT e AST e da dosagem da bilirrubina. Com relação aos teores de saponinas e quantidade de esporos foram utilizados os valores médios dos resultados encontrados em cada colheita e em todas as propriedades.

Para avaliar estatisticamente as diferenças nas respostas bioquímicas dos animais, em cada uma das colheitas, utilizou-se o teste de Qui-quadrado, considerando o número de animais com elevações nos parâmetros avaliados.

A eventual associação entre as variáveis (teores de saponinas e chuvas; ganho de peso e atividade sérica de GGT e AST) foi verificada pelo coeficiente de Spearman para correlação entre as variáveis (SAMPAIO, 1998).

Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o programa Sistema de Análises Estatística e Genéticas – SAEG (RIBEIRO JÚNIOR, 2001).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nem sempre foi possível colher amostras de todos os animais em todas as colheitas. Houve quatro mortes durante o período experimental (animal 30 da Fazenda 6, 15 da Fazenda 8, 515 e 499 da Fazenda 3), nenhuma delas em decorrência de fotossensibilização hepatógena. O Quadro 2 mostra a quantidade total de amostras de sangue colhidas durante o experimento.

QUADRO 2 – Número total de amostras de sangue dos bovinos acompanhados durante o período experimental, na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

Animais	Colheita 1 Jul/03	Colheita 2 Set/03	Colheita 3 Nov/03	Colheita 4 Jan/04	Colheita 5 Mar/04	Colheita 6 Mai/04	TOTAL
Nº de amostras	200	198	197	196	194	193	1178

A partir dos dados meteorológicos obtidos, referentes às precipitações pluviométricas mensais do município de Jataí, no período de junho de 2003 a maio de 2004, foi possível averiguar que a estação de chuvas iniciou em outubro de 2003, teve seu pico no mês de fevereiro de 2004, começou a diminuir em março e, no mês de maio, o volume de chuvas diminuiu consideravelmente. A partir desses dados, os meses de julho, setembro e maio (colheita 1, 2 e 6) foram considerados respectivamente como o meio, fim e início da estação seca. Os meses de novembro, janeiro e março (colheita 3, 4 e 5) foram considerados

respectivamente como o início, meio e fim da estação chuvosa. Estes dados estão de acordo com o estudo realizado por CASTRO et al. (1994), que afirmam que a região central do Cerrado brasileiro apresenta período seco de maio a setembro, com precipitação pluviométrica de menos de 60 mm por mês.

4.3.1 Ganho de peso

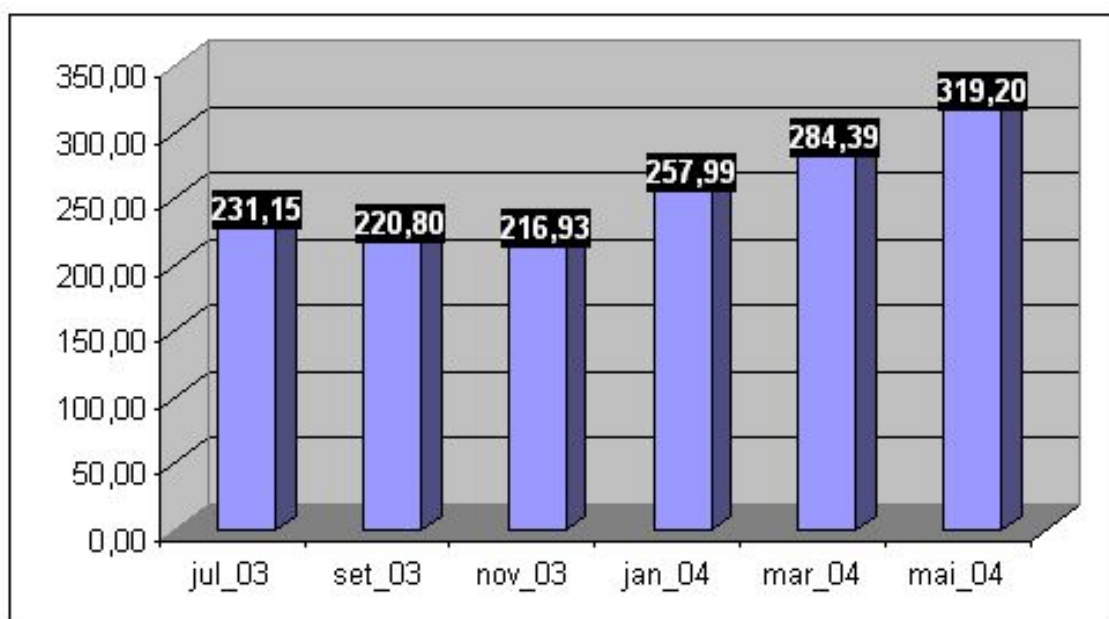


FIGURA 3 – Média de peso (Kg) dos animais de corte, por colheita, na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

Os bovinos de corte perderam peso na época de seca, especialmente no final da seca (Figura 3). O meio da estação chuvosa (colheita 1), foi o período que possibilitou maior ganho de peso aos animais de corte (Figura 4), devido a maior disponibilidade de forragem.

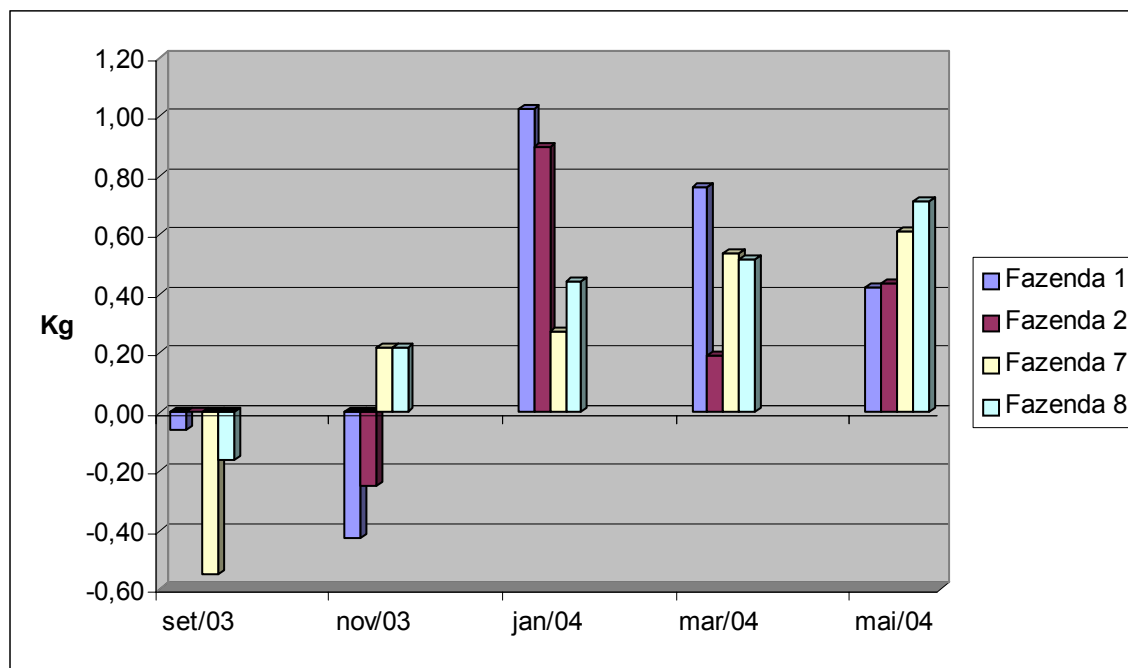


FIGURA 4 – Ganho em peso médio diário (Kg) por colheita, dos animais de corte, na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

Vários fatores afetam a produção de forragens, dentre eles a temperatura, radiação solar, capacidade de retenção de água e a fertilidade do solo, mas o fenômeno climático que mais influencia no desempenho animal é a precipitação pluviométrica devido ao efeito provocado nas pastagens (RODRIGUES, 1997). Assim, os animais ganham peso na época de chuvas e perdem peso na época da seca por causa da escassez de forragens e baixa qualidade nutricional das mesmas (REIS et al., 1999; REIS et al., 2003). Esse fato foi observado nos animais deste experimento, bem como foi possível visualizar no campo, que as pastagens estavam secas e escassas.

Não foi detectada correlação ($p < 0,05$) entre os valores médios séricos da atividade das enzimas GGT e AST e a média do ganho de peso dos animais (Tabelas 1 e 2). Esse resultado já era esperado já que as médias de GGT e AST estiveram dentro da normalidade durante todo o período experimental.

TABELA 1 - Médias de peso, GGT e AST dos bovinos de corte acompanhados em todas as colheitas, na região sudoeste de Goiás, de julho de 2003 a maio de 2004

Parâmetro	Colheita 1 Julho/03	Colheita 2 Setembro/03	Colheita 3 Novembro/03	Colheita 4 Janeiro/04	Colheita 5 Março/04	Colheita 6 Maio/04
Peso	231,15	220,80	216,93	257,99	284,39	319,20
GGT	16,22	16,26	15,99	17,24	15,77	15,48
AST	61,16	56,11	75,31	66,12	67,78	62,17

TABELA 2 - Coeficientes de correlação de Spearman entre os valores séricos médios obtidos de AST e GGT com relação ao ganho de peso dos animais, na região sudoeste de Goiás, de julho de 2003 a maio de 2004

Variáveis	Observações	Correlação	Z	Significância	Conclusão
AST	74	- 0,0809	- 0,6915	0,2446	Não significativo
GGT	74	- 0,0631	- 0,5388	0,2950	Não significativo

4.3.2 Provas de função hepática

Para analisar os resultados obtidos foram utilizados os valores de GGT e AST encontrados por FIORAVANTI (1999) para bovinos saudáveis e mantidos em pastagens de *Brachiaria* sp, no Estado de Goiás. Os valores de normalidade utilizados para avaliação das dosagens séricas de bilirrubina foram os obtidos por BARROS FILHO (1995) em bovinos da raça Nelore criados no Estado de São Paulo (Quadro 3).

QUADRO 3 – Valores utilizados como parâmetro de normalidade para avaliação da atividade sérica de GGT, AST e de bilirrubina dos animais do presente estudo

GGT (U/L) ¹	AST (U/L) ¹	BT (mg/dL) ²	BD (mg/dL) ²	BI (mg/dL) ²
13,36 - 20,34	53,93 - 83,61	0,23 - 0,55	0,02 - 0,2	0,1 - 0,44

¹FIORAVANTI, 1999

²BARROS FILHO, 1995

Foram avaliados 1178 soros de bovinos durante o período experimental (Quadro 2). Desse total, 32 (16%), 29 (14,7%), 22 (11,2%), 33 (16,8%), 19 (9,8%) e 16 (8,3%) animais apresentaram GGT elevada na 1ª, 2ª, 3ª,

4^a, 5^a e 6^a colheita, respectivamente. Os valores séricos médios de bovinos sadios encontrados em cada colheita para a enzima GGT, com seus respectivos desvios padrões e coeficientes de variação estão sumarizados na Tabela 3. Nota-se que a menor e maior média, respectivamente, foram observadas na sexta colheita e quarta colheita, ou seja, no início do período da seca e no meio da estação chuvosa (Figura 5).

TABELA 3 - Valor médio da atividade sérica da enzima GGT (U/l), AST (U/l), BD (mg/dl) e BT (mg/dl), respectivos desvios padrões DP e coeficientes de variação (CV%) em bovinos aparentemente sadios, na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

Variável	Análise estatística	Seca			Chuva		
		Julho 03	Setembro 03	Mai 04	Novembro 03	Janeiro 04	Março 04
GGT	Média	16,11	16,24	14,85	16,01	17,21	15,74
	DP	5,61	3,85	3,38	3,63	3,70	3,50
	CV	34,85	23,74	22,73	22,66	21,49	22,23
AST	Média	61,73	56,12	62,32	75,48	66,18	67,98
	DP	18,36	14,98	13,09	18,81	14,18	13,91
	CV	29,74	26,69	21,00	24,92	21,43	20,47
BD	Média	0,13	0,12	0,12	0,14	0,14	0,13
	DP	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
	CV	45,02	39,88	33,95	30,85	31,88	30,40
BT	Média	0,35	0,33	0,32	0,34	0,29	0,31
	DP	0,14	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10
	CV	40,32	26,79	29,30	25,70	31,17	33,61

A GGT é detectada principalmente nas células dos ductos biliares, por isso, lesões no epitélio biliar e desordens colestásicas resultam marcadamente no aumento da sua atividade no soro sangüíneo em todas as espécies estudadas (BRAUN et al., 1987; PEARSON, 1993). É especialmente importante para bovinos e eqüinos, já que a dosagem da fosfatase alcalina é pouco específica nesses animais (BIRGEL et al., 1982). A GGT apresenta especificidade e sensibilidade e quase que invariavelmente encontra-se elevada nos casos de moléstia hepática crônica (BLACKSHAW, 1978; PEARSON, 1993). Apesar de ser encontrada em outros tecidos corporais (intestino, pâncreas, rim) o aumento da atividade dessa enzima no soro é sempre de origem hepática e/ou biliar (FRENCH et al., 1999). Neste trabalho, os valores médios obtidos estão dentro dos valores de

normalidade utilizados, indicando ausência de lesão hepática crônica ou doença biliar ativa.

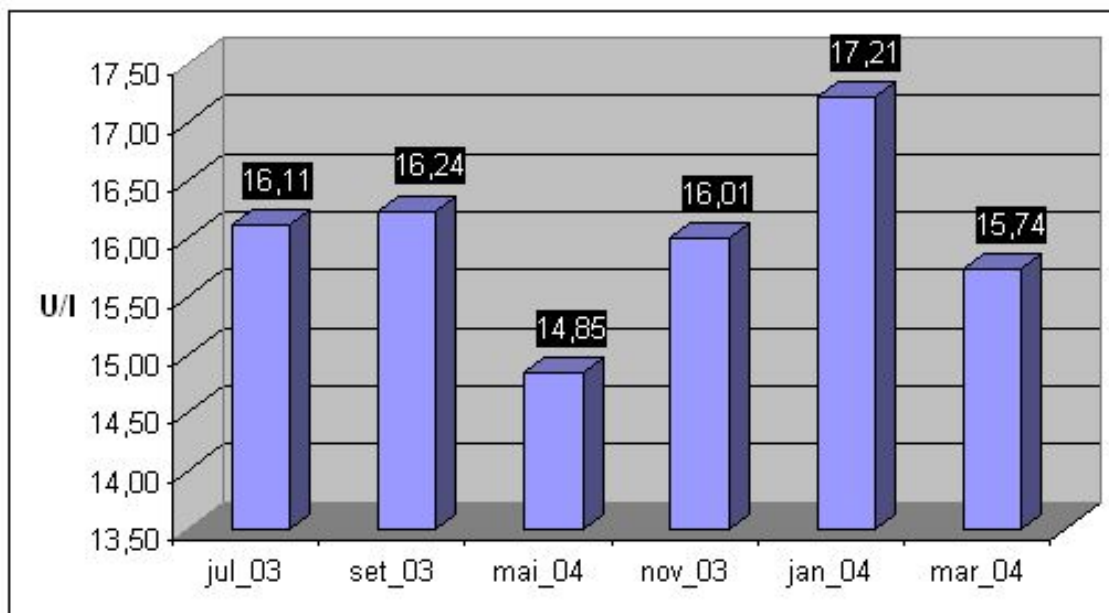


FIGURA 5 – Valor médio sérico da atividade da GGT (U/l), nas seis colheitas, agrupadas em estação seca (jul_03, set_03, mai_04) e chuvosa (nov_03, jan_04, mar_04), na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

Do total de 1178 soros analisados, 25 (12,5%), 13 (6,6%), 62 (31,5%), 17 (8,7%), 28 (14,4%) e 11 (5,7%) animais apresentaram AST elevada na 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª e 6ª colheita, respectivamente. Os valores séricos médios de bovinos saudáveis encontrados em cada colheita para a enzima AST, com seus respectivos desvios padrões estão sumarizados na Tabela 3. O menor e maior valor médio foi observado respectivamente na segunda colheita e terceira colheita, ou seja, no final do período seco e no início da estação chuvosa. As maiores médias foram encontradas durante o período chuvoso (Figura 6).

Os valores médios obtidos para a atividade sérica de AST estiveram dentro da amplitude de variação dos valores de normalidade. A avaliação da concentração de AST no soro de grandes animais é utilizada como indicador de lesão hepática e/ou muscular (DUNCAN & PRASSE, 1982; FRENCH et al., 1999). A enzima é encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias na forma de diferentes isoenzimas em muitos tecidos. Injúrias nos hepatócitos relativamente brandas já são suficientes para o aumento da isoenzima presente no citoplasma, no entanto,

lesão mais severa é necessária para ocorrer liberação da enzima presente no conteúdo intramitocondrial (FRENCH et al., 1999; HENDRIX, 2002). Não é um bom indicador de lesão hepática crônica, porque muitas vezes apresenta atividade sérica normal nessa situação (BLACKSHAW, 1978). Como não é uma enzima específica a determinação de outros parâmetros séricos que reflitam a integridade morfológica e funcional do fígado é necessária para verificar a presença de hepatopatia (DOXEY, 1985; FRENCH et al., 1999), por isso realizou-se as quantificações de GGT e bilirrubina. Os valores médios da atividade sérica de AST estiveram dentro dos parâmetros de normalidade juntamente com os de GGT, indicando ausência de lesão hepática aguda.

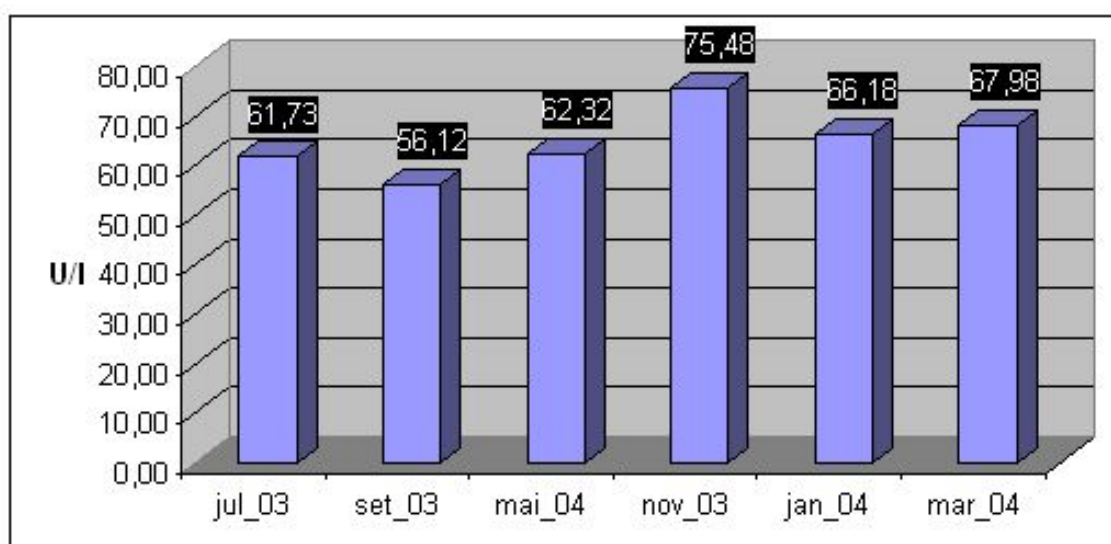


FIGURA 6 – Valor médio sérico da atividade da AST (U/l), nas seis colheitas, agrupadas em estação seca (jul_03, set_03, mai_04) e chuvosa (nov_03, jan_04, mar_04), na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

No total, foram encontrados 150 valores de GGT acima do valor mais alto utilizado como parâmetro de normalidade, durante todo o período experimental (Tabela 4). Quando esses valores foram comparados aos valores encontrados por FAGLIARI et al. (1998), 11,67 a 22,73 U/l, esse número diminuiu para 67. Com relação aos valores de AST, obteve-se 156 valores acima do valor de normalidade utilizado (Tabela 4), mas diminuem para dois se compararmos com os valores citados por KANEKO (1997). Isso reflete a necessidade da

determinação de valores de normalidade específicos para cada raça e região, como sugerido por PEARSON (1993).

TABELA 4 - Freqüência, por fazenda, de valores elevados da atividade sérica de GGT e AST, na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

Enzima	Fazenda										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GGT	11	14	22	23	24	8	23	12	6	7	150
AST	4	22	2	11	32	6	19	27	6	27	156

Com relação aos valores de bilirrubina direta, 8 (4%), 4 (2%), 7 (3,6%), 7 (3,6%), 4 (2,1%) e 4 (2,1%) animais apresentaram valores acima do normal e para bilirrubina total 7 (3,5%), 3 (1,5%), 1 (0,5%), 0 (0%), 5 (2,6%) e 4 (2,1%) animais apresentaram valores um pouco elevados na 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a e 6^a colheita, respectivamente. Apesar disso, os valores encontrados são muito próximos do valor mais alto utilizado como parâmetro de normalidade. Na Tabela 3 são mostrados os valores médios, desvios padrões e coeficientes de variação da bilirrubina direta e total, respectivamente.

Os valores de bilirrubina (direta e total) sofreram variações muito pequenas no decorrer do experimento e os valores médios estão dentro da amplitude de variação dos valores de normalidade utilizados (Figuras 7 e 8), indicando ausência de processos colestásicos e/ou de insuficiência hepática. O aumento sérico da bilirrubina indica prejuízos na sua excreção, devido à doença hepática e/ou biliar, ou elevação na produção como ocorre nas anemias hemolíticas (SMITH, 1993). A bilirrubina está normalmente aumentada, em bovinos, quando a lesão hepática é acentuada. A colestase pode ocorrer por obstrução de canalículos e de ductos biliares intra e/ou extra-hepáticos e isso vai resultar em bilirrubinemia maior da bilirrubina direta do que da indireta (DUNCAN & PRASSE, 1982; FRENCH et al., 1999). Quando não há anemia hemolítica, valores séricos superiores a 2 mg/dl indicam prejuízos na função hepática (CARLSON, 2003). Elevações séricas da bilirrubina indireta são observadas na hemólise, enfermidade hepática e em eqüinos em jejum, sendo o principal achado em casos de hiperbilirrubinemia em bovinos (DUNCAN & PRASSE, 1982, RADOSTITS et al., 2000).

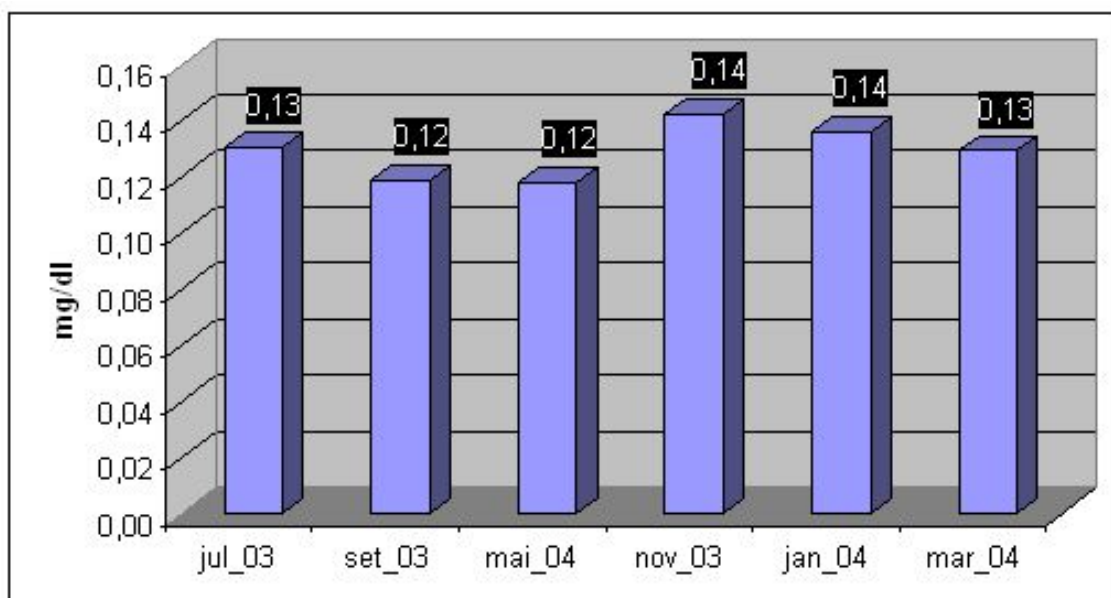


FIGURA 7 – Valor médio sérico da bilirrubina direta (mg/dl), nas seis colheitas, agrupadas em estação seca (jul_03, set_03, mai_04) e chuvosa (nov_03, jan_04, mar_04), na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

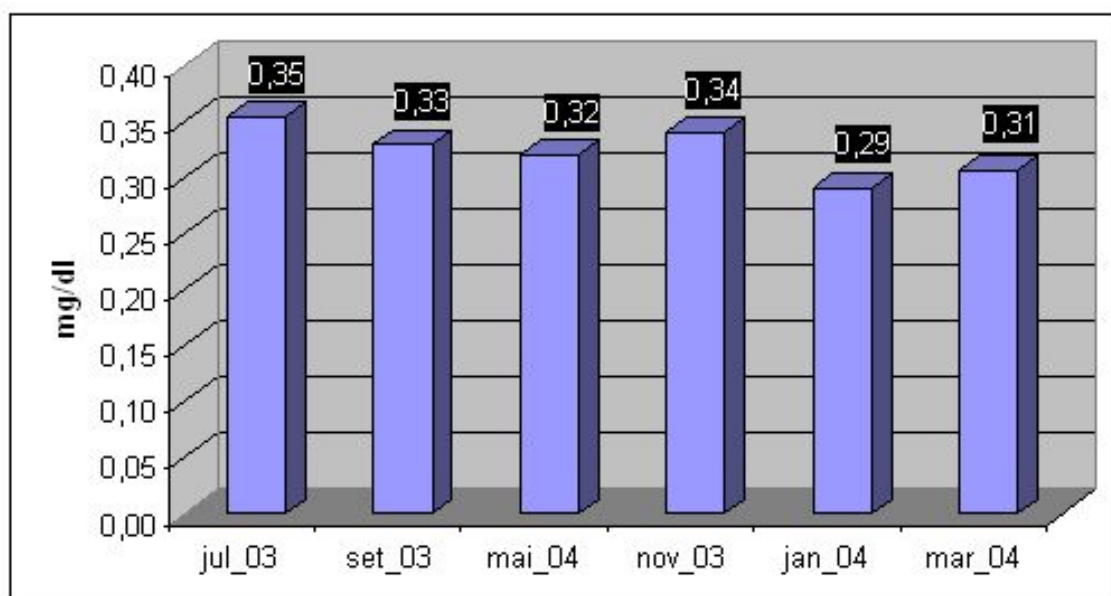


FIGURA 8 – Valor médio sérico da bilirrubina total (mg/dl), nas seis colheitas, agrupadas em estação seca (jul_03, set_03, mai_04) e chuvosa (nov_03, jan_04, mar_04), na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

Os CVs de GGT e AST dos animais deste experimento apresentaram valores entre 21,00% e 34,85%, mostrando que os valores obtidos para esses parâmetros são estáveis em relação ao seu valor médio e se mostraram mais estáveis do que os CVs para BD e BT, que variaram de 25,70% a 45,02%. O coeficiente de variação (CV) é a avaliação da instabilidade relativa que está ocorrendo numa população para o parâmetro analisado e, para respostas animais, oscila entre 20% e 30% (SAMPAIO, 1998).

Na tentativa de visualizar se a época do ano (seca e chuva) exerceu alguma influência nos parâmetros laboratoriais bioquímicos de função hepática dos bovinos em pastagem de *Brachiaria* sp foi aplicado teste estatístico de Qui quadrado. Não houve diferença ($p < 0,05$) entre as colheitas com relação ao número de animais que apresentaram valores séricos de GGT, BD e BT acima do parâmetro de normalidade utilizado para a espécie estudada (Tabela 5).

TABELA 5 - Frequência de bovinos com valores séricos normais e alterados para GGT, AST, BD e BT em cada uma das colheitas, na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

Parâmetro	Variável	Julho 03	Setembro 03	Maió 04	Novembro 03	Janeiro 04	Março 04	Total
GGT	Acima	32	29	16	22	33	19	151
	Normal	168	169	177	175	163	175	1027
	Total	200	198	193	197	196	194	1178
X^2 : 10,92; não significativo ($p < 0,05$)								
AST	Acima	25	13	11	62	17	28	155
	Normal	175	185	182	135	179	166	1023
	Total	200	198	193	197	196	194	1178
X^2 : 79,54; significativo ($p < 0,05$)								
BD	Acima	8	4	4	7	7	4	34
	Normal	192	194	189	190	189	190	1144
	Total	200	198	193	197	196	194	1178
X^2 : 3,00; não significativo ($p < 0,05$)								
BT	Acima	7	3	4	1	0	5	20
	Normal	193	195	189	196	196	189	1158
	Total	200	198	193	197	196	194	1178
X^2 : 10,05; não significativo ($p < 0,05$)								

No início do período chuvoso observou-se um aumento considerável no número de animais que apresentaram AST com atividade acima da normalidade,

indicando que, nesse período, foi maior a ocorrência de alterações morfológicas nos hepatócitos, possivelmente devido à presença de lesões degenerativas nessas células. Aumento na atividade sérica da AST associado a desordens hepáticas é devido, em parte, à degeneração ou necrose de hepatócitos e à liberação dos conteúdos citoplasmáticos e mitocondriais para o sangue e para a linfa (HOFFMANN et al., 1989). Segundo OLIVEIRA (1997) a elevação nas atividades séricas enzimáticas é proporcional ao número de hepatócitos lesados, mas nunca são suficientes para determinar a exata natureza da lesão. Não revelam causas, distribuição e reversibilidade da lesão ou estado de funcionalidade do órgão.

A manifestação clínica de lesões hepáticas ocorre apenas quando a maior parte do parênquima do órgão é afetada, uma vez que lesões focais raramente destroem quantidade suficiente de células (LACHLAN & CULLEN, 1990). Além disso, nem sempre todas as funções hepáticas se perdem ao mesmo tempo ou são igualmente alteradas e uma lesão pode estar presente e não ser revelada por qualquer um dos testes laboratoriais (COLES, 1984; LACHLAN & CULLEN, 1990). Assim, o fato de não serem apresentadas alterações em valores da bioquímica sérica, não implica necessariamente ausência de lesões hepáticas.

Segundo BLACKSHAW (1978), muitas vezes animais que tem valores séricos enzimáticos normais, podem apresentar lesões hepáticas macro ou microscópicas, por isso, para melhor avaliação, deveria ser feita a biópsia hepática.

Para a AST houve diferença ($p < 0,05$) entre as colheitas com relação ao número de animais que apresentaram valores acima do considerado normal para a espécie estudada na época seca ($n=49$) e nas chuvas ($n=107$) (Tabela 5).

4.3.3. Número de esporos nas pastagens

Os bovinos avaliados foram mantidos em diferentes tipos de pastagens (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola*, *Hyparrhenia* sp, *P. maximum* cv Tanzânia, capim nativo), mas predominaram as do gênero *Brachiaria*. A quantidade de esporos encontrados nas fazendas estudadas, durante o período

experimental, variou de zero a 40.000 esporos por grama de forrageira. O número mais alto de esporos do fungo foi observado na estação seca, logo no começo do experimento (colheita 1 – julho/03), e não aumentou com a chegada da estação chuvosa (Figura 9). O menor número de esporos foi observado na colheita 4 (janeiro/04), no meio da estação das chuvas.

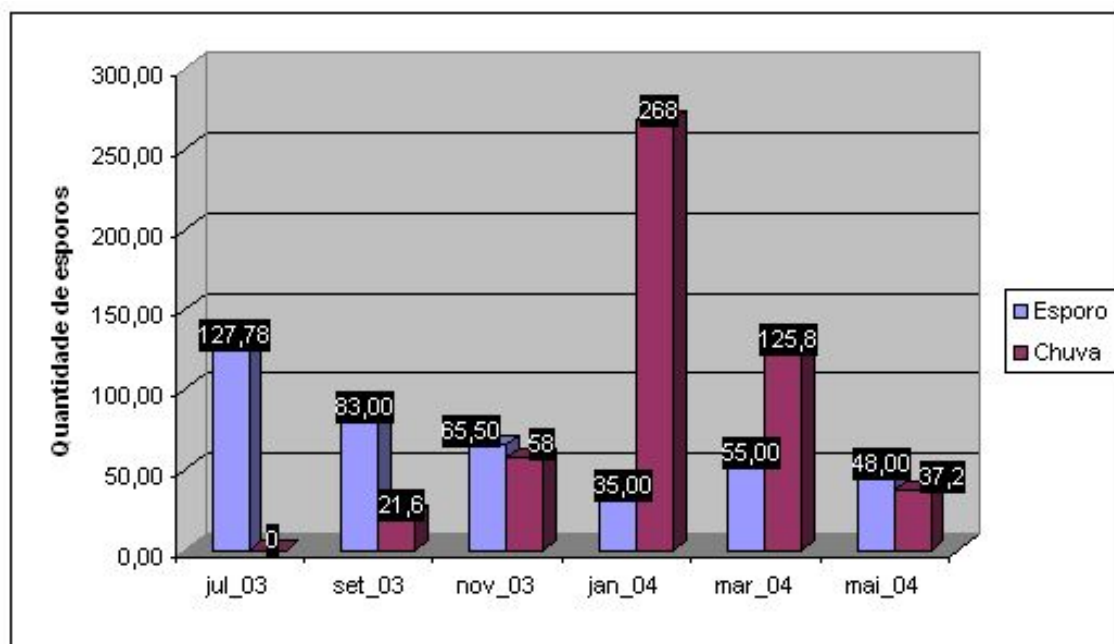


FIGURA 9 – Precipitação pluviométrica e quantidade média de esporos, por colheita, durante o período experimental, na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

FIORAVANTI (1999), estudando a incidência subclínica de esporidesminotoxicose em bovinos no Estado de Goiás observou, em 15 fazendas que tinham predominância de espécies de *Brachiaria*, que o número de esporos por grama de forrageira variou de zero a 15.000. Nessas fazendas não foram observados casos clínicos da enfermidade durante o experimento. Esses valores foram semelhantes aos obtidos neste trabalho. Vale ressaltar que nestes dois estudos não ocorreram surtos de fotossensibilização durante o período experimental.

Em uma pesquisa realizada por FAGLIARI (1990), onde foram acompanhados 20 surtos em bovinos mantidos em pastagens de *B. decumbens*, no município de Selvíria – MS, intoxicados naturalmente pela esporidesmina, encontrou-se contagens de 87.000 a 251.000 esporos por grama de forrageira,

mas não foi avaliada a capacidade da cepa de produzir a toxina. Este pesquisador relatou um número elevado de esporos, mas nesse experimento houve acompanhamento de surtos da enfermidade, o que não ocorreu no presente experimento.

No presente trabalho foi observado 40.000 esporos, somente, na fazenda 9, na colheita 1, no entanto não foram observados animais com sinais clínicos sugestivos de fotossensibilização e, nem alterações nos parâmetros bioquímicos, com exceção de um animal que teve um discreto aumento (31,80 U/l) na atividade da enzima GGT. No caso de contagens mais elevadas poderia indicar que os esporos não estavam produzindo toxina naquele momento ou que eles eram provenientes de cepas não produtoras da toxina, já que existem indícios de que as cepas americanas sejam geneticamente diferentes das neozelandesas produtoras da toxina (BEEVER & PARKES, 1993) e que a maior parte das cepas brasileiras isoladas não produziu a toxina em laboratório (COLLIN et al., 1998).

No presente estudo, o número de esporos diminuiu gradativamente até o meio da estação chuvosa, teve um ligeiro incremento no final das águas e recomeçou a cair no início da seca. Mais uma vez é importante lembrar que não ocorreram surtos da enfermidade nos bovinos acompanhados durante o período experimental. FAGLIARI (1990) observou que a doença ocorreu em todas as estações do ano com a mesma intensidade e que o principal fator climático predisponente para o desenvolvimento do fungo foi a precipitação pluviométrica. Na estação seca (e fria) observou menor quantidade de esporos (87.000 a 111.000) que nas demais épocas, provavelmente por causa das condições climáticas menos favoráveis, mas isso não fez diminuir a prevalência da intoxicação. A época de maior número de esporos (118.000 a 251.000) e que ocorreu maior número de surtos da enfermidade foi no final das águas (abril e maio) e início das chuvas (outubro e novembro). Não foi possível explicar a diminuição no número de esporos com a chegada da estação das chuvas.

Sob condições ambientais favoráveis são produzidos muitos esporos que contém a esporidesmina (KELLERMAN et al., 1990; ALVARIZA, 1993; KELLY, 1993), sendo seu crescimento influenciado pela temperatura e umidade (Di MENNA & BAILEY, 1973). A temperatura ideal para o crescimento do fungo é

de 24° C. No entanto, temperaturas médias de 18° C associadas à umidade relativa de 80 %, dias nublados, com chuvas e abundante matéria vegetal morta permitem que o fungo complete o ciclo inteiro em três a quatro dias (ALVARIZA, 1993). Os esporos podem ser destruídos pela germinação ou dessecação e são removidos pelo vento, chuva e ingestão por outros seres vivos (Di MENNA & BAILEY, 1973). Portanto, o fato de não serem encontradas quantidades suficientes de esporos no momento da investigação dos casos clínicos, não descarta a toxina como agente etiológico. Por esta razão é necessário o estudo de casos clínicos e o diagnóstico deve ser composto pela associação da epidemiologia, com os sinais clínicos, a avaliação da bioquímica sérica e das lesões anatomopatológicas dos animais afetados.

4.3.4 Determinação e quantificação da saponina protodioscina

O teor de saponinas foi determinado na planta total após secagem, isto é, a fração da planta verde seca mais a fração de material senescente (folhas velhas). Verificou-se que as folhas senescentes contêm, aproximadamente, quatro vezes menos protodioscina do que as folhas verdes.

No sistema utilizado (clorofórmio, metanol e água – 16:9:2), os cromatogramas das amostras de extrato etanólico e resíduo butanólico das folhas de *B. decumbens* e *B. brizantha* apresentaram o mesmo perfil quando revelados com solução de ácido sulfúrico 10% evidenciando duas manchas intensas características de esteróides, com maior concentração, no Rf 0,28 e Rf 0,34, correspondentes, às saponinas protodioscina e metilprotodioscina. As saponinas isoladas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico quando comparadas com o padrão isolado anteriormente por HARAGUCHI et al. (2003). Esses cromatogramas foram revelados, também, com solução de Ehrlich que evidencia somente substâncias químicas que contêm anel furostânico em sua estrutura, confirmando a estrutura tanto da protodioscina, como da metilprotodioscina (Figura 10). Segundo SHAO et al. (1997), a protodioscina é convertida rapidamente para metilprotodioscina em presença de metanol. No presente caso,

o sistema de solventes empregado contém metanol, assim, este solvente pode ser o desencadeador da formação da metilação.

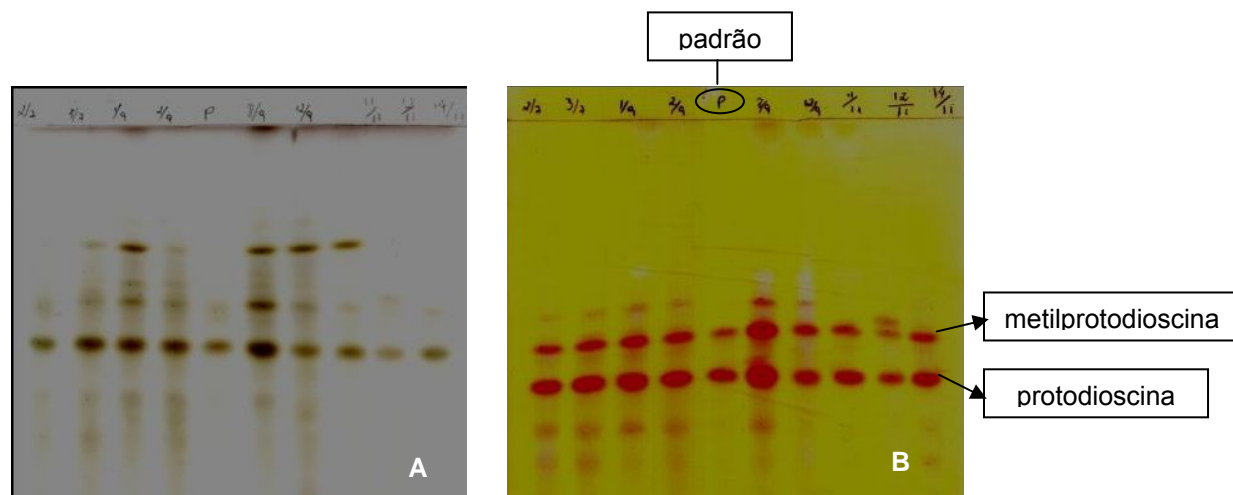


FIGURA 10 – Cromatograma das amostras de *Brachiaria*. Revelação com ácido sulfúrico (A) e reativo de Ehrlich (B)

Nos cromatogramas dos resíduos butanólicos de *B. brizantha* em CCD foram visualizados, na sua grande totalidade, quando revelados em solução de ácido sulfúrico 10%, além das saponinas protodioscina e metilprotodioscina, uma mancha de saponina em Rf 0,66, não detectado por reativo de Ehrlich. Isso indica que, possivelmente, esta saponina não apresenta anel furostânico em sua estrutura química.

As amostras de *B. humidicola* não contêm os isômeros das saponinas protodioscina e metilprotodioscina. Entretanto em seus cromatogramas aparece uma mancha cor-de-rosa na origem (local de aplicação da amostra) e várias manchas da mesma cor que são visualizadas sem a utilização do revelador. Quando é feita a pulverização com o ácido sulfúrico não há reação com o revelador, evidenciando que, realmente, não são saponinas. No entanto, quando é procedida a reação para a dosagem das saponinas com o reativo de Ehrlich, a solução é positiva (tem absorvância) na espectrofotometria, possivelmente por essa espécie de *Brachiaria* conter uma substância que é detectada em comprimento de onda semelhante ao das saponinas das outras duas espécies de *Brachiaria*.

A *B. humidicola*, *P. maximum* cv Tanzânia, *Andropogon* sp e o capim nativo não apresentaram os isômeros das saponinas protodioscina e metilprotodioscina. Como na fazenda 5 os animais foram mantidos somente em pastagens de *B. humidicola* e *Andropogon* sp, e ambas não contêm os isômeros de protodioscina, essa propriedade será utilizada como controle na discussão dos resultados referentes a saponina.

Considerando as fazendas estudadas, em seis delas o maior teor de saponina foi observado no mês de março (colheita 5), fase final da estação chuvosa, que foi precedido pelos três meses mais chuvosos do período analisado. O volume de chuvas aumentou consideravelmente no mês de outubro (início da estação chuvosa) e houve elevação nos teores de protodioscina da segunda (setembro) para a terceira colheita (novembro) (Figura 11). O volume de chuvas foi diminuindo a partir de março e reduziu consideravelmente no mês de maio (início da estação seca) e constatou-se uma queda nos teores das saponinas neste mês.

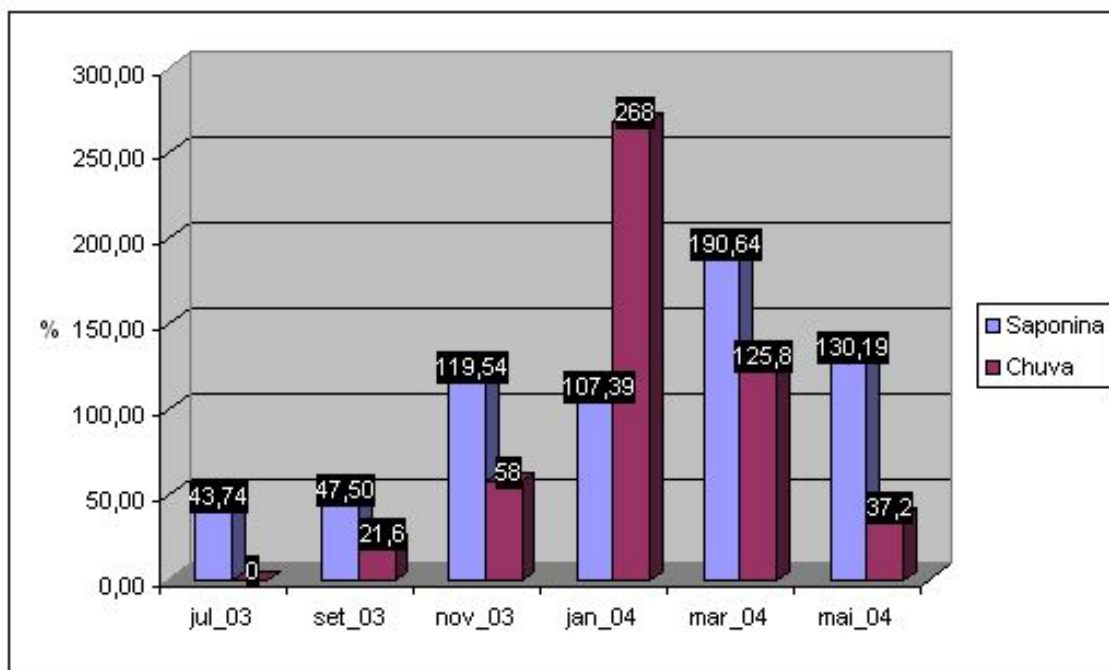


FIGURA 11 – Precipitação pluviométrica e concentração média de saponinas totais (%), por colheita, durante o período experimental, na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

As menores concentrações de saponinas nas plantas foram observadas nos meses de julho e setembro (colheita 1 e 2, respectivamente), na estação seca (Figura 11). Nestas duas colheitas conseguiu-se dosar as saponinas em oito fazendas e, destas, cinco apresentaram menores concentrações em julho e três em setembro. Nos meses de junho e julho não choveu e em agosto e setembro choveu muito pouco. Nos dois meses de menor concentração das saponinas, as pastagens estavam muito secas e superpastejadas. Associado a falta de chuvas, as folhas secas contêm quatro vezes menos saponinas do que as folhas verdes, contribuindo assim para a baixa concentração de saponinas nesse período. A partir dessas observações, pode-se sugerir que o volume de chuvas influenciou a concentração de saponinas nas amostras de plantas avaliadas.

Nos dois meses de maior concentração de saponinas (março e maio), as plantas estavam verdes com sementes e com queda de sementes, isto é, na fase final do ciclo de vida das plantas. Esse fato corrobora com os resultados obtidos em outro experimento que avaliou a concentração de saponinas em cultivares de *B. decumbens* e *B. brizantha* nas diferentes fases do ciclo de vida dessas plantas (BRUM et al., 2004). Neste experimento a fase que apresentou maior concentração da protodioscina foi a de queda das sementes, ou seja, fase final do ciclo de vida, na qual foram observados teores de 2,09% e 1,94 % para *B. brizantha* e *B. decumbens*, respectivamente. Entretanto, no presente experimento o maior teor observado foi de 2,752% em pastagem de *B. brizantha*, evidenciando que os teores de saponinas nas plantas não são constantes.

Um estudo feito por MEAGHER et al. (1996) com *Panicum* sp e *B. decumbens* mostra que os níveis de saponinas e sapogeninas podem variar entre as espécies e dentro da mesma espécie, de acordo com a idade da planta e o local de colheita. Observações semelhantes foram feitas por FLAØYEN et al. (2004) que avaliou a concentração de sapogeninas em amostras de *Narthecium ossifragum* e elas variaram entre os locais, ao longo de uma estação do ano e possivelmente entre as plantas. Além disso, a concentração de saponinas em plantas pode variar, também, com estresses ambientais e fase do ciclo de vida (OLESZEK, 2002).

O mais alto valor observado para os teores das saponinas foi de 2,752% na quinta colheita da fazenda 9. Apesar disso, os testes de bioquímica

clínica efetuados no soro dos animais, não demonstraram nenhum valor acima daqueles utilizados como parâmetro de normalidade para a espécie, com exceção de um único animal que teve elevação muito discreta na AST. Mesmo com o teor mais elevado de saponina observado nessa pastagem, não foram observados casos clínicos de fotossensibilização.

Em um surto da enfermidade que ocorreu em ovinos mantidos em piquete formado com *B. decumbens*, foram encontrados teores de 2,36% da protodioscina na pastagem que estava em fase de florescimento (BRUM et al., 2004). Isso sugere que para essa espécie animal não é necessário que a planta contenha o nível máximo de saponinas para desencadear a enfermidade, ou seja, que os ovinos são mais sensíveis à ação das saponinas do que os bovinos. Sabe-se que as diversas espécies animais não tem a mesma sensibilidade para a ação de toxinas (TOKARNIA et al., 2000). Não foram encontrados trabalhos que comparem a susceptibilidade entre bovinos e ovinos com relação à intoxicação pela saponina. No entanto, existem relatos na literatura, por exemplo, para a intoxicação por *Senecio brasiliensis* que os bovinos são muito mais sensíveis que ovinos e caprinos (TOKARNIA et al., 2000). Ao contrário, na intoxicação pela esporidesmina, sabe-se que os ovinos são mais sensíveis do que os bovinos (MORTIMER et al., 1978) e estes são, aparentemente, mais sensíveis que os caprinos (SMITH & EMBLING 1991; MORRIS et al., 2004).

4.3.5 Relação entre fotossensibilização, quantidade de esporos e quantidade de saponinas

As forrageiras *B. brizantha* e *B. decumbens* são importante fonte de alimento para os animais de produção na região do Cerrado brasileiro e foi graças a elas que se possibilitou a expansão da atividade pecuária nessa área do país. Essas espécies de *Brachiaria* alojam saprofiticamente os esporos do fungo *P. chartarum*, contêm saponinas esteroidais e esporadicamente são observados surtos de fotossensibilização hepatógena em ruminantes mantidos nessas pastagens, seja pela ação da toxina do fungo, das saponinas presentes na própria planta ou de ambas.

É fato que as plantas relacionadas com a fotossensibilização associada a cristais contêm saponinas esteroidais e que os cristais biliares são produtos de seus metabolismos, mas isso não implica que elas sejam as únicas responsáveis pelas lesões hepáticas. É possível que outros fatores, tais como outras plantas ou micotoxinas (como a esporidesmina) tenham efeito sinérgico ou levem ao metabolismo anormal que resulte na formação de cristais biliares (MILES et al., 1991; MUNDAY et al., 1993). A ingestão de *P. dichotomiflorum* exacerba os efeitos de fotossensibilização em animais com eczema facial e vice-versa (MILES et al., 1991). Esses, talvez, sejam fatores que expliquem a ocorrência esporádica da intoxicação.

Um íon pseudo-molecular compatível com estrutura semelhante a da dicotomina foi identificado no extrato de *B. decumbens*, por ESI-MS (MEAGHER et al., 1996). A dicotomina é descrita como responsável por surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos na Nova Zelândia (MUNDAY et al., 1993). Assim, este último composto corresponde, provavelmente, a protodioscina, composto detectado neste trabalho.

A protodioscina, saponina que foi isolada das folhas de *B. decumbens* e *B. brizantha* no presente trabalho, vai resultar nas sapogeninas diosgenina e yamogenina após a hidrólise. Saponinas esteroidais derivadas de diosgenina e yamogenina tem sido identificadas em *B. decumbens* e seus metabólitos tem sido isolados no rúmen de ovinos que se alimentam da mesma (SALAM ABDULLAH et al., 1992; SMITH & MILES, 1993).

Com relação aos níveis de saponinas de *B. decumbens*, em trabalhos anteriores foram dosados os níveis de saponinas após hidrólise ácida, ou seja, as sapogeninas. Uma amostra brasileira de planta que causou surto de fotossensibilização hepatógena em bovinos apresentou 57 mg/kg de diosgenina e 47 mg/kg de yamogenina. Amostras provenientes de plantas jovens da Austrália apresentaram níveis de 144 mg/ kg de diosgenina e 210 mg/kg de yamogenina e plantas maduras 28 mg/kg e 38 mg/kg, respectivamente. No entanto não foram realizadas dosagens da saponina da planta, mas a partir destes resultados, infere-se que as concentrações das saponinas na *Brachiaria* não são constantes, assim como as concentrações das sapogeninas (MEAGHER et al., 1996). Não

foram encontrados trabalhos que relatassem a dosagem das saponinas em espécies de *Brachiaria*, somente das saponinas.

O presente trabalho apresenta dados semiquantitativos dos teores da saponina protodioscina. Não foi utilizada uma técnica mais precisa (HPLC), em virtude do alto custo do detector apropriado para esse tipo de substância. A técnica apresentada, com reativo de Ehrlich, é mais barata e proporciona uma boa avaliação dos níveis de saponinas das pastagens. São necessárias mais pesquisas, com uma técnica de maior precisão, para a dosagem das saponinas, bem como a determinação dos níveis tóxicos das saponinas presentes nas espécies de *Brachiaria*, para ruminantes, pela reprodução experimental através da administração de saponinas puras e, também, do acompanhamento de casos clínicos.

O tempo de aparecimento de sinais clínicos após a introdução dos animais na pastagem ou administração do agente tóxico é bastante variado e não está relacionado com a espécie animal (LEMOS et al., 1997; CRUZ et al., 2001; DRIEMEIER et al., 2002). Desse modo, estudos que cursem com o acompanhamento de ovinos e bovinos pastejando espécies de *Brachiaria* no mesmo piquete, são imprescindíveis para a melhor avaliação da susceptibilidade das duas espécies à enfermidade.

Quando é analisado o número de valores de GGT e AST acima do normal, por fazenda, pode-se notar que a fazenda 5, que foi utilizada como controle, apresentou o maior número de animais com valores de AST elevados (32) no total das avaliações. Com relação ao GGT, a fazenda 5 apresentou o maior número (23) de valores acima do normal, juntamente com mais duas propriedades (fazendas 4 e 7). É importante lembrar que os animais dessa fazenda permaneceram saudáveis durante o período experimental. Esses dados revelam que somente a presença da saponina protodioscina nas plantas, não é suficiente para causar lesões nos hepatócitos ou ductos biliares, nas condições estudadas.

4.4 CONCLUSÕES

1. Os resultados bioquímicos mostram alterações pouco significativas, indicando ausência de lesão hepática e/ou biliar consistente ao longo do período experimental;
2. O número de esporos de *P. chartarum* encontrados nas pastagens é menor que 40.000 esporos por grama de forrageira e a maior quantidade é observada no mês de julho em pastagens superpastejadas e secas;
3. A saponina protodioscina é encontrada somente nas folhas de *B. decumbens* e *B. brizantha* e não foi detectada nas demais pastagens avaliadas (*B. humidicola*, *P. maximum* cv Tanzânia, *Andropogon* sp e capim nativo);
4. A maior quantidade da saponina protodioscina é observada em março, final da estação das chuvas, e a menor quantidade ocorre em julho, no meio da estação seca, demonstrando grande variação nos teores de saponinas, sugerindo uma relação com a precipitação pluviométrica e/ou ciclo de vida das espécies de *Brachiaria* avaliadas;
5. Somente a presença da saponina protodioscina não é suficiente para o aparecimento de surtos de fotossensibilização hepatógena nos bovinos.

REFERÊNCIAS

1. ALVARIZA, F. R. Intoxicação por *Pithomyces chartarum*. In: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. (Ed.). **Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos**. Pelotas: Editorial Hemisfério Sul do Brasil, 1993. cap. 3, p. 93-101.
2. BEEVER, R. E.; PARKES, S. L. Variation of *Pithomyces chartarum*, causal agent of facial eczema. Proceedings of a Symposium on Mycotoxicosis of Grassland Farming. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 41, n. 4, p. 212-224, 1993.
3. BARROS FILHO, I. R. **Contribuição ao estudo da bioquímica clínica em zebuínos da raça Nelore (*Bos indicus*, Linnaeus 1758) criados no Estado de São Paulo**. 1995. 132f. Tese (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
4. BIRGEL, E. H.; LARSON, M. H. M. A.; HAGIWARA, M. K.; VASCONCELOS, S. A.; LARSSON, C. E.; OGASSAWARA, S.; BENESI, F. G. **Patologia clínica veterinária**. Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, São Paulo, 1982. 260 p.
5. BLACKSHAW, C. Serum gamma glutamiltransferase in the diagnosis of liver disease in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 26, n. 5, p. 25-26, 1978.
6. BRAUN, J. P., SIEST, G., RICO, A. C. Uses of gammaglutamiltransferase in experimental toxicology. **Advances in Veterinary Science and Comparative**, New York, v.31, s/n, p.151-172, 1987.
7. BRIDGES, C. H.; CAMP, B. J.; LIVINGSTON, C. W. BAILEY, E. M. Kleigrass (*Panicum coloratum* L.) poisoning in sheep. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 24, p. 525-531, 1987.
8. BRUM, K. B.; HARAGUCHI, M.; LEMOS, R. A. A.; FIORAVANTI, M. C. S. 2004, Colangiopatia associada a cristais em ovinos mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens*. In: 1º Simpósio Latino-Americano de Plantas Tóxicas, 2004, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Pesquisa Veterinária Brasileira, 2004. 24 (supl): 14.
9. CAMARGO, W. V. A.; NAZARIO, W.; FERNÁNDEZ, N. S.; AMARAL, R. E. M. Fotossensibilização em bovinos de corte. Provável participação do fungo *Pithomyces chartarum*, na etiologia do processo. **Biológico**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 249-261, 1976.
10. CAMP, B. J.; BRIDGES, C. H.; HILL, D. W.; PATAMALAI, B.; WILSON, S. Isolation of steroidal sapogenina from the bile of a sheep fed *Agave*

- lecheguilla*. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 30, n. 6, p. 533-535, 1988.
11. CARLSON, G. P. Testes de química clínica. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. 1ª ed., São Paulo: Editora Manole, 1993. v. 1, cap. 22, p. 395-423.
 12. CASTRO, H. R.; MOREIRA, A. M.; ASSAD, E. S. Definição e regionalização dos padrões pluviométricos dos Cerrados Brasileiros. In: **Chuvas nos Cerrados: Análise e Espacialização**. EMBRAPA CPAC/SPI, Planaltina, DF. p. 13-23, 1994.
 13. CEH, L.; HAUGE, J. G. Alveld – producing saponins. I. Chemical studies. **Acta Veterinary Scandinavica**, Copenhagen, v. 22, p. 391-402, 1981.
 14. COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Manole, 1984. 566p.
 15. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Ed.). **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. 279 p.
 16. COLLIN, R. G.; TOWERS, N. R. Competition of a sporidesmin-producing *Pithomyces* strain with a non-toxicogenic *Pithomyces* strain. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 43, n. 4, p. 149-152, 1995.
 17. CRUZ, L. C. H. Isolamento do *Pithomyces chartarum* de *Brachiaria decumbens* e alguns fatores que influem sobre a esporulação. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 5, p. 139-142, 1986.
 18. CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V. S.; COLODEL, E. M.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Isolation of steroidal saponins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 42, n. 3, p. 142-145, 2000.
 19. CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V. S.; SCHENKEL, E. P. Experimentally induced cholangiopathy by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria decumbens*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Stillwater, v. 13, p. 170-172, 2001.
 20. DiMENNA, M. E.; BAILEY, J. R. *Pithomyces chartarum* spore counts in pasture. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 16, n. 3, p. 343-351, 1973.
 21. DINGLEY, J. M. *Pithomyces chartarum*, its occurrence, morphology and taxonomy. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 5, p. 49-61, 1962.

22. DOXEY, D. L. **Patologia clínica e métodos de diagnóstico**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985. 306 p.
23. DRIEMEIER, D.; COLODEL, E. M.; SEITZ, A. L.; BARROS, S. S.; CRUZ, C. E. F. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p. 1027-1031, 2002.
24. DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Patologia clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 217 p.
25. FAGLIARI, J. J. **Estudo epidemiológico, clínico e laboratorial da intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina**. 1990. 107f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
26. FAGLIARI, J. J.; OLIVEIRA, J. A.; KUCHEMUCK, M. R. G. CURI, P. R. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. III. Desenvolvimento ponderal de bovinos intoxicados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 3, p. 283-289, 1993a.
27. FAGLIARI, J. J.; KUCHEMUCK, M. R. G. CURI, P. R. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 3, p. 275-282, 1993b.
28. FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; LUCAS, F. A.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de bovinos lactentes, desmamados e adultos das raças nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 263-271, 1998.
29. FERRAZ, F. M. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. In: NAKAMAE, I. J. (Ed.) **Anualpec – Anuário da Pecuária Brasileira**, 10^a ed., São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2003, p. 55-56.
30. FIORAVANTI, M. C. S. **Incidência, avaliações clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos**. 1999. 256f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
31. FLAØYEN, A.; WILKINS, A. L.; Di MENNA, M. E.; SANDVIK, M. The concentration of steroidal sapogenins in the degree of fungal infection on *Narthecium ossifragum* plants in Møre and Romsdal Country, Norway. **International Symposium on Poisonous Plants**. 2004. Glasgow. Wallingford, Oxon: CABI Publishing 2001.

32. FRENCH, T. W.; BLUE, J. T.; STOKOL, T. **Clinical Pathology Modules. Veterinary Clinical Chemistry** [online], 1999. Disponível em: <http://web.vet.cornell.edu/public/popmed/clinpath/Cpmodules/chem/chempa.nl.htm>. Acesso em: 10 ago, 2003.
33. GJULEMETOVA, R.; TOMOVA, M.; SIMOVA, M.; PANGAROVA, T.; PEEVA, S. Über die Bestimmung von Furostanolsaponinen im Präparat Tribestan. **Pharmazie**, Berlin, v. 37, n. 4, p. 296, 1982.
34. GLASTONBURY, J. R. W.; DOUGHTY, F. R.; WHITAKER, S. J.; SERGEANT, E. A syndrome of hepatogenous photosensitization, resembling geldikkop, in sheep grazing *Tribulus terrestris*. **Australian Veterinary Journal**, Queensland, v. 61, n. 10, p. 314-316, 1984.
35. GRAYDON, R. J.; HAMID, H.; ZAHA, R. I. P.; GARDINER, C. Photosensitization and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. **Australian Veterinary Journal**, Queensland, v. 68, n. 7, p. 234-236, 1991.
36. HANSEN, D. E.; McCOY, R. D.; HEDSTROM, O. R.; SNYDER, S. P.; BALLERSTEDT, P. B. Photosensitization associated with exposure to *Pithomyces chartarum* in lambs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 204, n. 10, p. 1668-1671, 1994.
37. HARAGUCHI, M.; CUNHA, H. A.; MIMAKI, Y.; BRUM, K. B.; LEMOS, R. A. A.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. Furostanol glicosídicos nas folhas de *Brachiaria decumbens*. **Proceedings of the 26th Annual meeting of the Chemical Brazilian Society** PN-066, 2003.
38. HENDRIX, C. M. **Laboratory procedures for veterinary technicians**. Philadelphia : Mosby, 4 ed., 2002. 559 p.
39. HOFFMANN, W. E.; KRAMER, J.; MAIN, A. R.; TORRES, J. L. **Clinical enzymology in the clinical chemistry of laboratory animals**. Pergamon Press, New York, 1989. 762 p.
40. HOLLAND, P. T.; MILES, C. O.; MORTIMER, P. H.; WILKINS, A. L.; HAWKES, A. D.; SMITH, B. L. Isolation of the steroidal sapogenina epismilagenin from the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 39, n. 11, p. 1963-1965, 1991.
41. JACOB, R. H.; PEET, R. L. Poisoning of sheep and goats by *Tribulus terrestris* (caltrop). **Australian Veterinary Journal**, Queensland, v. 64, n. 9, p. 288-289, 1987.
42. KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Academic Press, San Diego, 1997, p. 890-894.

43. KELLERMAN, T. S.; COETZER, J. A. W.; NANDÉ, T. W. **Plant Poisonings and Micotoxicosis of Livestock in Southern Africa**. 2. ed. Cape Town: Oxford University, 1990. 243 p.
44. KELLY, W. R. Liver and biliary system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic Animals**, 4 ed. San Diego: Academic, 1993. v. 2. cap. 2, p. 319-406.
45. LACHLAN, N. J.; CULLEN, J. M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: THOMSON, R. G. **Patologia veterinária especial**. São Paulo: Manole, 1990. p. 265-307.
46. LEMOS, R. A. A.; PURISCO, E. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena. In: LEMOS, R. A. A.; BARROS, N.; BRUM, K. B. (Org.). **Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte: perguntas e respostas**, Campo Grande: UFMS, 2002. p. 147-155.
47. LEMOS, R. A. A.; FERREIRA, L. C. L.; SILVA, S. M.; NAKAZATO, L.; SALVADOR, S. C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 109-113, 1996a.
48. LEMOS, R. A. A.; NAKAZATO, L.; HERRERO JR, G. O.; SILVEIRA, A. C.; PORFÍRIO, L. C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 507-510. 1998.
49. LEMOS, R. A. A.; OLIVEIRA, V. A.; HERRERO JR, G. O.; FERREIRA, M. B.; ALMEIDA, A. J. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bovinos lactentes associada a ingestão de *Brachiaria decumbens*. Abstracts: XV PANVET. **Abstracts...** Campo Grande, 1996b. p. 170.
50. LEMOS, R. A. A.; OSÓRIO, A. L. A. R.; RANGEL, J. M. R.; HERRERO JR, G. O. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bezerros ingerindo *Brachiaria brizantha*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, supl., p. 22, 1996c.
51. LEMOS, R. A. A.; SALVADOR, S. C.; NAKAZATO, L. Phtosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazin *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 39, n. 6, p. 376-77, 1997.
52. MACEDO, M. C. M. Pastagens no Ecosistema Cerrados: Evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: 42^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia – A produção animal e o foco no agronegócio, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiás: Universidade Federal de Goiás, 2005. p. 56-84.

53. MAPA – Instituto Nacional de Meteorologia: 10º Distrito de Meteorologia de Goiânia – GO/TO. **Precipitação, total mensal**. Estação – 83464 –Jataí – GO. 2005.
54. MEAGHER, L. P.; MILES, C. O.; FAGLIARI, J. J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 38, n. 4, p. 271-274, 1996.
55. MILES, C. O.; MUNDAY, S. C.; HOLLAND, P. T.; SMITH, B. L.; EMBLING, P. P.; WILKINS, A. L. Identification of a saponin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 39, p. 150-152, 1991.
56. MORRIS, C. A.; TOWERS, N. R.; HOHENBOKEN, W. D.; MAQBOOL, N.; SMITH, B. L.; PHUA, S. H. Inheritance of resistance to facial eczema: a review of research findings from sheep and cattle in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 52, n. 5, p. 205-215, 2004.
57. MORTIMER, P. H.; MENNA, M. E.; M. E.; WHITE, E. P. Pithomycotoxicosis. "Facial eczema" in cattle. In: WYLLIE, T. D.; MOREHOUSE, L. G. (Ed.) **Micotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedic Handbook**, New York: Marcel Dekker. 1978, v. 2, p. 63-72.
58. MUNDAY, S. C.; WILKINS, A. L.; MILES, C. O.; HOLLAND, P. T. Isolation and structure elucidation of dichotomin, a furostanol saponin implicated in hepatogenous photosensitization of sheep grazing *Panicum dichotomiflorum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 41, p. 267-271, 1993.
59. NOBRE, D.; ANDRADE, S. O. Relação entre fotossensibilização em bovinos jovens e a gramínea *Brachiaria decumbens* Stapf. **Biológico**, São Paulo, v. 42, n. 11/12, p. 249-258, 1976.
60. OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, n. 967, p. 147-162, 2002.
61. OLIVEIRA, J. M. C. L. Diagnóstico da patologia hepato-biliar no cão. **Veterinary Technic**, v. 7, p. 48-54, 1997.
62. PEARSON, E. G. Moléstias do sistema hepatobiliar. In: SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. 1ª ed. Brasileira. São Paulo: Manole, 1993. v. 1, cap. 31, p. 839-872.

63. RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**, 9 ed. Sydney: W. B. Saunders. 2000. 1877 p.
64. REIS, R. A.; RODRIGUES, L. R. A.; PEREIRA, J. R. A. A suplementação como estratégia de manejo da pastagem. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. (Eds.). **Produção de bovinos a pasto**. Piracicaba: FEALQ, p.123-150, 1999.
65. REIS, R. A.; FREITAS, D.; FERNANDES, L. O.; FREGADOLLI, F. L. Suplementação como estratégia para otimizar a utilização das pastagens. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E LEITE, 5., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiás: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2003. p.85-120.
66. RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises Estatísticas no SAEG**. Viçosa – UFV, 2001, 301 p.
67. RODRIGUES, A. A. Estratégias de alimentação de bovinos em crescimento na época da seca. In: ESTEVES, S. N.; BARBOSA, P. F.; BARBOSA, R. T. (Ed.) **Intensificação da bovinocultura de corte: estratégias de alimentação e terminação**. São Carlos: EMBRAPA-CPPSE, 1997. p.24-43. (EMBRAPA-CPPSE. Documentos, 27).
68. SALAM ABDULLAH, A. LAJIS, N. H.; BREMNER, J. B.; DAVIES, N. W.; MUSTAPHA, W.; RAJION, M. A. Hepatotoxic constituents in the rumen of *Brachiaria decumbens* intoxicated sheep. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 34, n. 2, p. 154-155, 1992.
69. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.
70. SHAO, Y. U.; POOBRASERT, O.; KENNELLY, E. J.; CHIN, C. K.; H. O. C. T.; HUANG, M. T.; GARRISON, S. A.; CORDELL G. A. Steroidal saponins from *Asparagus officinalis* and their cytotoxic activity. **Planta Medica**, New York, v. 63, n. 3, p. 258 – 262, 1997.
71. SMITH, B. P. Alterações nas funções digestiva e hepática. In: SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993. v. 1, cap. 7, p. 119-146.
72. SMITH, B. L.; EMBLING, P. P. Facial eczema in goats: the toxicity of sporidesmin in goats and its pathology. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 39, p. 18-22, 1991.
73. SMITH, B. L.; MILES, C. O. A letter to the editor: a role for *Brachiaria decumbens* in heotogenous photosensitization of ruminants? **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 35, n. 3, 1993.

74. SMITH, B. L.; O'HARA, P. J. O. Bovine photosensitization in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 26, n. 1/2, p. 2-5, 1991.
75. TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 310 p.
76. TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia: a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: INPA, 1979. 95 p.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os objetivos estabelecidos para este trabalho, as considerações finais serão relacionadas a seguir:

1. São necessários estudos por período de tempo mais prolongado com cultivares de *B. brizantha* e *B. decumbens*, a fim de verificar a variação das concentrações de saponinas nas diferentes fases do ciclo de vida dessas plantas e sua sazonalidade;
2. A saponina protodioscina está envolvida no desencadeamento de sinais clínicos de fotossensibilização hepatógena, em ovinos;
3. São necessários estudos de casos clínicos de fotossensibilização hepatógena em ruminantes, mantidos em pastagens de *Brachiaria*, efetuando-se a quantificação da saponina nas pastagens, contagem de esporos do *P. chartarum* presentes nas mesmas, avaliação macro e microscópica de fragmentos de fígado e análise epidemiológica detalhada, para a determinação de outros fatores (como fertilidade do solo, ocorrência de queimadas e diferimento de pastagens) que possam estar envolvidos na gênese dessa enfermidade;
4. São necessárias mais pesquisas, especialmente a reprodução experimental da intoxicação acompanhada da dosagem da saponina e a determinação dos níveis tóxicos para ruminantes, além do acompanhamento de casos clínicos da enfermidade;
5. É preciso avaliar a capacidade de produção de esporidesmina pelas cepas brasileiras de *P. chartarum*, bem como realizar o isolamento e quantificação da micotoxina;
6. Muitos casos clínicos de fotossensibilização, não chegam ao conhecimento dos laboratórios de diagnóstico, porque a manifestação das lesões de pele é bastante conhecida dos campeiros, dos fazendeiros e dos clínicos veterinários. Assim, a ocorrência da enfermidade é subestimada. Suspeita-se que a fotossensibilização cause consideráveis perdas econômicas tais

como o retardo no desenvolvimento, a diminuição do ganho de peso, a queda da produção de leite, abortos, seqüelas (cicatrizes que depreciam o couro, deformações, cegueira) e mortalidade de animais. Assim, mediante a importância econômica da enfermidade faz-se necessário o controle e profilaxia da enfermidade em animais de produção, já que as espécies de *Brachiaria* ainda ocupam a maior área de pastagens cultivadas na região dos Cerrados brasileiros;

ANEXOS

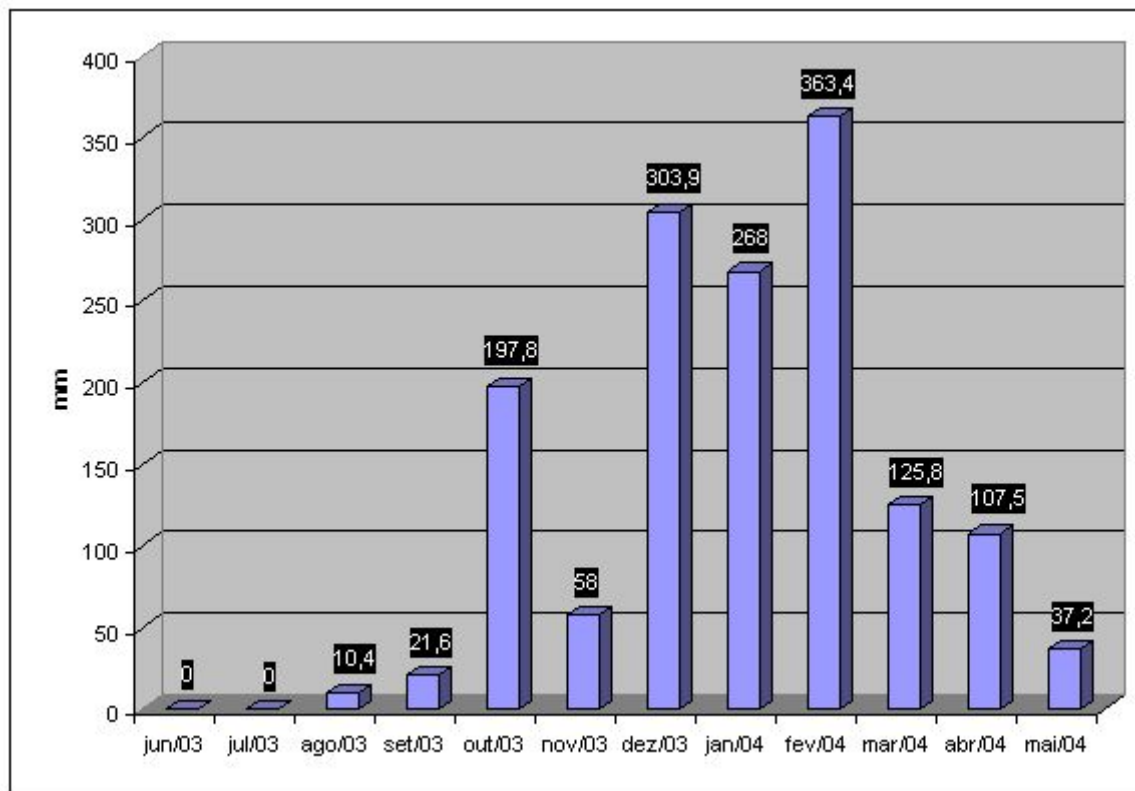


FIGURA 1 – Precipitação pluviométrica mensal do município de Jataí, no período de junho de 2003 a maio de 2004

Fonte: MAPA – Instituto Nacional de Meteorologia, 2005. 10º Distrito de Meteorologia de Goiânia GO/TO

TABELA 1 – Média, desvio padrão (DP), mediana, moda e coeficiente de variação (CV) do peso dos bovinos em todas as colheitas realizadas durante o período experimental

	Colheita 1	Colheita 2	Colheita 3	Colheita 4	Colheita 5	Colheita 6
Média	233,66	231,78	236,36	272,83	303,85	326,18
DP	83,39	76,87	90,62	69,13	66,27	76,55
Mediana	220,00	224,00	219,00	278,00	317,00	321,00
Moda	141,00	158,00	158,00	202,00	326,00	268,00
CV	35,69	33,17	38,34	25,34	21,81	23,47

TABELA 2 – Média, desvio padrão (DP), mediana, moda e coeficiente de variação (CV), das atividades séricas das enzimas GGT e AST e de bilirrubina, dos bovinos acompanhados durante o período experimental, na Colheita 1

Animal	GGT (U/l)	AST (U/l)	Bilirrubina		
			Direta	Indireta	Total
Média	16,11	61,73	0,13	0,22	0,35
DP	5,61	18,36	0,06	0,12	0,14
Mediana	15,90	57,60	0,15	0,20	0,35
Moda	13,70	53,20	0,10	0,20	0,30
CV	34,85	29,74	45,02	54,28	40,32

TABELA 3 – Média, desvio padrão (DP), mediana, moda e coeficiente de variação (CV), das atividades séricas das enzimas GGT e AST e de bilirrubina, dos bovinos acompanhados durante o período experimental, na Colheita 2

	GGT (U/l)	AST (U/l)	Bilirrubina		
			Direta	Indireta	Total
Média	16,26	56,07	0,12	0,21	0,33
DP	3,86	14,96	0,05	0,08	0,09
Mediana	15,90	53,60	0,10	0,20	0,35
Moda	14,80	47,10	0,10	0,20	0,35
CV	23,74	26,68	40,11	38,53	26,75

TABELA 4 – Média, desvio padrão (DP), mediana, moda e coeficiente de variação (CV), das atividades séricas das enzimas GGT e AST e de bilirrubina, dos bovinos acompanhados durante o período experimental, na Colheita 3

	GGT (U/l)	AST (U/l)	Bilirrubina		
			Direta	Indireta	Total
Média	16,01	75,48	0,14	0,20	0,34
DP	3,63	18,81	0,04	0,07	0,09
Mediana	15,90	73,30	0,15	0,20	0,35
Moda	15,90	56,70	0,15	0,20	0,35
CV	22,66	24,92	30,85	34,80	25,70

TABELA 5 – Média, desvio padrão (DP), mediana, moda e coeficiente de variação (CV), das atividades séricas das enzimas GGT e AST e de bilirrubina, dos bovinos acompanhados durante o período experimental, na Colheita 4

Animal	GGT (U/l)	AST (U/l)	Bilirrubina		
			Direta	Indireta	Total
Média	17,20	66,28	0,14	0,15	0,29
DP	3,69	14,21	0,04	0,08	0,09
Mediana	16,90	64,60	0,15	0,15	0,30
Moda	14,80	57,60	0,10	0,10	0,25
CV	21,48	21,44	31,91	48,95	31,13

TABELA 6 – Média, desvio padrão (DP), mediana, moda e coeficiente de variação (CV), das atividades séricas das enzimas GGT e AST e de bilirrubina, dos bovinos acompanhados durante o período experimental, na Colheita 5

	GGT (U/l)	AST (U/l)	Bilirrubina		
			Direta	Indireta	Total
Média	15,74	67,98	0,13	0,18	0,31
DP	3,50	13,91	0,04	0,09	0,10
Mediana	14,80	65,40	0,15	0,15	0,30
Moda	13,70	64,60	0,10	0,10	0,25
CV	22,23	20,47	30,40	53,09	33,61

TABELA 7 – Média, desvio padrão (DP), mediana, moda e coeficiente de variação (CV), das atividades séricas das enzimas GGT e AST e de bilirrubina, dos bovinos acompanhados durante o período experimental, na Colheita 6

	GGT (U/l)	AST (U/l)	Bilirrubina		
			Direta	Indireta	Total
Média	14,85	62,32	0,12	0,20	0,32
DP	3,38	13,09	0,04	0,08	0,09
Mediana	13,70	59,75	0,10	0,20	0,30
Moda	13,70	55,00	0,10	0,20	0,30
CV	22,73	21,00	33,95	40,23	29,30

TABELA 8 - Quantidade de esporos do fungo *P. chartarum* nas 10 fazendas acompanhadas durante o período experimental, na região oeste de Goiás no período de julho de 2003 a maio de 2004

Colheita	Fazenda										Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Jul/03	20.000	20.000	5.000	20.000		10.000	0	0	40.000	0	12.778
Set/03	5.000	5.000	5.000	25.000	0	10.000	0	0	28.000	5.000	8.300
Mai/04	0	0	8.000	5.000	5.000	0	0	20.000	5.000	5.000	4.800
Nov/03	5.000	2.500	3.000	2.500	0	5.000	5.000	20.000	20.000	2.500	6.550
Jan/04	5.000	5.000	10.000	0	0	0	0	0	0	15.000	3.500
Mar/04	0	0	2.500	25.000	10.000	2.500	5.000	0	10.000	0	5.500
Média	5.833	5.417	5.583	12.917	3.000	4.583	1.667	6.667	17.167	4.583	

TABELA 9 - Teores de saponinas totais (%) em cada colheita nas 10 fazendas, na região sudoeste de Goiás, no período de julho de 2003 a maio de 2004

FAZENDA	Jul/03	Set/03	Nov/03	Jan/04	Mar/04	Mai/04	MÉDIA
1	0,746	0,225	1,525	1,526	0,942	0,657	0,937
2	0,713	0,799	0,0	0,81	1,61	1,143	1,015
3	0,165	0,385	1,12	0,518	2,459	1,525	1,029
4	0,044	0,654	0,496	0,451	1,299	1,027	0,662
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	0,455	0,102	1,769	1,446	1,978	1,606	1,226
7	0,343	0,133	0,763	1,946	2,493	1,276	1,159
8	0,0	0,0	0,0	0,693	0,0	1,406	1,050
9	0,372	0,628	1,209	1,46	2,752	1,284	1,284
10	0,661	0,873	1,486	0,815	1,718	1,793	1,224
MÉDIA	0,437	0,475	1,195	1,074	1,906	1,302	

QUADRO 1 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental na fazenda 1

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>B. decumbens</i>	superpastejada	20.000	0,746
Set/03	<i>B. decumbens</i>	muito seca e superpastejada	5.000	0,225
Nov/03	<i>B. decumbens</i>	muito seca e superpastejada	5.000	1,525
Jan/04	<i>B. decumbens</i>	verde e superpastejada	5.000	1,526
Mar/04	<i>B. decumbens</i> e <i>B. humidicola</i>	suja, superpastejada, verde, com sementes e queda	0	0,942
Mai/04	<i>B. decumbens</i> e <i>B. humidicola</i>	com sementes e queda	0	0,657

QUADRO 2 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental na fazenda 2

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	superpastejada e verde	20.000	0,713
Set/03	<i>B. decumbens</i> e Capim do brejo	muito seca e superpastejada	5.000	0,799
Nov/03	<i>B. decumbens</i> e Capim do brejo	muito seca e superpastejada	2.500	0,081
Jan/04	<i>B. decumbens</i>	verde, superpastejada, muita macega, muito suja	5.000	0,81
Mar/04	<i>B. decumbens</i>	suja, superpastejada, verde, com sementes e queda	0	1,61
Mai/04	<i>B. decumbens</i>	com sementes mofadas e queda	0	1,143

QUADRO 3 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental fazenda 3

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	superpastejada, com plantas invasoras	5.000	0,165
Set/03	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	muito seca e superpastejada	5.000	0,385
Nov/03	Tanzânia e <i>B. brizantha</i>	verde com sementes	3.000	1,12
Jan/04	<i>B. humidicola</i> , <i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	verde, superpastejada, muito suja	10.000	0,518
Mar/04	<i>B. brizantha</i> e <i>B. humidicola</i>	exuberante, com sementes	2.500	2,459
Mai/04	<i>Hyparrhenia</i> sp; <i>B. brizantha</i> ; <i>B. decumbens</i> ; <i>B. humidicola</i>	suja, superpastejada, verde com semente e queda	8.000	1,525

QUADRO 4 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental na fazenda 4

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>B. decumbens</i>	Superpastejada	20.000	0,044
Set/03	<i>B. decumbens</i>	muito seca e superpastejada	25.000	0,654
Nov/03	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	Bd muito seca e superpastejada, muita cigarrinha; Bb verde e superpastejada	2.500	0,496
Jan/04	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	verde em crescimento	0	0,451
Mar/04	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	Superpastejada, verde, com sementes e queda	25.000	1,299
Mai/04	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	Superpastejada, verde, com sementes e queda	5.000	1,027

QUADRO 5 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental na fazenda 5

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>Andropogon</i> sp	superpastejada, com plantas invasoras	-----	0
Set/03	<i>Andropogon</i> sp e <i>B. humidicola</i>	Superpastejada e seca	0	0
Nov/03	<i>Andropogon</i> sp e <i>B. humidicola</i>	An superpastejada e verde; Bh exuberante e verde	0	0
Jan/04	<i>B. humidicola</i>	verde com bastante massa em alguns locais	0	0
Mar/04	<i>B. humidicola</i>	Superpastejada, verde com queda	10.000	0
Mai/04	<i>B. humidicola</i>	Superpastejada e verde	5.000	0

QUADRO 6 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental na fazenda 6

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>B. decumbens</i>	superpastejada com invasoras	10.000	0,455
Set/03	<i>B. decumbens</i>	muito seca e superpastejada	10.000	0,102
Nov/03	<i>B. decumbens</i>	muito seca e superpastejada	5.000	1,769
Jan/04	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	verde em crescimento	0	1,446
Mar/04	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	Superpastejada, verde, c/ sementes e queda	2.500	1,978
Mai/04	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i>	Superpastejada, verde, com sementes e sementes mofadas	0	1,606

QUADRO 7 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental na fazenda 7

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	superpastejada, suja	0	0,343
Set/03	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	muito seca e superpastejada	0	0,133
Nov/03	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	muito seca e superpastejada	5.000	0,763
Jan/04	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	verde e superpastejada	0	1,946
Mar/04	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	verde, superpastejada, com sementes	5.000	2,493
Mai/04	<i>B. brizantha</i>	verde, superpastejada, com sementes	0	1,276

QUADRO 8 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental na fazenda 8

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>B. humidicola</i>	superpastejada, com invasoras	0	0
Set/03	<i>B. humidicola</i>	Superpastejada, pouco seca	0	0
Nov/03	<i>Andropogon</i> sp	Superpastejada, pouco seca	20.000	0
Jan/04	<i>Andropogon</i> sp <i>B. decumbens</i> <i>B. humidicola</i>	Verde	0	0,693
Mar/04	<i>B. humidicola</i>	Superpastejada, verde, queda de sementes	0	0
Mai/04	<i>B. decumbens</i>	Superpastejada, muito suja, queda de sementes	20.000	1,406

QUADRO 9 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental na fazenda 9

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>B. decumbens</i> e <i>Andropogon sp</i>	superpastejada, com folhas secas, invasoras	40.000	0,372
Set/03	<i>B. decumbens</i> , <i>Andropogon sp</i> e <i>B. brizantha</i>	Bd muito seca e superpastejada Bb superpastejada e verde	28.000	0,628
Nov/03	<i>B. decumbens</i> e <i>Andropogon sp</i>	baixa, verde em crescimento	20.000	1,209
Jan/04	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	Bb superpastejada e verde e Bd superpastejada, folhas secas, com sementes	0	1,46
Mar/04	<i>B. humidicola</i> e <i>B. brizantha</i>	rapada, verde e com sementes	10.000	2,752
Mai/04	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	superpastejada, verde, com folhas secas, com sementes	5.000	1,284

QUADRO 10 - Tipo de pastagem, estado da pastagem, quantidade de esporos por grama de pasto e porcentagem de saponina observada durante o período experimental na fazenda 10

Colheita	Pastagem	Estado da pastagem	Quantidade de esporos por grama de pasto	% de saponina
Jul/03	<i>B. brizantha</i>	superpastejada e seca	-----	0,661
Set/03	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	muito seca e superpastejada	5.000	0,873
Nov/03	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	bastante massa verde mas com muitas folhas secas	2.500	1,486
Jan/04	<i>B. brizantha</i> e <i>B. decumbens</i>	verde, com sementes e folhas secas no solo	15.000	0,815
Mar/04	<i>B. brizantha</i>	verde, alta, com sementes e folhas secas no solo	0	1,718
Mai/04	<i>B. brizantha</i>	verde, alta, com sementes	5.000	1,793