

DAIANA LOPES LELIS

**FOTOSENSIBILIZAÇÃO EM OVINOS SUBMETIDOS AO PASTEJO EM
Urochloa decumbens EM MONOCULTIVO OU SISTEMA SILVIPASTORIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Lelis, Daiana Lopes, 1991-

L541f Fotossensibilização em ovinos submetidos ao pastejo em
2017 *Urochloa decumbens* em monocultivo ou sistema silvipastoril /
Daiana Lopes Lelis. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 39 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fernanda Helena Martins Chizzotti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 35-39.

1. Ovinos. 2. Capim-braquiária. 3. Fotossensibilização
biológica. 4. Radiação solar - Efeito fisiológico. 5. Saponinas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.30845

DAIANA LOPES LELIS

**FOTOSENSIBILIZAÇÃO EM OVINOS SUBMETIDOS AO PASTEJO EM
Urochloa decumbens EM MONOCULTIVO OU SISTEMA SILVIPASTORIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de junho de 2017.



Luciana Navajas Rennó
(Coorientadora)



Mario Luiz Chizzotti
(Coorientador)



João Carlos Pereira da Silva



Fernanda Helena Martins Chizzotti
(Orientadora)

A Deus;

Aos meus amados pais, Edézio e Maria do Carmo;

As minhas queridas irmãs, Karina e Poliana;

Ao meu namorado, Lucas;

As minhas avós Tereza e Cormaria (*in memorian*) e avôs, Geraldo (*in memorian*) e Antônio (*in memorian*).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por abençoar meu caminho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, por minha formação acadêmica e pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Fernanda Helena Martins Chizzotti pela orientação e por ter acreditado e permitido a realização desse trabalho, pela confiança, apoio e ensinamentos.

Ao professor Mario Luiz Chizzotti, por todo auxílio e disposição durante todo o trabalho.

À professora Luciana Navajas Rennó, pela disponibilidade em ajudar, pelos conhecimentos, sugestões e dedicação desde o início.

Ao professor Cláudio José Borela Espeschit, por disponibilizar a matéria prima necessária para a realização desse trabalho, por todo incentivo e prontidão de sempre.

Ao professor Dilermando Miranda da Fonseca, por ter disponibilizado a área para realização do trabalho e pelas oportunidades concedidas.

Ao professor João Carlos Pereira da Silva, por toda compreensão, paciência, esclarecimentos e participação na banca examinadora.

Ao doutorando em veterinária, Carlos Eduardo, pela disposição e ajuda.

Aos estagiários Filipe Bueno e Luiz Gustavo por toda ajuda e convivência.

Aos colegas de profissão, Anderson Eugênio, Cássia Soares e Marina Lima pela ajuda, experiências partilhadas e amizade.

Aos amigos de laboratório, em especial, Camila Andressa, Maurício Miguel e Gutierrez Freitas, pela ajuda e disposição.

Ao Camilo Elber e ao Núcleo de Análise de Biomoléculas, pelo suporte oferecido.

Aos funcionários da Zootecnia Neco, Lorival, Marcelino e Nataniel pela contribuição.

Aos funcionários da veterinária, Carlos e Adão pelo trabalho e prontidão.

Ao funcionário do Setor Agrostológico Sr. Divino, pela ajuda e bondade.

Ao amigo Wiliam Santos e ao meu primo Welliton Cândido, pela boa vontade em ajudar.

Ao meu pai Edézio José e a minha mãe Maria do Carmo, pelo amor, dedicação e perseverança em meus sonhos.

À minha irmã Karina, que colocou a mão na massa comigo do início ao fim do trabalho, além de toda amizade e companheirismo.

À minha irmã Poliana, que mesmo de longe se fez presente, pelas orações, incentivos e cumplicidade.

Ao meu namorado Lucas, por ter sido essencial na realização desse trabalho, pelo amor e paciência.

À minha avó Tereza e avó Maria (*in memorian*) pelo amor e cuidado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1. Área experimental	6
2.2. Tratamentos e delineamento experimental	7
2.3. Dados climáticos	7
2.4. Preparo e manejo da área experimental	8
2.5. Avaliações na planta forrageira	9
2.6. Contagem de esporos de <i>Pythomices chartarum</i>	10
2.7. Determinação de saponina protodioscina	10
2.8. Avaliações nos animais	11
2.8.1. Consumo e digestibilidade	11
2.8.2. Avaliações histopatológicas	12
2.8.3. Avaliações bioquímicas	12
2.9. Abate dos animais	13
2.10. Análise estatística dos dados	13
3. RESULTADOS	14
3.1. Dados climáticos	14
3.2. Massa e composição morfológica da forragem	15
3.3. Avaliação da composição química da forragem	15
3.4. Avaliações nos animais	16
3.4.1. Avaliação clínica e alterações histopatológicas hepáticas dos animais	17
3.4.2. Análises bioquímicas	21
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

LELIS, Daiana Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2017. **Fotossensibilização em ovinos submetidos ao pastejo em *Urochloa decumbens* em monocultivo ou sistema silvipastoril.** Orientadora: Fernanda Helena Martins Chizzotti. Coorientadores: Luciana Navajas Rennó e Mario Luiz Chizzotti.

A *Urochloa decumbens* (sinonímia: *Brachiaria decumbens*) é uma gramínea que pode ser tóxica aos animais em pastejo, principalmente aos ovinos. A intoxicação é associada com a ingestão de um metabólito secundário das plantas, uma saponina esteroidal, a protodioscina. Uma vez metabolizadas no trato digestivo, as saponinas se associam com íons cálcio, formando sais insolúveis, que podem obstruir as vias biliares interferindo no metabolismo dos hepatócitos. Essas alterações hepáticas interferem na eliminação de um composto fotoativo derivado da clorofila, a filoeitrina, que acumula na corrente sanguínea e posteriormente nos tecidos da pele, e por meio da ação dos raios solares, gera intensa inflamação, caracterizando a fotossensibilização. Assim, o trabalho consistiu na avaliação da fotossensibilização em ovinos submetidos ao pastejo em *Urochloa decumbens* cv. Basilisk em sistema silvipastoril (capim-braquiária e eucalipto) ou em monocultivo do capim-braquiária (a pleno sol), durante 60 dias. Nossas hipóteses foram que a sombra proporcionada pelas árvores no sistema silvipastoril previne ou ameniza os sintomas clássicos de fotossensibilização em ovinos em pastejo e afeta a concentração da saponina protodioscina no capim-braquiária. Foram utilizados 20 ovinos mestiços (Dorper x Santa Inês) não adaptados ao pastejo de capim-braquiária, com idade média de quatro meses, distribuídos em um delineamento em blocos casualizados, com dois blocos e cinco animais por bloco, totalizando 10 repetições por tratamento. Foram avaliados a concentração de saponina protodioscina no capim-braquiária, o consumo de saponina, indicadores séricos bioquímicos, histopatologia hepática, bem como os sintomas clínicos apresentados pelos animais. A concentração média de saponina protodioscina encontrada no capim-braquiária foi de 1,37% e 0,98% na pastagem em monocultivo e em sistema silvipastoril respectivamente. Tanto os animais mantidos em sistema silvipastoril quanto os animais que permaneceram no monocultivo do capim-braquiária apresentaram sintomas clínicos, alterações no fígado, elevações das enzimas gama-glutamiltransferase (GGT) e da aspartato aminotransferase (AST) e aumento dos níveis séricos de bilirrubinas ao longo do período experimental. Embora o teor de saponina protodioscina na *U. decumbens* em sistema silvipastoril tenha sido menor do que no monocultivo, foi

suficiente para causar fotossensibilização secundária nos animais. O sombreamento natural proporcionado pelo sistema silvipastoril não previne ou ameniza os sintomas de fotossensibilização em ovinos jovens não adaptados ao pastejo em *Urochloa decumbens*.

ABSTRACT

LELIS, Daiana Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2017. **Photosensitization in sheep submitted to grazing in *Urochloa decumbens* in monoculture or silvopastoral system.** Adviser: Fernanda Helena Martins Chizzotti. Co-advisers: Luciana Navajas Renno and Mario Luiz Chizzotti.

The *Urochloa decumbens* (synonym: *Brachiaria decumbens*) is a grass that can be toxic to grazing animals, especially to sheep. The intoxication is associated with the ingestion of a plant secondary metabolite, a steroidal saponin, protodioscin. Once metabolized in the digestive tract, the saponins associate with calcium ions, forming insoluble salts, which can obstruct the bile ducts interfering in the metabolism of hepatocytes. These hepatic alterations interfere in the elimination of a photoactive compound derived from chlorophyll, phylloerythrin, which accumulates in the bloodstream and subsequently in the skin tissues, and through the action of the sun's rays generates intense inflammation, characterizing photosensitization. Thus, the work consisted of the evaluation of photosensitization in sheep submitted to grazing in *Urochloa decumbens* cv. Basilisk in a silvopastoral system (signal grass and eucalyptus) or monoculture of the signal grass (full sun) for 60 days. We hypothesized that the shade provided by trees in the silvopastoral system prevents or alleviates the classic symptoms of photosensitization in grazing sheep and affects the concentration of the saponin protodioscin in signal grass. Twenty crossbred sheep (Dorper x Santa Ines) not adapted to grazing of signal grass were used, with a mean age of four months, distributed in a randomized block design, with two blocks and five animals per block, totaling 10 replicates per treatment. The concentration of protodioscin saponin in signal grass, protodioscin intake, serum biochemical indicators, liver histopathology, as well as the clinical symptoms presented by the animals were evaluated. The average concentration of protodioscin saponin found in signal grass was 1.37% and 0.98% full sun and silvopastoral systems, respectively. Both the animals kept in the silvopastoral system and the animals that remained in the monoculture of the signal grass presented clinical symptoms, alterations in the liver, elevations of the gamma-glutamyltransferase (GGT) and aspartate aminotransferase (AST) enzymes and increased serum bilirubin levels throughout the experimental period. Although the concentration of protodioscin saponin in *U. decumbens* in the silvopastoral system was lower than in full sun treatment, it was sufficient to cause secondary photosensitization in the animals. The natural shading

provided by the silvopastoral system does not prevent or attenuates the symptoms of photosensitization in young sheep not adapted to grazing on *Urochloa decumbens*.

1. INTRODUÇÃO

As gramíneas do gênero *Urochloa ssp.* são amplamente utilizadas para alimentação animal em muitas regiões do mundo e predominam nas áreas de pastagens cultivadas do Brasil, principalmente as espécies *Urochloa decumbens* e *Urochloa brizantha*, constituindo hoje a base da alimentação de relevante fração do rebanho brasileiro. Isso se deve ao fato dessas gramíneas serem altamente adaptadas ao clima tropical, apresentarem alta produção de massa de forragem ao longo do ano, bom valor nutritivo e serem adaptadas a solos de baixa fertilidade natural. Porém, alguns compostos presentes nessas gramíneas podem ser tóxicos aos animais em pastejo e sua utilização tem sido um obstáculo à criação de ruminantes, podendo provocar severas perdas nos rebanhos, devido à suscetibilidade desses à intoxicação.

As ocorrências de intoxicação e morte de animais ruminantes são observadas desde a introdução de *Urochloa spp.* no país (TOKARNIA et al., 2000), sendo os ovinos segundo Riet-Correa et al. (2011), a espécie mais suscetível a intoxicação. Dentre as gramíneas forrageiras, a maioria dos relatos de intoxicação foi verificada em pastagens de *Urochloa decumbens* (capim-braquiária), sendo, portanto, considerada a espécie forrageira de maior capacidade de intoxicação aos animais (BRUM et al., 2007).

O princípio tóxico do capim-braquiária foi atribuído primeiramente à presença de um fungo, o *Pythomices chartarum*, o qual, através da produção da toxina esporidesmina era correlacionado com a intoxicação animal. Porém, pesquisadores constataram que na maioria dos casos de fotossensibilização dos animais em pastejo com o capim-braquiária, a quantidade de esporos encontrados nas áreas eram inexistentes ou insuficientes para produção de toxinas com potencial para intoxicação animal (ALBERNAZ et al., 2010; MOREIRA et al., 2009; MUSTAFA et al., 2012 e PORTO et al., 2013) e além dessa baixa densidade de esporos do fungo, apenas uma pequena porcentagem das colônias desse fungo isoladas de pastos no Brasil, é capaz de produzir a toxina esporidesmina. Frente a essa realidade, a intoxicação por *Urochloa* passou a ser associada com a ingestão de metabólitos secundários da própria planta, denominadas saponinas esteroidais (RIET-CORREA et al., 2011; MUSTAFA et al., 2012).

As saponinas são glicosídeos formados por uma porção lipofílica denominada aglicona ligada glicosidicamente a uma ou mais cadeias de açúcares e apresentam função principalmente relacionadas ao sistema de defesa da planta (FAIZAL & GEELEN, 2013), mas, para o animal, agem como fatores anti-nutricionais. Embora

existam diferentes tipos de saponinas esteroidais em *Urochloa* spp., a protodioscina tem sido a principal saponina esteroidal usada como indicador e associada à intoxicação em animais sob pastejo em capim-braquiária (PORTO et al., 2013).

As saponinas, uma vez metabolizadas no trato digestivo, se associam aos íons cálcio, formando sais insolúveis, obstruindo as vias biliares e interferindo no metabolismo dos hepatócitos. Essas lesões hepáticas interferem na excreção da filioeritrina, que é um pigmento formado a partir do metabolismo da clorofila, onde, em condições normais é eliminada pelo fígado através da bile. Porém, com a disfunção hepática, o processo de excreção da filioeritrina é prejudicado, e seus níveis circulantes aumentam no organismo, podendo alcançar os tecidos da pele, que por ser fotoativa, produz reação local por meio da ação dos raios solares, resultando na formação de radicais livres de oxigênio no citosol da célula, que causa ruptura de lisossomos, degranulação de mastócitos cutâneos, gerando intensa inflamação, caracterizando a fotossensibilização secundária ou hepatógena (SANTOS et al., 2008). Segundo Quin et al. (2014), a fotossensibilização também pode ser classificada como primária e ocorre quando um composto fotodinâmico é ingerido ou absorvido pela pele agindo diretamente como agente fotodinâmico, desencadeando as lesões inflamatórias de pele características da fotossensibilização, embora é menos impactante quando comparada a fotossensibilização secundária ou hepatógena.

Os principais sintomas clínicos geralmente observados em ovinos intoxicados pelo capim-braquiária são edemas de face e orelhas, ulcerações na pele, fotofobia, icterícia, apatia, anorexia, alopecia e ataxia (CASTRO et al., 2011; RIET-CORREA et al., 2011). Contudo, existem casos mais agudos descritos na literatura onde os animais não apresentam os sinais clínicos de fotossensibilização, porém podem vir a óbito rapidamente devido a desordens metabólicas que se formam de maneira inaparente, provocada por alterações hepáticas (PORTO et al., 2013).

A concentração de protodioscina no capim-braquiária é bastante variável, provavelmente afetada por vários fatores como luminosidade, temperatura, umidade, idade da planta (LOSANO et al., 2017) e por fatores bióticos, incluindo patógenos e herbivoria. Contudo, já se sabe que a ocorrência de casos de intoxicação pode ser observada em diversos períodos do ano (estações seca e chuvosa) e nos diversos estádios de desenvolvimento da planta (crescimento, rebrotação e florescimento), com concentrações de protodioscina variando de 0,03% a 1,09% (MOREIRA et al., 2009), 0,3% a 2,56% (MUSTAFA et al., 2012), sendo que na maioria dos estudos, as maiores concentrações são observadas no período das águas, e quando a planta está em estágio

de rebrotação, conforme concluído por Low (2015) e Mustafa et al. (2012). Nesse contexto, é possível que a concentração de protodioscina no capim-braquiária no sistema silvipastoril seja alterada devido ao sombreamento das árvores, uma vez que a capacidade fotossintética da planta é afetada, podendo alterar a síntese de metabólitos secundários e conseqüentemente alterando sua toxicidade. No entanto, o efeito da luz natural sobre a biossíntese de saponinas esteroidais permanece pouco compreendido.

Sistemas silvipastoris podem ser definidos como combinação de espécies forrageiras, arbóreas e animais em pastejo em uma mesma área, manejados de forma integrada. Nestes sistemas, a planta forrageira cresce em ambiente com restrição de radiação solar, que será mais ou menos impactante dependendo do nível de sombreamento do sistema. Tal condição, pode alterar a capacidade das plantas forrageiras no sub-bosque de produzir compostos secundários, incluindo as saponinas protodioscinas, alterando sua capacidade de intoxicação. Além disso, nos sistemas silvipastoris os sintomas clínicos da fotossensibilização podem ser atenuados com o acesso à sombra; já que, uma vez acumulada na corrente sanguínea e na pele, a filoteritina é ativada pela radiação solar, resultando em danos às camadas da derme, porque as células da pele tornam-se altamente reativas na presença de radiação visível ou UV (QUINN et al., 2014), levando tipicamente os animais fotossensibilizados à procura de áreas sombreadas para se abrigar ou pastejar (ALBERNAZ et al., 2010; LOW, 2015). Assim, embora a fotossensibilização causada pelo capim-braquiária seja secundária (devido a danos no fígado) e o sombreamento natural proporcionado pelo sistema silvipastoril não seja totalmente protetor, animais expostos à radiação solar direta podem apresentar sintomas clínicos agravados devido ao maior fluxo de fótons de maior energia com comprimentos de onda mais curtos (entre 400 e 500 nm) no espectro visível, além dos raios UV. Além disso, este é o primeiro trabalho a relatar o efeito do sombreamento natural na concentração de saponina protodioscina em capim-braquiária no contexto dos animais sob pastejo em sistema silvipastoril.

Portanto, é evidente que alterações no microclima, provocam modificações tanto nas plantas quanto nos animais. Contudo, ainda são necessárias mais pesquisas envolvendo alterações no ambiente com a resistência e suscetibilidade dos animais a intoxicação. A suscetibilidade à intoxicação pelo capim-braquiária também tem relação com a categoria animal inserida. Animais jovens são mais suscetíveis do que os adultos, e os sinais clínicos mais agudos e severos ocorrem em animais jovens que nunca tiveram contato prévio com a pastagem (MUSTAFA et al., 2012). Segundo os mesmos autores, os pesos dos animais influenciaram a suscetibilidade à intoxicação, onde, os

animais mais leves foram os mais suscetíveis à doença com sinais clínicos mais graves, concluindo que o peso deva ser um fator a ser considerado na exploração de ovinos em pastagens formadas por plantas do gênero *Urochloa*. Animais considerados resistentes podem assim ser devido à capacidade de degradar compostos que podem vir a ser tóxicos embora ainda não são totalmente conhecidos quais mecanismos estão diretamente envolvidos nessa detoxificação. Faltam estudos para verificação se é uma característica herdada pela progênie ou adquirida por uma população. Segundo Pupin et al. (2016), a capacidade de resistência dos animais está vinculada à hereditariedade entre populações adaptadas ao pastejo para a progênie ainda não adaptada, denominada resistência genética. Para Castro et al. (2018), a resistência à intoxicação pode ser alcançada sob forma induzida, pela administração diária de doses não letais da planta, ou seja, adaptação ao pastejo de forma controlada e gradual, bem como por transfaunação de conteúdo ruminal de animais resistentes para animais susceptíveis. Um mecanismo envolvido nesses processos de detoxificação das saponinas citado por Gracindo (2014) está relacionado à metabolização pelo fígado, através do sistema citocromo P450, os quais são constituídos por enzimas com capacidade de oxidação e metabolização dessas substâncias.

Quanto ao diagnóstico dos casos de fotossensibilização hepatógena, em análises anátomo-histopatológicas de animais que foram em óbito pela intoxicação, é evidenciado hepatomegalia, coloração amarelada ou amarronzada do fígado, evidenciação do padrão lobular, tumefação e vacuolização difusas de hepatócitos, presença de cristais birrefringentes nos ductos biliares e a presença de macrófagos com citoplasma de aspecto espumoso (CASTRO et al., 2018; PORTO et al., 2013). Além disso, também são observadas alterações em outros parâmetros como, vesícula biliar distendida, ascite, rim e urina com coloração escurecida (ALBERNAZ et al., 2010). No caso de alterações no funcionamento dos rins, o diagnóstico pode ser realizado através da observação dos níveis séricos de uréia e creatinina, onde elevações destes, indicam má funcionalidade renal, pois, a uréia e a creatinina séricas são dependentes do índice de filtração glomerular.

Avaliações das atividades de algumas enzimas que agem no funcionamento do fígado, como a gama-glutamilttransferase (GGT) e da aspartato aminotransferase (AST), assim como, quantificação da concentração sérica de bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta tem sido bons padrões indicativos para predizer a saúde do fígado, auxiliando no diagnóstico da intoxicação, uma vez que alguns animais acometidos podem não apresentar os sintomas clássicos da fotossensibilização, sendo comum,

apresentarem elevações desses parâmetros (BADIEI et al., 2009; CASTRO et al., 2018; PORTO et al., 2013). Nesse sentido, o diagnóstico eficiente da intoxicação animal está vinculado aos sinais clínicos, patologia macroscópica e histológica e epidemiologia.

O tratamento dos ovinos intoxicados ainda é pouco conhecido e oneroso, por isso, a melhor alternativa é evitar à exposição de animais suscetíveis a intoxicação pelo capim-braquiária. Além disso, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas que visem identificação de condições que diminuam os compostos tóxicos da planta, assim como ambientes que minimizem as manifestações clínicas da intoxicação. É necessário conhecer os níveis da saponina protodioscina no capim-braquiária considerada tóxica às diferentes espécies e categorias animais e os fatores envolvidos na susceptibilidade ou resistência dos animais à intoxicação, sejam eles ambientais ou inerentes aos próprios animais, para que se possa delinear o manejo correto para adaptação desses ao pastejo em *Urochloa decumbens* de forma segura e produtiva.

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a ocorrência de fotossensibilização em ovinos submetidos ao pastejo em capim-braquiária, a pleno sol ou sistema silvipastoril, e quantificar o teor de saponina protodioscina na planta forrageira em ambos os sistemas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de oito de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP- UFV), com protocolo nº 068/2016.

2.1. Área experimental

O experimento foi conduzido no período de 22 de janeiro a 22 de março do ano de 2016, em uma área de aproximadamente 0,64 hectares de pastagem, pertencente à Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Forragicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa-MG, localizado a 20° 45' de latitude sul, 46°51' de longitude oeste e 689 m de altitude. O solo da área experimental é caracterizado como Latossolo Vermelho-Amarelo, de textura argilosa (EMBRAPA, 2006). O clima da região de Viçosa, de acordo com o sistema Köppen, é do tipo Cwa (clima tropical de altitude com inverno seco e verão quente), com precipitação anual em torno de 1.340 mm e umidade relativa do ar média de 80%.

A área experimental é formada por um sistema silvipastoril implantado desde 2010, composto pela associação de uma espécie arbórea, o eucalipto (*Eucalyptus urograndis*), que é um clone híbrido das espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, com uma espécie forrageira, representada pela *Urochloa decumbens* cv. Basilisk. O espaçamento entre as árvores é de quatro metros na linha de plantio e de 10 metros entre as linhas de plantio, com o arranjo de 10x4 m, plantadas seguindo declividade do terreno em curva de nível. Além do sistema silvipastoril, a área possui o monocultivo do capim-braquiária, caracterizando assim, dois sistemas de cultivos distintos.

Foram realizadas mensurações do sombreamento proporcionado pelas árvores e mensuração da radiação fotossinteticamente ativa durante o período experimental utilizando um analisador de dossel, AccuPAR PAR/LAI Ceptometer, modelo LP 80, marca Decagon Devices®. Foram tomadas 40 leituras abaixo do dossel das árvores por bloco, sendo 20 realizadas sob a linha de plantio e 20 na parte central da entrelinha. A mensuração do sombreamento foi calculada com base na radiação fotossinteticamente ativa (PAR): $[(PAR \text{ da pastagem a pleno sol} - PAR \text{ da pastagem sombreada}) \times 100 / PAR \text{ da pastagem a pleno sol}]$. O sombreamento médio proporcionado pelas árvores de

eucalipto foi de 50,5% durante o período experimental. A radiação fotossinteticamente ativa que chegava ao dossel das plantas forrageiras em monocultivo foi em média de 1446 fótons $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, enquanto que para as gramíneas em sistema silvipastoril foi de 709 fótons $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

2.2. Tratamentos e delineamento experimental

O trabalho consistiu em avaliar a ocorrência de fotossensibilização hepatógena em ovinos submetidos ao pastejo em *Urochloa decumbens* em dois sistemas de produção; em sistema silvipastoril, onde os animais tinham acesso à sombra das árvores e em monocultivo, onde os animais permaneciam em pastejo a pleno sol.

Devido à topografia acentuada da área experimental, essa foi dividida em dois blocos, sendo que cada bloco foi composto por quatro repetições dos tratamentos.

Foram utilizados 20 carneiros machos mestiços (Dorper x Santa Inês) não castrados, com idade média de quatro meses e peso corporal médio inicial de 23 kg ($\pm 2,63$ kg). Os animais eram provenientes de uma condição de confinamento, em que recebiam dieta a base de silagem de milho, concentrado e sal mineral, sem acesso a qualquer tipo de pastejo, portanto, sem contato prévio com o capim-braquiária. Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os sistemas, onde 10 foram alocados no monocultivo de capim-braquiária e 10 permaneceram na área sob sistema silvipastoril. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com cinco repetições por bloco, totalizando 10 animais por tratamento e 20 unidades experimentais.

Para as análises de composição morfológica, química e quantificação da saponina protodioscina no capim-braquiária, amostras de forragem foram coletadas a cada 28 dias, totalizando três cortes. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições dentro de cada bloco, sendo cada repetição a média dos três cortes avaliados.

2.3. Dados climáticos

Os dados de precipitação, temperatura mínima, média e máxima durante o período experimental foram obtidos na estação meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV, situada a cerca de 550 m da área experimental (Figura 1). Também foram feitas mensurações na própria área experimental dos parâmetros de temperatura máxima e mínima, temperatura de bulbo úmido, temperatura de bulbo seco, temperatura do globo negro e velocidade do ar, com utilização de equipamento medidor

de estresse térmico, modelo TGD-400 e termômetros de máxima e mínima, situados em três pontos representativos da área experimental. Um equipamento foi posicionado na área em monocultivo, ou seja, a pleno sol e os outros dois equipamentos foram instalados nos sub-bosques do sistema silvipastoril, sendo um medidor em cada bloco. Foram realizadas três mensurações diárias durante todo o período experimental, nos horários de 07h00min, 13h00min e 18h00min para caracterização climática diária dos dois sistemas de produção.

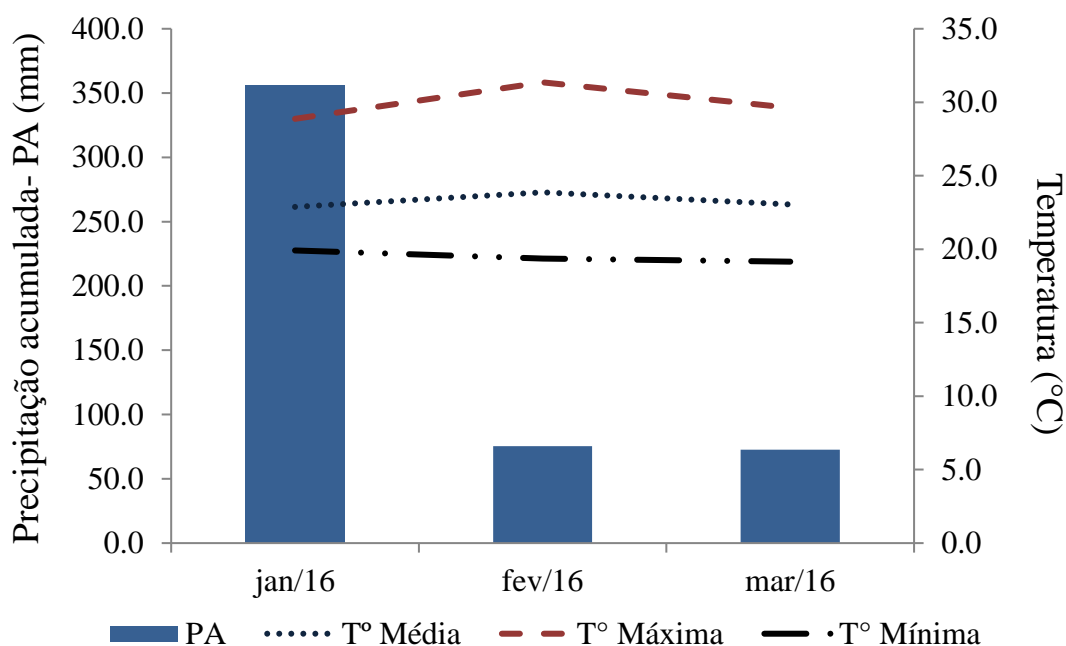


Figura 1 - Dados climáticos registrados durante o período experimental pela estação meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV.

2.4. Preparo e manejo da área experimental

Para implantação do experimento, a área foi roçada para homogeneização dos piquetes em dezembro de 2015 e na ocasião foram aplicados 50 kg ha^{-1} de NPK (20-10-20) para rebrotação da gramínea. Toda a área foi contornada com cerca de arame farpado e tela, para proteção dos carneiros e para divisão dos tratamentos. Abrigos foram construídos para que os carneiros pudessem se abrigarem durante a noite e se protegerem de chuva.

O método de pastejo adotado foi lotação contínua pelos ovinos, com altura média do capim-braquiária em torno de 25 cm ($\pm 10\%$). Para isso, foram feitas medições semanais da altura do pasto utilizando-se uma régua graduada em centímetros e as leituras realizadas no plano das folhas superiores em 40 pontos aleatórios por

tratamento. Animais reguladores foram utilizados quando necessários, para manutenção da altura do pasto dentro da meta almejada. Os animais receberam durante todo o período experimental suplementação mineral e água *ad libitum*.

2.5. Avaliações na planta forrageira

As determinações da massa de forragem, da proporção de folha, colmo e forragem senescente foram estimadas por meio de amostragens diretas (destrutivas) a cada 28 dias, totalizando três cortes ao longo do período experimental. Para isso, seis amostras compostas foram colhidas por piquete, nos pontos médios da altura do dossel, com o auxílio de uma armação metálica de área de 0,25 m² e tesouras de poda. O corte das plantas foi realizado a 5 cm da superfície do solo com colheita de todos os perfilhos contidos no interior da armação. As amostras foram identificadas e divididas em duas subamostras. Uma subamostra de cada amostra após pesadas, foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa de ventilação forçada de ar a 55 °C, durante 72 horas, quando novamente foram pesadas para cálculo da concentração de amostra seca ao ar (ASA). Na outra subamostra foi feita também a pesagem do material fresco e depois separação manual dos componentes, folha, colmo e forragem senescente, com posterior pesagem de cada porção. Após isso, as porções de colmo e material senescente também foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa a 55 °C durante 72 horas para obtenção do peso seco e determinação de suas proporções na forragem. As porções das lâminas foliares foram liofilizadas obtendo também sua proporção na forragem. Os valores dos componentes morfológicos e a relação lâmina foliar:colmo foram expressos como proporção (%) da massa de forragem por unidade de área. Após a secagem as amostras de lâminas foliares foram moídas em moinho de facas tipo Willey com peneira de porosidade de 1 mm para avaliações químicas, assim como para quantificação da saponina protodioscina.

Diante das observações do hábito de alimentação dos carneiros, foi realizado o pastejo simulado, buscando seguir de maneira fidedigna as porções pastejadas pelos ovinos. Foram feitas seis amostragens compostas simulando o pastejo dos ovinos por piquete, realizadas durante as coletas de fezes para estimativa do consumo e digestibilidade descritas no item 2.8.1. Essas amostras foram liofilizadas e divididas em duas subamostras. Uma porção da amostra foi moída com peneira de porosidade de 1 mm para posteriores avaliações da concentração de saponina protodioscina, da matéria seca definitiva (INCT-CA G-003/1), da proteína bruta (INCT-CA N-001/1) e avaliação

da fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (INCT-CA F-002/1), seguindo metodologia de Detmann et al. (2012). A outra porção da amostra foi moída com peneira de porosidade de 2 mm para determinação da fibra em detergente neutro indigestível (INCT- CA F-009/1) segundo Detmann et al. (2012).

2.6. Contagem de esporos de *Pythomices chartarum*

Para a contagem de esporos do fungo *Pythomices chartarum* 6 amostras de plantas foram colhidas em pontos representativos da altura do pasto em cada piquete, à altura de 5 cm do solo. Para realização da contagem dos esporos do fungo foi utilizado o método de lavagem em amostras frescas da forrageira, adotando o método proposto por Tokarnia et al. (1979). Este método se refere à adição de dez vezes o volume de água destilada à quantidade em gramas da planta, e homogeneização desse conteúdo por agitação por um minuto. O sobrenadante dessa solução foi analisado em câmara de Neubauer para análise microscópica e identificação morfológica do fungo pela descrição de Russomanno et al. (2003), onde cada esporo observado por 2 mm³ foi multiplicado por 5000.

2.7. Determinação de saponina protodioscina

A quantificação da protodioscina foi realizada nas amostras de pastejo simulado e lâminas foliares coletadas durante o período experimental a cada 28 dias. As lâminas foram utilizadas uma vez que representam a porção que contêm as concentrações significativas do composto e em geral o componente dominante do consumo seletivo pelos ovinos. Desse material seco e moído, foi pesado em tubos ependorff de 2 ml cerca de 20 mg do material. Após isso, foi realizada a extração dos compostos por uma solução de extração, composta por metanol: isopropanol: ácido acético, na proporção 20:79:1. Nesta etapa, foi adicionado ácido naftalenoacético (NAA) como normalizador interno na concentração. Cada amostra foi vortexada quatro vezes por 20 segundos e sonicadas por 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram deixadas por 30 minutos em gelo, sonicadas por mais 10 minutos e centrifugadas a 13.000 RCF por 10 minutos a 4°C. Cerca de 300 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos vials para leitura. Para quantificação da protodioscina foi utilizado cromatografia líquida acoplado a espectrômetro de massas (LC/MS) em aparelho UPLC QqQ 6430 (Agilent), pertencente ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizado o

padrão protodioscina (G0299) da Sigma- Aldrich Brasil Ltd., São Paulo. Os dados foram processados pela plataforma MassHunter.

2.8. Avaliações nos animais

Para avaliação dos sinais clínicos dos animais, esses foram submetidos diariamente a exames clínicos com verificação das mucosas oculares e orais, além de alterações do comportamento, incluindo apatia, anorexia, fotofobia, observação de alterações cutâneas e edemas. Também foram monitoradas a temperatura corporal dos animais através de termômetro retal, para observação de alguma anormalidade. Os animais que apresentaram sinais da intoxicação foram imediatamente retirados do experimento e transferidos para o setor de ovinocultura, onde ficavam em ambiente com sombra e recebiam alimentação a base de silagem de milho para tratamento e recuperação.

Os animais foram vermifugados ao chegarem à área experimental com Ivermectina injetável subcutânea (0,2 ml/10 kg PV). Ao longo do período experimental mais duas vermifugações foram realizadas de acordo com o método FAMACHA[®] (EMBRAPA, 2007).

2.8.1. Consumo e digestibilidade

O consumo de matéria seca diário por animal foi estimado utilizando o dióxido de titânio e a fibra indigestível em detergente neutro como indicadores externo e interno, respectivamente. O dióxido de titânio (TiO₂) foi ministrado com doses diárias de 2g animal⁻¹, em um período de dez dias, onde no sexto dia de aplicação oral do indicador, iniciaram-se as coletas de amostras fecais em três dias alternados e em horários diferentes a cada dia. No dia seis de março foram colhidas amostras de fezes no horário de 06h00min, no dia oito de março a coleta foi realizada as 12h00min e no dia 10 dez de março às 18h00min. As amostras fecais foram secas em estufa de circulação forçada de ar por 72 h a 55°C e depois moídas em moinho de facas tipo Willey com peneira de porosidade de 2 mm. A concentração de TiO₂ em amostras fecais foi estimada utilizando o método proposto pelo INCT- CA M- 007/1.

Amostras de forragem oriundas do pastejo simulado colhidas entre os dias de coleta de amostras fecais foram incubadas no rúmen de três bovinos fistulados, juntamente com amostras fecais, por 288 horas, para posterior análise da fibra em detergente neutro indigestível (INCT-CA F-009/1). Assim como em amostras da planta

forageira, as amostras de fezes moídas com peneira de porosidade de 1 mm foram utilizadas para determinação da proteína bruta (INCT-CA N-001/1), da fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (INCT-CA F-002/1), e matéria seca definitiva seguindo metodologia de Detmann et al. (2012). A partir desses dados, foi possível estimar a digestibilidade da matéria seca, da proteína bruta, da fibra em detergente neutro, e os consumos diários de massa seca, de proteína bruta, de fibra em detergente neutro e de protodioscina por animal.

Os animais foram pesados no início e final do período experimental com jejum de 14 horas para avaliação da variação de peso diário dos animais.

2.8.2. Avaliações histopatológicas

Os animais que foram a óbito antes do fim do experimento foram necropsiados e retirados fragmentos do fígado para posterior análise. Os fragmentos hepáticos foram processados segundo técnicas rotineiras em histopatologia, seccionadas a 5 µm, os quais foram posteriormente corados com eosina e hematoxilina, para posterior análise em microscopia de luz. No final do experimento, todos os animais foram abatidos inclusive os animais que foram transferidos da área experimental, para coleta de fragmentos do fígado, com objetivo de avaliações de lesões histopatológicas, em conjunto às manifestações clínico-patológicas. A avaliação histopatológica foi realizada no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, adotando os seguintes padrões para as lesões: 0- Ausente; 1- Discreta; 2- Moderada; 3- Intensa.

2.8.3. Avaliações bioquímicas

Foram realizadas cinco coletas de sangue para os exames séricos bioquímicos, onde a primeira foi realizada antes do início do experimento, ou seja, valores de pré-exposição dos animais aos tratamentos (dia zero) e as demais realizadas até o dia do abate (15, 30, 45 e 60 dias de experimento). Essas amostras foram colhidas por meio da punção da veia jugular. O sangue foi mantido em tubos a vácuo, protegidos da luz, e em seguida centrifugados a 3000 RPM, por 20 minutos, a 4°C, para obtenção do soro. Esse soro foi acondicionado em tubos ependorff em duplicata de cada animal e congelado a -20°C. As concentrações séricas de uréia (K056), creatinina (K067), colesterol (K083), triglicerídeos (K117), das enzimas aspartato aminotransferase (K048), gama-glutamiltransferase (K080), bilirrubina total (K106), bilirrubina direta (K107) e proteína total (K031) foram mensuradas usando kits da Bioclin (Belo Horizonte, Brasil),

em equipamento automático para bioquímica, modelo BS200E (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd., China) no laboratório de fisiologia e reprodução animal do departamento de zootecnia.

2.9. Abate dos animais

O abate foi conduzido de maneira humanitária, onde os animais foram insensibilizados através de injúria cerebral promovida pela pistola pneumática com dardo cativo penetrativo. Em seguida realizou-se a sangria via veia jugular, conforme Instrução Normativa N°3 de 13/01/2000 (Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o Abate Humanitário de Animais de Açougue). Amostras de sangue e fragmentos do fígado foram coletadas de todos os animais para posteriores análises bioquímicas dos parâmetros séricos e análises histopatológicas.

2.10. Análise estatística dos dados

Todas as análises foram realizadas utilizando o software PROC MIXED do SAS® (versão 9.4). Primeiro, a suposição de independência das unidades experimentais foi testada através do teste de esfericidade de Huynh-Feldt usando a opção TYPE = HF. Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada considerando o delineamento de blocos casualizados previamente descrito ao nível de significância de 5%. Para a análise dos parâmetros séricos do sangue, utilizou-se a análise de medidas repetidas comparando as diferentes estruturas de covariância, utilizando o critério de informação de Akaike (AIC). No modelo em questão, os efeitos do tratamento, os dias de coleta e suas interações foram considerados fixos, e o efeito animal foi considerado aleatório. A comparação das médias foi realizada pelo teste F ao nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS

3.1. Dados climáticos

A caracterização climática do ambiente em monocultivo com o capim-braquiária (SOL) e em sistema silvipastoril (SSP) está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Valores médios de temperatura máxima (T Máx) e mínima (T Mín), temperatura de bulbo úmido (WET) e bulbo seco (DRY), temperatura do globo negro (Globo) e velocidade do ar no monocultivo do capim-braquiária (SOL) e no sistema silvipastoril (SSP), em três horários distintos, ao longo do período experimental

Variável	Sistema		EPM	P-Valor
	SOL	SSP		
07h00min				
T Máx (°C)	26,86	25,97	0,43	0,093
T Mín (°C)	19,50	19,27	0,24	0,456
WET (°C)	20,87	20,55	0,21	0,226
DRY (°C)	23,18	22,62	0,31	0,154
Globo (°C)	29,07	24,37	0,87	0,001
Vento (m/s)	0,60	0,62	0,13	0,922
13h00min				
T Máx (°C)	30,02	27,91	0,38	0,001
T Mín (°C)	21,97	20,87	0,42	0,034
WET (°C)	22,99	22,34	0,15	0,007
DRY (°C)	28,95	28,71	0,54	0,715
Globo (°C)	38,82	33,04	1,11	0,001
Vento (m/s)	1,39	1,00	0,17	0,069
18h00min				
T Máx (°C)	30,31	28,25	0,38	0,001
T Mín (°C)	24,29	22,93	0,53	0,040
WET (°C)	20,84	20,91	0,16	0,719
DRY (°C)	28,73	25,74	4,04	0,547
Globo (°C)	26,96	24,95	0,99	0,099
Vento (m/s)	0,86	0,58	0,13	0,089

EPM: erro padrão da média; Médias na linha comparando os sistemas diferem pelo teste F quando $P < 0,05$.

No horário de 07h00min houve diferença apenas nos dados de temperatura do globo negro ($P = 0,001$), sendo essa maior no ambiente em monocultivo de capim-braquiária. Já no horário de 13h00min, os dados que diferiram foram, temperatura máxima ($P = 0,001$), temperatura mínima ($P = 0,034$), temperatura de bulbo úmido ($P = 0,007$), temperatura de globo negro ($P = 0,001$), apresentando-se maiores em monocultivo do capim-braquiária. Observou-se elevação apenas para os parâmetros de temperatura máxima ($P = 0,001$) e de temperatura mínima ($P = 0,040$) no tratamento em monocultivo para o horário de 18h00min.

3.2. Massa e composição morfológica da forragem

Na Tabela 2 são apresentados os valores médios de produtividade da forragem (kg ha^{-1} MS) e a composição morfológica (% na matéria seca) do pasto em monocultivo e em sistema silvipastoril. Houve diferença na massa de forragem produzida entre os tratamentos ($P = 0,004$), onde a forrageira apresentou maior produtividade em condição de monocultivo. Para as porcentagens de lâmina foliar, colmo, forragem senescente e a relação lâmina foliar/colmo não foram encontradas diferenças entre os tratamentos.

Tabela 2- Massa de forragem, proporção de lâmina foliar, de colmo e de forragem senescente na massa de forragem e relação lâmina foliar/colmo do capim-braquiária em monocultivo (SOL) e em sistema silvipastoril (SSP)

Variável	Sistema			P-Valor
	SOL	SSP	EPM	
Massa (kg/ha)	3893,09	3026,56	209,31	0,004
Lâmina foliar (%)	23,32	27,06	1,38	0,059
Colmo (%)	46,25	47,19	2,14	0,755
Senescente (%)	30,44	25,75	2,33	0,160
Folha/Colmo	0,63	0,59	0,06	0,640

EPM: erro padrão da média; Médias na linha comparando os sistemas diferem pelo teste F quando $P < 0,05$.

3.3. Avaliação da composição química da forragem

Avaliação da composição química das lâminas foliares e das amostras de simulação de pastejo do capim-braquiária em monocultivo e em sistema silvipastoril estão apresentadas na Tabela 3. Houve diferença na composição química das lâminas foliares do capim-braquiária entre os tratamentos monocultivo e silvipastoril para avaliações da fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas ($P =$

0,003) e na concentração de protodioscina ($P = 0,007$), sendo maiores em condição de monocultivo. As demais variáveis não diferiram entre os tratamentos.

Não foram observados presença de esporos do fungo *Pythomices chartarum* no material colhido em ambos os sistemas avaliados. Portanto, foi assumido que a causa de fotossensibilização hepatógena nos animais foi devido exclusivamente a saponina protodioscina presente no capim-braquiária.

Tabela 3- Proteína bruta (PB), fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e protodioscina nas lâminas foliares e nas amostras de simulação de pastejo do capim-braquiária em monocultivo (SOL) e em sistema silvipastoril (SSP)

Variável	Sistema		EPM	P-Valor
	SOL	SSP		
Lâminas foliares (% MS)				
PB	12,49	13,13	0,40	0,232
FDNcp	54,88	52,59	0,58	0,003
FDNi	15,67	15,44	0,37	0,628
Protodioscina	1,37	0,98	0,10	0,007
Pastejo simulado (% MS)				
PB	14,45	12,85	0,92	0,236
FDNcp	53,12	52,24	0,75	0,417
FDNi	13,46	13,97	0,54	0,519
Protodioscina	1,17	0,90	0,10	0,089

EPM: erro padrão da média; Médias na linha comparando os sistemas diferem pelo teste F quando $P < 0,05$.

3.4. Avaliações nos animais

Estão representados na Tabela 4 os consumos médios diários de matéria seca, de proteína bruta, de fibra em detergente neutro e de protodioscina por animal, as digestibilidades e a variação de peso médio diário dos ovinos. Houve efeito dos tratamentos apenas para o consumo diário de protodioscina ($P = 0,007$), onde os animais em monocultivo apresentaram maior consumo desse metabólito, pois, apesar do consumo de matéria seca dos animais não ter sido influenciado pelos tratamentos, a forrageira em monocultivo apresentou maior concentração de protodioscina. Já para digestibilidade dos nutrientes não foi observada nenhuma diferença.

Os animais mantidos no monocultivo do capim-braquiária mantiveram o seu peso vivo e quase não obtiveram ganho de peso diário, com média de ganho de 4 g animal⁻¹ dia⁻¹ enquanto que os animais mantidos em sistema silvipastoril apresentaram em média perda de 16 g animal⁻¹ dia⁻¹. Contudo, não houve diferença para esta variável entre os tratamentos ($P = 0,339$).

Em relação à temperatura corporal dos animais, também não houve alterações entre os dois grupos de animais ($P = 0,480$), registrando-se valores médios de 39,35 °C e 39,52 °C nos animais em monocultivo e em sistema silvipastoril, respectivamente.

Tabela 4- Consumos de matéria seca (MS), de proteína bruta (PB), de fibra insolúvel em detergente neutro (FDNcp) e de protodioscina. Digestibilidade da matéria seca, da proteína bruta e da fibra insolúvel em detergente neutro do capim-braquiária em monocultivo (SOL) e em sistema silvipastoril (SSP). Variação de peso médio diário (VPD) dos ovinos em ambos sistemas

Variável	Sistema		EPM	P-Valor
	SOL	SSP		
Consumo				
MS (kg/dia)	1,11	0,88	0,11	0,177
PB (kg/dia)	0,15	0,12	0,01	0,123
FDNcp (kg/dia)	0,59	0,47	0,06	0,180
Protodioscina (g/dia)	13,01	7,95	1,06	0,007
Digestibilidade				
MS (%MS)	60,95	63,56	1,27	0,166
PB (%MS)	64,28	66,26	1,65	0,397
FDNcp (%MS)	59,96	61,16	1,97	0,661
Variação de peso diário				
VPD (g/dia)	4,00	-16,00	0,02	0,339

EPM: erro padrão da média; Médias na linha comparando os sistemas diferem pelo teste F quando $P < 0,05$.

3.4.1. Avaliação clínica e alterações histopatológicas hepáticas dos animais

Na Tabela 5 estão apresentados os principais sintomas dos animais intoxicados com o capim-braquiária. Tanto os ovinos submetidos ao pastejo em monocultivo com a forrageira quanto os submetidos ao sistema silvipastoril apresentaram alterações clínicas, ou seja, o acesso dos animais ao ambiente com sombra, não foi suficiente para impedir a intoxicação desses e nem amenizou os sintomas clínicos. Apenas o animal A8

do monocultivo e os animais A5 e A6 do sistema silvipastoril chegaram ao final do experimento sem apresentarem sinais clínicos.

Tabela 5- Principais sinais clínicos observados em ovinos submetidos ao pastejo em capim-braquiária em monocultivo (SOL) e em sistema silvipastoril (SSP), durante o período experimental

Tratamento	Animal	Sinais clínicos								
		APE	FTF	HSO	SCN	EFO	DER	ICT	ALO	ATA
SOL	A1	+	+	-	-	+	-	-	-	-
SOL	A2	-	-	-	-	+	-	+	-	-
SOL	A3	+	+	+	+	-	-	-	+	-
SOL	A4	+	+	-	+	-	-	+	-	+
SOL	A5	-	+	+	+	-	-	-	-	-
SOL	A6	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SOL	A7	+	+	-	+	-	-	+	-	+
SOL	A8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOL	A9	+	+	+	-	-	+	-	+	-
SOL	A10	-	-	-	-	+	-	+	-	-
SSP	A1	+	+	+	+	+	+	+	-	-
SSP	A2	+	+	-	-	+	-	+	-	-
SSP	A3	-	-	-	+	-	-	+	-	-
SSP	A4	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SSP	A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSP	A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSP	A7	+	+	+	+	+	-	-	-	+
SSP	A8	+	-	+	+	-	+	-	+	-
SSP	A9	+	-	-	-	+	-	-	-	+
SSP	A10	+	+	+	-	-	-	-	-	-

APE: apatia e emagrecimento; FTF: fotofobia; HSO: hiperemia e secreção da mucosa conjuntiva; SCN: secreção nasal; EFO: edema de face e orelhas; DER: dermatite; ICT: icterícia; ALO: alopecia; ATA: ataxia. Sinais clínicos: Ausência (-) ou presença (+).

Na Figura 2 estão representados alguns sintomas clínicos característicos da intoxicação, que ocorreram nos animais durante o período experimental.

Na Tabela 6 estão representadas as alterações histopatológicas hepáticas encontradas nos animais e na Figura 3 estão expostas imagens microscópicas do tecido

hepático lesado que caracterizam os achados da fotossensibilização hepatógena. Tanto os animais em sistema silvipastoril quanto os submetidos ao monocultivo do capim-braquiária apresentaram alterações microscópicas no fígado, com lesões caracterizadas por degeneração e/ou necrose de hepatócitos e infiltrado inflamatório no espaço peribiliar. Logo, o acesso dos animais à sombra, também não foi suficiente para evitar ou amenizar os danos hepáticos.

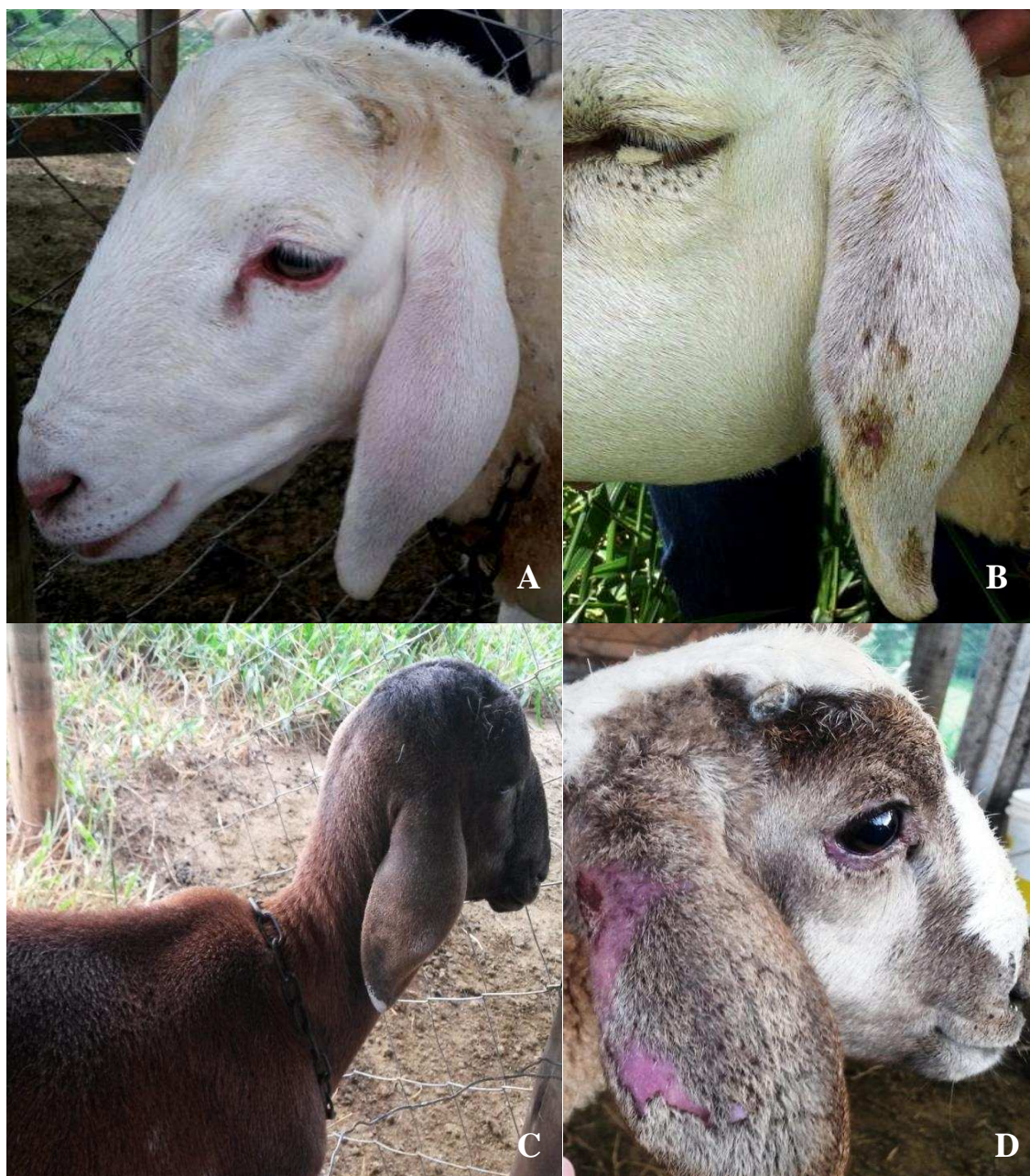


Figura 2- Animal com edema de orelhas e hiperemia da mucosa conjuntiva (A); Animal com edema de face e orelhas, com áreas focais de alopecia em início de dermatite (B); Animal com edema de orelhas e alopecia (C); Áreas de alopecia, hiperemia, ulceração e crostas na orelha (D).

Tabela 6- Principais alterações histopatológicas observadas em fígado de ovinos alimentados com capim-braquiária em condição de monocultivo (SOL) e em sistema silvipastoril (SSP), durante período experimental

Tratamento	Animal	Alterações histopatológicas			
		DGN	NCR	INF	HDB
SOL	A1	1	0	2	1
SOL	A2	1	0	1	0
SOL	A3	1	1	1	1
SOL	A5	1	1	1	0
SOL	A6	2	0	1	0
SOL	A8	1	1	1	0
SOL	A9	1	0	1	1
SOL	A10	1	1	1	1
SSP	A2	1	1	1	1
SSP	A3	2	3	2	2
SSP	A4	1	0	1	1
SSP	A5	1	0	1	0
SSP	A6	1	1	1	0
SSP	A8	1	0	1	0
SSP	A9	1	0	1	0

DGN: degeneração hepatocelular; NCR: necrose de hepatócitos; INF: infiltrado inflamatório; HDB: hiperplasia de ductos biliares. Avaliação histopatológica: 0- Ausente; 1- Discreta; 2- Moderada; 3- Intensa.

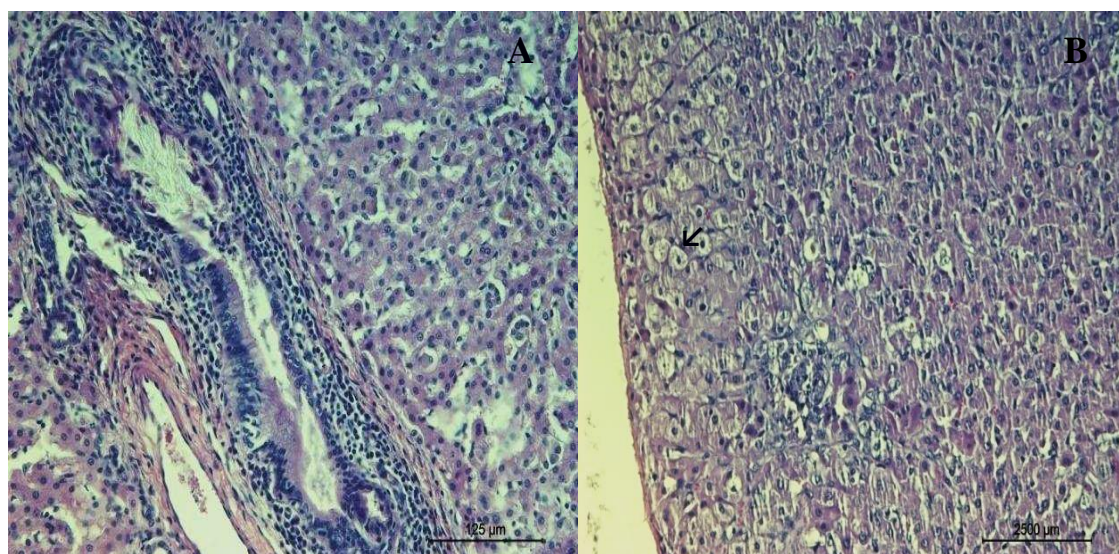


Figura 3- Fígado: Infiltrado acentuado de células inflamatórias mononucleares no espaço peribiliar (A). Na imagem B a região da seta representa vacuolização citoplasmática de hepatócitos.

Na Figura 4 no lado esquerdo, uma imagem representando um fígado de animal acometido pela fotossensibilização hepatógena, com coloração mais amarronzada (animal A3 do sistema silvipastoril) e do lado direito um fígado de animal que não apresentou nenhum sintoma da intoxicação (animal A8 do monocultivo).



Figura 4- Fígado de ovino com fotossensibilização hepatógena à esquerda e a direita fígado de animal que não apresentou sintoma clínico da intoxicação.

3.4.2. Análises bioquímicas

Na Tabela 7 estão apresentados os níveis séricos bioquímicos dos animais ao longo do experimento. Uma análise feita antes do início do experimento, ou seja, no dia zero, são os valores de pré-exposição dos animais aos tratamentos e as subsequentes feitas nos dias 15, 30, 45 e 60 dias de experimento.

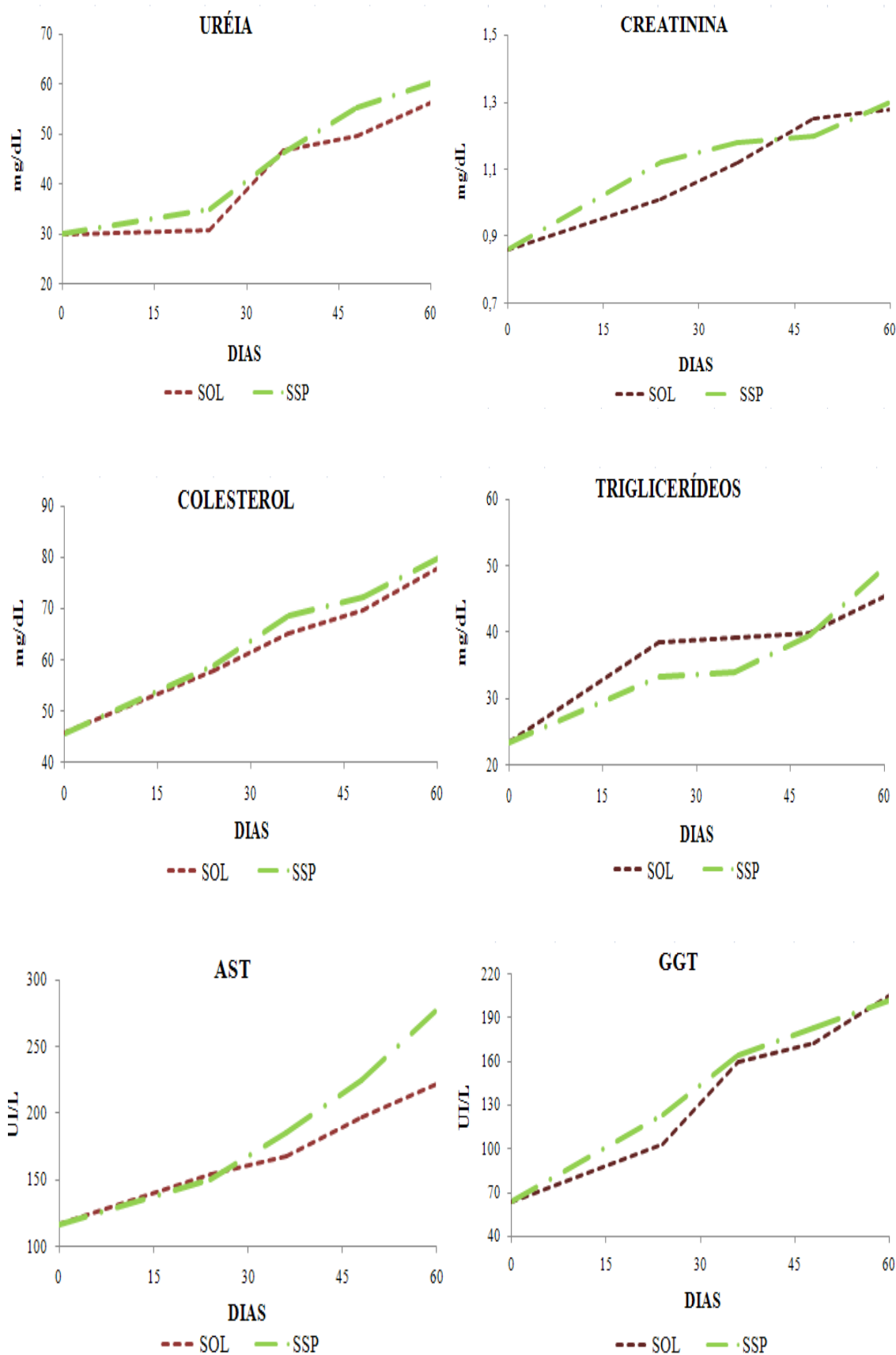
Não foram encontradas interações entre os tratamentos e os dias de coleta de sangue para nenhum dos indicadores bioquímicos avaliados. Também não houve diferença nos níveis de nenhum parâmetro sérico em relação ao tratamento dos animais em monocultivo e em sistema silvipastoril. Contudo, foram observadas diferenças nos indicadores de uréia ($P = 0,001$) creatinina ($P = 0,001$), colesterol ($P = 0,001$), triglicerídeos ($P = 0,001$), AST ($P = 0,001$), GGT ($P = 0,001$), bilirrubina total ($P = 0,030$), bilirrubina direta ($P = 0,005$) e proteínas totais ($P = 0,001$) em relação aos dias de coleta, onde, foram observados elevações dos valores séricos conforme aumento do tempo de exposição dos animais nos tratamentos, ou seja, com a crescente exposição dos animais ao capim-braquiária, maiores foram as alterações no metabolismo hepático.

Tabela 7- Média dos indicadores séricos bioquímicos dos animais no dia zero e nos dias 15, 30, 45 e 60 do período experimental dos animais em monocultivo de capim-braquiária (SOL) e dos animais em sistema silvipastoril (SSP)

Variável	Dia 0	SOL				SSP				EPM	P-Valor		
		15	30	45	60	15	30	45	60		T	D	T*D
Uréia (mg.dL ⁻¹)	30,01	30,87	46,81	49,62	56,20	35,07	46,31	55,41	60,36	6,41	0,479	0,001	0,979
Creatinina (mg.dL ⁻¹)	0,86	1,01	1,12	1,25	1,28	1,12	1,18	1,20	1,30	0,08	0,542	0,001	0,861
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	45,74	58,05	65,23	69,64	77,89	58,85	68,55	72,15	79,66	3,44	0,417	0,001	0,987
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)	23,43	38,54	39,17	39,81	45,35	33,22	34,06	39,65	49,78	5,26	0,691	0,001	0,853
AST (U.LL ⁻¹)	116,73	153,97	168,23	196,66	221,42	150,20	185,11	224,95	277,65	29,51	0,264	0,001	0,815
GGT (U.LL ⁻¹)	63,60	103,21	159,55	172,97	204,99	123,03	163,98	182,56	201,69	29,04	0,721	0,001	0,994
BILIR T (mg.dL ⁻¹)	0,18	1,98	2,05	2,22	3,18	0,89	1,83	2,56	3,71	1,28	0,712	0,030	0,773
BILIR D (mg.dL ⁻¹)	0,10	0,86	0,91	1,00	1,33	0,54	0,98	1,04	1,65	0,48	0,941	0,005	0,821
BILIR I (mg.dL ⁻¹)	0,08	1,14	1,17	1,22	1,86	0,35	0,84	1,52	2,06	0,84	0,602	0,073	0,726
Proteínas totais (g.dL ⁻¹)	5,43	6,02	6,34	6,34	6,36	6,03	6,46	6,38	6,46	0,15	0,522	0,001	0,989

AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama-glutamilttransferase; BILIR T: bilirrubina total; BILIR D: bilirrubina direta; BILIR I: bilirrubina indireta; EPM: erro padrão da média; T: tratamentos; D: dias; T*D: interação tratamentos e dias, diferem pelo teste F quando $P < 0,05$.

Na Figura 5 abaixo, estão representadas as atividades séricas médias dos indicadores uréia, creatinina, colesterol, triglicerídeos, AST, GGT, bilirrubina total, bilirrubina direta e proteínas totais nos animais ao longo do período experimental.



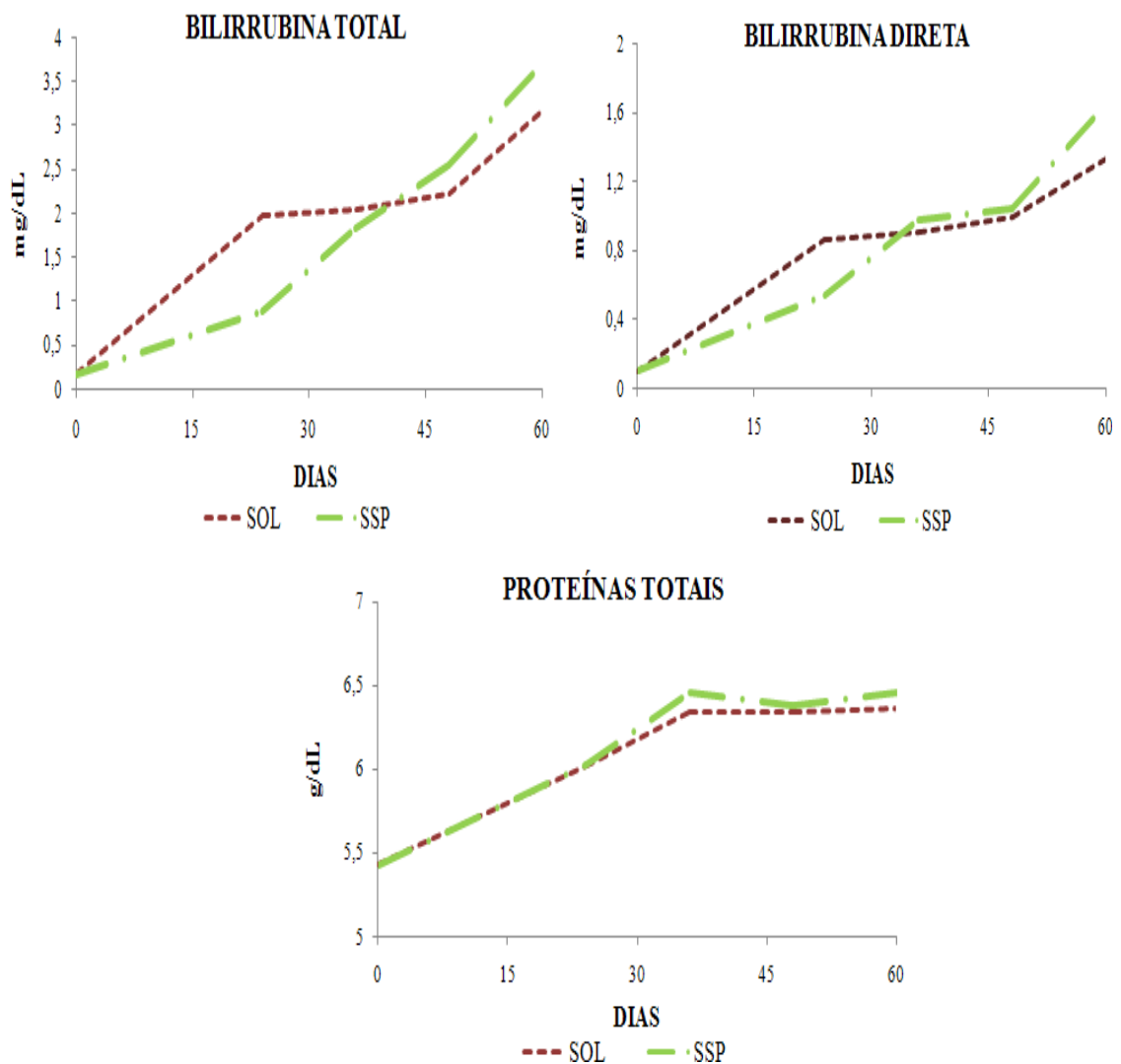


Figura 5- Atividades séricas médias dos indicadores uréia, creatinina, colesterol, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), bilirrubina total, bilirrubina direta e proteínas totais nos ovinos sob pastejo em monocultivo (SOL) com o capim-braquiária e em sistema silvipastoril (SSP) durante as coletas de sangue ao longo do período experimental.

Os primeiros sinais clínicos da fotossensibilização nos ovinos ocorreram 20 dias após início do experimento e permaneceu até o último dia de avaliação dos animais. Dos 20 animais em avaliação, sete morreram antes do término do período de avaliação, sendo dois do grupo em monocultivo do capim-braquiária e cinco do sistema silvipastoril. Todos esses animais apresentaram icterícia e elevação dos indicadores séricos de bilirrubinas totais, diretas e indiretas, bem como elevação das enzimas AST e GGT. Desses sete animais que foram em óbito, quatro apresentaram alterações neurológicas, como ataxia e foram a óbito rapidamente, com evolução clínica da doença

de dois dias. Dos animais que permaneceram na área experimental até o fim do experimento, apenas três não apresentaram sintomas de intoxicação e permaneceram sem elevação das taxas séricas, sendo dois animais do sistema silvipastoril e um do monocultivo. Dos 11 animais que foram transferidos da área experimental no decorrer do experimento (seis do grupo do monocultivo e cinco do grupo silvipastoril) apenas seis conseguiram sobreviver e obter uma melhora clínica e uma diminuição dos indicadores séricos, sendo quatro animais do monocultivo e dois do sistema silvipastoril.

4. DISCUSSÃO

O sistema silvipastoril apresentou sombreamento médio de 50,5% durante o período experimental, e conseqüentemente as plantas forrageiras abaixo das árvores de eucalipto obtiveram menor incidência de radiação fotossinteticamente ativa quando comparado ao capim-braquiária em monocultivo. Tal condição permitiu amenização da temperatura local, onde no horário de maior pico de radiação solar, por volta de 13h00min, houve diminuição da temperatura de máxima e mínima, pelo termômetro de bulbo úmido e redução na radiação absorvida pelo globo negro. Além dessas alterações ambientais, podem também ser observado em sistemas silvipastoris alterações estruturais, morfológicas e na produtividade da planta forrageira, onde modificações no hábito de crescimento e desenvolvimento da gramínea podem ser observado devido à limitação luminosa.

Confirmando essas possíveis alterações, o capim-braquiária apresentou decréscimo na produção de MS com o sombreamento, Segundo Andrade et al. (2004), os níveis de sombra acima de 50% de radiação solar plena, causam redução na produção de forragem, até para as plantas forrageiras consideradas tolerantes ao sombreamento. Paciullo et al. (2007), estudando o padrão de resposta da *Urochloa decumbens* em sistema silvipastoril, observou redução na produção de forragem, quando submetida ao sombreamento, e essa perda de produção foi inversamente proporcional ao nível de sombra. Apesar desta gramínea ser considerada tolerante ao sombreamento, a diminuição da intensidade luminosa e da qualidade espectral da luz, baixo fluxo de fótons e baixa relação vermelho/vermelho distante, provoca redução na produtividade, uma vez que a sombra impõe limitações à sua capacidade fotossintética. Por outro lado, essa redução da radiação solar em sistema silvipastoril não foi suficiente para modificação na composição morfológica das plantas, haja visto que, não foram encontradas diferenças morfológicas nas plantas forrageiras entre os dois sistemas de cultivo.

Na avaliação da composição química do capim-braquiária, foi observado maiores valores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) nas lâminas foliares cultivadas em monocultivo, porém essa alteração não influenciou a digestibilidade da MS e nem o consumo de MS dos animais em pastejo nos dois tratamentos, que foram semelhantes. Paciullo et al. (2007), também observaram redução da FDN em plantas cultivadas em sistema silvipastoril, e ainda observaram incrementos na digestibilidade da MS em plantas sombreadas. Essa redução no teor de fibra pode estar relacionada

com a menor disponibilidade de fotoassimilados para o desenvolvimento de parede celular, culminando na redução dos constituintes de parede celular nas plantas em sombreamento. Tal fato foi constatado por Berlyn & Cho (2000), que também observaram teores de fibra menores em plantas cultivadas à sombra, e supôs que o sombreamento pode causar redução na proporção dos tecidos condutores e de sustentação e em adição a isso, redução na espessura da parede celular. A não alteração da digestibilidade do capim-braquiária nos dois tratamentos pode ser devido à pequena variação no conteúdo de parede celular das plantas, o que não permitiu influenciar os coeficientes de digestibilidade e a não alteração do consumo de MS entre os animais expostos ao pastejo em monocultivo da forrageira e em sistema silvipastoril.

As protodioscinas atuam como uma barreira química ou como um protetor do sistema de defesa da planta (WINA et al., 2005). Essa atividade seria devido a sua capacidade de formar complexos insolúveis com esteroides, proteínas e fosfolipídios nas membranas celulares, alterando sua permeabilidade (FRANCIS et al., 2002). Concentrações maiores de protodioscina foram observadas nas lâminas foliares do capim-braquiária em monocultivo. Apesar das amostras de simulação de pastejo não terem apresentado essa alteração, houve uma tendência de elevação na concentração do composto também na gramínea em monocultivo. Resultado semelhante foi observado por Costa et al. (2013), onde observaram elevações de saponinas triterpênicas em plantas sob alta irradiância. A protodioscina é um composto secundário à base de carbono que pertence ao grupo dos glicósidos esteróides que são principalmente produzidos através da via do ácido mevalônico. Existem algumas hipóteses sobre o acúmulo de metabólitos secundários em plantas, como o balanço de nutrientes de carbono e o equilíbrio de diferenciação de crescimento. Segundo Massad et al. (2012), essas duas hipóteses postulam que as plantas alocam recursos excedentes no metabolismo secundário quando o crescimento se torna limitado (devido a deficiências de carbono ou nutrientes) antes que a fotossíntese seja afetada. Esse aumento na concentração de protodioscina observado no capim-braquiária em condição de monocultivo, impactou diretamente no maior consumo de protodioscina nos ovinos submetidos a esse tratamento.

As concentrações médias de protodioscinas encontradas no capim-braquiária nesse trabalho foram de 1,37% nas lâminas foliares da *U. decumbens* em monocultivo e 0,98% em sistema silvipastoril. Nas amostras de simulação de pastejo, foram 1,17% e 0,90% nas gramíneas em monocultivo e sistema silvipastoril, respectivamente. Apesar dessa diferença entre os tratamentos, não houve diferença em relação a intoxicação dos

ovinos em pastejo nesses dois sistemas, ou seja, a concentração de protodioscina encontrada foi suficiente para causar fotossensibilização tanto nos ovinos submetidos a intensa radiação solar, quanto nos ovinos expostos a menor radiação. No trabalho de Porto et al. (2013) foi avaliada também a intoxicação de ovinos submetidos a *U. decumbens*, com um grupo de animais exposto ao sol, e outro à sombra e um grupo controle, onde os animais permaneceram no sol, mas receberam feno de *Cynodon dactylon* e capim *Pennisetum purpureum* como alimentação. Os autores encontraram valores médios de saponina de $0,94 \pm 0,80\%$ no capim-braquiária e observaram intoxicação nos animais nos dois grupos que receberam essa gramínea na alimentação, não havendo alterações nos animais do grupo controle. Mustafa et al. (2012), encontraram variação entre as concentrações de protodioscina de 0,30 a 2,56%, sendo observado nesse intervalo, a intoxicação dos animais em pastejo. Para Castro et al. (2011), os valores de 0,52 a 1,06% encontrados de protodioscinas garantiram a intoxicação de ovinos jovens em pastejo. Esses valores corroboram com as concentrações encontradas nesse trabalho, permitindo inferir que a concentração da saponina protodioscina foi suficiente para promover a fotossensibilização hepatógena nos ovinos submetidos aos dois tratamentos.

Geralmente, em ambientes a pleno sol, estão presentes grandes quantidades de luz solar visível de alta energia, com comprimentos de onda mais curtos (entre 400 e 500 nm) no espectro visível (violeta/azul). No entanto, em ambientes sombreados, há um aumento de luz com maiores comprimentos de onda (acima de 700 nm [vermelho distante]), que têm menos energia do que os comprimentos de onda mais curtos. Além disso, ainda há decréscimo na radiação UV em ambientes sombreados (FIORUCCI & FANKHAUSER, 2017). Assim, mesmo que os animais mantidos no sistema silvipastoril não tivessem sido totalmente protegidos dos raios solares; eles receberam luz com menos energia para ativar a filoterina (fotossensibilizador) acumulada na pele. No entanto, isso não foi suficiente para melhorar ou impedir o aparecimento dos sintomas de fotossensibilização. De acordo com os achados clínicos, tanto os ovinos expostos ao monocultivo do capim-braquiária, quanto os expostos ao sombreamento em sistema silvipastoril apresentaram os sintomas clínicos da fotossensibilização, ou seja, a não exposição dos animais a intensa radiação não atenuou os sinais clínicos da intoxicação. Isso pode ser justificado devido a alguns fatores. A concentração de protodioscina no pasto foi suficientemente elevada para os ovinos dos dois grupos; os animais vieram de uma condição de confinamento, onde não tiveram contato prévio com a gramínea; eram animais novos, leves e por isso mais suscetíveis. Ovinos que

nunca tiveram contato com o capim-braquiária são considerados animais não adaptados, sendo mais suscetíveis à intoxicação do que animais criados e mantidos em pastagens de *Urochloa spp.* (GRACINDO et al., 2014, FACCIN et al., 2014). Além do mais, embora a sombra represente uma forma significativa de proteção contra os efeitos nocivos dos raios ultravioletas e da luz solar visível de alta energia, nem toda sombra pode ser considerada efetivamente protetora e homogênea (ou seja, mesmo à sombra, os animais no sistema silvipastoril certamente ainda recebem radiação solar). Isso ocorre porque os raios solares podem atingir a pele indiretamente através da radiação difusa e refletida.

Os sinais clínicos observados nos animais que apresentaram a fotossensibilização hepatógena devido a ingestão da *Urochloa decumbens* foram perda de peso (70%) ou manutenção do peso corporal, com ganhos irrelevantes ao dia (30%), apatia (65%), hiperemia e secreção na mucosa conjuntiva (35%), secreção nasal (50%), fotofobia (60%), edema na face e orelhas (45%), dermatite (25%), icterícia (35%), alopecia (15%), ataxia (20%) e morte (35%). O emagrecimento citado por Riet Correa et al. (2011), pode estar relacionado com a alteração no metabolismo do fígado, induzindo o balanço energético negativo aos animais. A hiperemia, secreção da mucosa conjuntiva, secreção nasal e icterícia foram relatados nos trabalhos de Mustafa et al. (2012) e Santos et al. (2008). A icterícia ocorre devido à obstrução dos canais biliares pelos cristais formados pela ligação das saponinas ao ácido glicurônico, esse complexo formado se liga aos sais de cálcio, formando os cristais insolúveis, contribuindo para a colestase. Essa obstrução dificulta metabolização da bilirrubina, eliminação de derivados da filioeritrina assim como os pigmentos biliares, onde esse acúmulo de pigmentos promove coloração amarelada observada nas mucosas despigmentadas, caracterizando a icterícia (SANTOS et al., 2008).

A dermatite em ovinos sob pastejo com o capim-braquiária tende a ocorrer quando o dano hepático é mais generalizado e ainda pode ser mais agravada em regiões despigmentadas e mais expostas ao sol. Para Castro et al. (2011), a ausência de lesões cutâneas, como encontrado na maioria dos animais deste trabalho (75%), ocorre em ovinos não-adaptados ao pastejo da gramínea, que morreram intoxicados por braquiária, possivelmente justificada pela grande susceptibilidade desses animais, ou seja, em casos mais agudos da doença.

O edema de face e orelhas foram observados em diversos trabalhos como o de Badiei et al. (2009) e Oliveira et al. (2012). Para Tokarnia et al. (2000), a causa dessas alterações está relacionada com o aumento da sensibilidade cutânea causada pelo

acúmulo da filoteritina nessa região, o que pode estar correlacionado também com o sintoma de hiperemia da mucosa conjuntiva e ulcerações na pele. Esse acúmulo de filoteritina em áreas da pele, quando em contato com o sol, desencadeia um processo inflamatório, pela formação de radicais livres de oxigênio no citosol da célula, que pode causar ruptura de lisossomos e degranulação de mastócitos. Os mastócitos sendo lesados liberam histamina, levando ao aumento da permeabilidade vascular, acarretando o edema. E ainda, os animais apresentam o sintoma de fotofobia, já que o agente causador da fotossensibilização, a filoteritina, é fotoativa.

Santos et al. (2008) relataram um quadro clínico hiperagudo nos ovinos intoxicados, sendo que o aparecimento dos sinais clínicos foi abrupto. Os animais que apresentaram sintomas de ataxia nesse trabalho, também tiveram quadro hiperagudo, com morte rápida. Sintomatologia neurológica também foi verificada por Albernaz et al. (2010), isso pode ser decorrente da alteração do metabolismo hepático, com acúmulo de substâncias como amônia, ácidos graxos de cadeia curta no sangue e no encéfalo, além de alterações nas concentrações de neurotransmissores.

Alterações microscópicas no fígado foram observadas em todos os animais avaliados, incluindo os três animais que não apresentaram nenhum sintoma clínico durante o experimento. As principais alterações observadas foram, degeneração hepatocelular, necrose de hepatócitos, infiltrado inflamatório e hiperplasia de ductos biliares. Nos trabalhos de Saturnino et al. (2010) e Souza et al. (2010) além desses achados, também foram encontrados, presença de macrófagos espumosos e presença de cristais birrefringentes. O principal achado microscópico que caracteriza a fotossensibilização hepatógena é a presença de cristais birrefringentes nos ductos biliares e presença de macrófagos com citoplasma espumoso (RIET-CORREA et al., 2011). Porém nesse trabalho não foram encontradas essas alterações. Isso pode ser devido à forma aguda da intoxicação que os animais apresentaram, não dando tempo para ocorrência de alterações mais severas no fígado. Gomar et al. (2005), observaram correlação entre a presença de macrófagos espumosos com o grau de obstrução biliar, portanto, o que pode ter contribuído também para a não observação desses macrófagos nesse trabalho seja que o grau de retenção biliar foi insuficiente para aparecimento desses parâmetros. Para Driemeier et al. (2002), esses macrófagos são indicativos de cronicidade, pois não foram observados em curtos períodos de consumo, eles apenas observaram a presença de macrófagos espumosos quando o período de ingestão da *U. decumbens* foi superior a 150 dias, o que não foi o caso desse trabalho. Segundo esses mesmos autores, essas lesões no fígado e ductos biliares estão relacionadas a lesões

inespecíficas no parênquima que resultam em atividade proliferativa, refletindo o aumento na metabolização do fígado perante a toxina. A alteração na coloração do fígado e a evidenciação do padrão lobular observada nesse trabalho em animais afetados pela intoxicação dos dois tratamentos podem ser devido a tumefação dos hepatócitos, infiltrado inflamatório e degeneração nas células do fígado, como proposto por Cullen et al. (2009).

Na avaliação dos níveis séricos de indicadores bioquímicos dos animais, como em outras avaliações, também não foi encontrado diferença entre os animais nos dois tratamentos. Foram identificadas diferenças em relação aos dias de coletas de sangue para concentrações de uréia, creatinina, colesterol, triglicerídeos, para as enzimas AST e GGT, bilirrubina total, bilirrubina direta e proteínas totais. Onde pôde ser observada uma elevação dos níveis séricos ao longo do aumento da exposição dos animais ao pastejo com a planta forrageira. Permitindo inferir que existe uma correlação da severidade da intoxicação com a elevação desses parâmetros.

A concentração de uréia no dia zero foi de $30,01 \text{ mg.dL}^{-1}$, dentro dos valores de referência para ovinos segundo Kaneko et al. (2008), que é de 15,2 a $42,8 \text{ mg.dL}^{-1}$. Mas seus níveis foram se elevando, chegando a $56,20 \text{ mg.dL}^{-1}$ nos animais em monocultivo do capim-braquiária e a $60,36 \text{ mg.dL}^{-1}$ para os animais em pastejo sob sistema silvipastoril. Os valores iniciais para creatinina foi de $0,86 \text{ mg.dL}^{-1}$, chegando a valores mais altos no último dia de coleta, 1,28 e $1,30 \text{ mg.dL}^{-1}$ para animais em monocultivo e em sistema silvipastoril respectivamente, sendo que os valores dentro do intervalo de referência para Kaneko et al. (2008) está entre 1,2 a $1,9 \text{ mg.dL}^{-1}$. Essa elevação da concentração sérica de uréia e creatinina implicam que as funções renais podem ter sido afetadas durante a intoxicação pela saponina protodioscina (BADIEI et al., 2009), e essas elevações estão relacionadas com a diminuição na taxa de filtração glomerular. Contudo, essa alteração glomerular pode não ter sido tão acentuada, já que a concentração do indicador creatinina ficou dentro dos valores de referência para a espécie animal.

Como dito acima, aumentando os dias de exposição dos animais ao pastejo com a *U. decumbens* houve elevação sérica dos indicadores colesterol e triglicerídeos, chegando a valores superiores na última coleta. Os valores de pré-exposição dos animais aos tratamentos (dia zero) para o colesterol e triglicerídeos foram de 45,74 e $23,43 \text{ mg.dL}^{-1}$ respectivamente, semelhantes ao descrito por Kaneko et al. (2008), 52 a 76 mg.dL^{-1} para colesterol e 9 a 30 mg.dL^{-1} para triglicerídeos. Houve elevação do colesterol até valores de $77,89 \text{ mg.dL}^{-1}$ para os carneiros em monocultivo e de $79,66$

mg.dL⁻¹ para os animais em sistema silvipastoril. O colesterol é um indicador confiável do metabolismo energético do fígado, embora a variação observada seja semelhante aos valores de referência para Kaneko et al. (2008), foi observado elevação desse indicador ao longo da alimentação com o capim-braquiária, indicando possível desbalanço das atividades hepáticas. Pacheco (2014), também observou elevação de colesterol sérico nos animais que morreram em relação aos animais intoxicados por capim-braquiária, mas que se mantiveram vivos. A bile é a principal via de excreção do colesterol do corpo, portanto um distúrbio no fluxo biliar pode aumentar a concentração sérica de colesterol. Observou-se elevação de triglicerídeos até valores de 45,35 e 49,78 mg.dL⁻¹ em monocultivo e sistema silvipastoril, sendo que a relação entre síntese, metabolização e distribuição entre colesterol e triglicerídeos pode explicar a elevação desse último também como distúrbio hepático e colestase.

Os animais intoxicados apresentaram aumento sérico das enzimas AST e GGT, como observado também nos trabalhos de Badiei et al. (2009) e Brum et al. (2007), existindo uma relação entre a elevação dessas enzimas com a severidade da intoxicação hepática. Os valores iniciais para AST e GGT foram de 116,73 e 63,70 UI.L⁻¹, sendo que para Kaneko et al. (2008), os valores de referência para essa espécie animal para AST é de 60 a 280 UI.L⁻¹ e para GGT de 20 a 52 UI.L⁻¹. No entanto, houve elevação da concentração da GGT até valores de 204,99 e 201,69 UI.L⁻¹ nos animais em monocultivo e em sistema silvipastoril respectivamente. A GGT apresenta intensa atividade no fígado e nos rins, sua elevação sérica pode ser devido à colestase e lesão no epitélio biliar, sendo indicador eficiente de lesões hepáticas, hiperplasia biliar e proliferação de ductos biliares. A sua elevação sérica pode permanecer elevada por mais tempo, o que pode facilitar o diagnóstico da intoxicação hepática (CASTRO et al., 2011). Embora a concentração de AST encontrada foi dentro do intervalo de referência descrito por Kaneko et al. (2008), pode-se observar elevação linear dos valores ao longo do experimento. A enzima AST está presente no citoplasma e na mitocôndria dos hepatócitos, além de células musculares, portanto, lesão no fígado provoca elevação em seu nível sérico (TOKARNIA et al., 2000). Por isso, em geral, as enzimas AST e GGT são bons parâmetros de avaliação de lesões hepáticas, sendo opções de auxílio no diagnóstico da fotossensibilização hepatógena.

No diagnóstico da função hepática incluem também a análise das bilirrubinas séricas, que estão envolvidas em mecanismos de transportes. A bilirrubina pode estar na forma de hemobilirrubina, sendo chamada de bilirrubina indireta ou não conjugada. A fração da bilirrubina sérica conjugada com o ácido glicurônico é a bilirrubina direta,

sendo a soma de ambas, a bilirrubina total. O valor médio da bilirrubina total da população no dia zero foi de 0,18 mg.dL⁻¹, alcançando no fim do experimento valores de 3,18 e 3,71 mg.dL⁻¹ para animais do monocultivo e sistema silvipastoril respectivamente, sendo muito além dos valores de referência da espécie animal descrito por Kaneko et al. (2008), entre 0,1 a 0,5 mg.dL⁻¹. Os valores de referência da espécie para a bilirrubina direta também descrito por esses autores está no intervalo de 0,0 a 0,27 mg.dL⁻¹, muito inferiores aos valores encontrados nesse trabalho, onde as concentrações foram de até 1,33 a 1,04 mg.dL⁻¹ para os animais em monocultivo e em sistema silvipastoril. A concentração sérica de bilirrubina indireta apresentou tendência em ser maior com o aumento da exposição dos carneiros ao capim-braquiária, chegando a valores de 1,86 e 2,06 mg.dL⁻¹ respectivamente nos animais em monocultivo e em sistema silvipastoril, sendo os valores referenciais descritos por Kaneko e colaboradores de 0,1 a 0,23 mg.dL⁻¹. As elevações séricas em geral das bilirrubinas estão associadas a disfunções hepáticas, hemólise e colestase, sendo eficientes e importantíssimos indicadores para diagnósticos da intoxicação hepatógena e principais causas da icterícia. Aumento nas concentrações séricas de bilirrubina total e bilirrubina direta também foram observados no trabalho de Faccin et al. (2014), em ovinos intoxicados pelo capim-braquiária.

Foram observados também, aumentos séricos de proteínas totais nos animais afetados ao longo do tempo de exposição ao capim-braquiária. Os valores de pré-exposição da população em estudo foi de 5,43 g.dL⁻¹, enquanto Kaneko et al. (2008) descreveram como valores de referência para a espécie animal entre 6,0 a 7,2 g.dL⁻¹, valores próximos ao encontrado na última coleta de sangue dos animais, correspondente aos maiores valores para esse indicador, 6,34 e 6,38 g.dL⁻¹ para animais em pastejo em monocultivo do capim-braquiária e para animais em sistema silvipastoril respectivamente. Pacheco (2014) e Badiei et al. (2009) também constataram aumento nas concentrações séricas de proteína nos animais com sintoma de fotossensibilização hepatógena. Isto pode estar relacionado com a desidratação dos animais intoxicados, ou seja, diminuição do volume de distribuição. A desidratação pode ter contribuído tanto para elevação dos níveis séricos de proteína, quanto para os níveis séricos de uréia, já que ela produz uma hemoconcentração e em decorrência disso, possibilita elevação nos níveis de proteína e uréia.

5. CONCLUSÃO

O sombreamento natural de 50,5% propiciado pelo sistema silvipastoril não previne ou atenua os sintomas de fotossensibilização em ovinos jovens não adaptados ao pastejo em *Urochloa decumbens*.

Contudo, a concentração de saponina protodioscina na *Urochloa decumbens* em sistema silvipastoril é menor do que em condição de monocultivo. Porém, para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas variações deste metabólito, pesquisas adicionais envolvendo a avaliação de saponinas em capim-braquiária submetidas a diferentes níveis de sombreamento ao longo das estações do ano permanecem necessárias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERNAZ, T. T., DA SILVEIRA, J. A. S., DA SILVA, N., OLIVEIRA, C. H. S., REIS, A. D. S. B., OLIVEIRA, C. M. C. & NETO, J. D. B., 2010. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(9), 741-748. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900006>.
- ANDRADE, C.M.S., VALENTIM, J.F., CARNEIRO, J.C., FELIPE ALEXANDRE VAZ, F.A. 2004. Crescimento de gramíneas e leguminosas forrageiras tropicais sob sombreamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. 39, 263-270.
- BADIEL, K. K., MOSTAGHNI, S., NAZIFI, S., KHODAKARAM, T.A., GHANE, M., MOMENI, S.A., 2009. Experimental *Panicum miliaceum* poisoning in sheep. *Small Ruminant Research*. 82, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.02.002>.
- BERLYN, G. P., CHO, J., 2000. Light, Moisture, and nutrient use by plants. *The Silvicultural Basis for Agroforestry Systems*, Boca Raton: CRC Press, 9-39.
- BRUM, K.B., HARAGUCHI, M., LEMOS, R.A.A., RIET-CORREA, F., FIORAVANTI, M.C.S., 2007. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Brazilian Veterinary Research*. 27, 39-42. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007000100007>.
- CASTRO, M.B., GRACINDO, C.V., MARINA F.A., LANDI, M.F.A., FILHO, S.L.S., FILHO, N.J.R., LIMA, E.M.M., RIET-CORREA, F., 2018. Sheep adaptation management, and investigation of inherited resistance to prevent *Brachiaria spp.* poisoning. *Small Ruminant Research*. 158 (2018) 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.12.001>.
- CASTRO, M.B., SANTOS, H.L., MUSTAFA, V.S., GRACINDO, C.V., MOSCARDINI, A.C.R., LOUVANDINI, H., PALUDO, G.R., BORGES, J.R.J., HARAGUCHI, M., FERREIRA, M.B., RIET-CORREA, F., 2011. *Brachiaria spp.* poisoning in sheep in Brazil. Experimental and epidemiological findings, p.110-117. In: Riet-Correa F., Pfister J., Schild A.L. & Wierenga T. (Eds), *Poisoning by Plants, Mycotoxins and related Toxins*. CAB International, London.
- COSTA, F., DEYENDO, A.C. A., FLECK, J. D., GOSMANN, G., NETO, A.G. F., 2013. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. *Plant*

- CULLEN, J.F., 2009. Fígado, sistema biliar e pâncreas, p.393-461. In: Mcgavin, M.D. & Zachary, J.F. Bases da Patologia em Veterinária. 4ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- DETMANN, E., SOUZA, M. A., VALADARES FILHO, S. C., QUEIROZ, A. C., BERCHIELLI, T. T., SALIBA, E.O.S., CABRAL, L. S., PINA, D. S., LADEIRA, M. M., AZEVEDO, J. A. G., 2012. Métodos para análise de alimentos, INCT. Visconde do Rio Branco- MG. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia. 214 p.
- DRIEMEIER, D., COLODEL, E.M., SEITZ, A.L., BARROS, S.S., CRUZ, C.E.F., 2002. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. *Toxicon*. 40, 1027-1031. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00276-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00276-8).
- EMBRAPA, 2007. CHAGAS, S.C.A., OLIVEIRA, S.C.M., CARVALHO, O.C., MOLENTO, B.M. Método Famacha©: Um recurso para o controle da verminose em ovinos. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlo, SP.
- EMBRAPA SOLOS, 2006. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). Sistema brasileiro de classificação de solos. 2ª ed. – Rio de Janeiro, 306 p.
- FACCIN, T.C., RIET-CORREA, F., RODRIGUES, F.S., SANTOS, A.C.S., MELO, G.K.A., SILVA, J.A., FERREIRA, R., ÍTAVO, C.C.B.F., LEMOS, R.A.A., 2014. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep. *Toxicon*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.008>.
- FAIZAL, A., GELEN, D., 2013. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews*. 12, 877–893. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-013-9322-4>.
- FIORUCCI, A.S. & FANKHAUSER, C., 2017. Plant Strategies for Enhancing Access to Sunlight. *Current Biology*. 27 (11), 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.085>.
- FRANCIS, G., KEREM, Z., MAKKAR, H. P. & BECKER, K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition*. 88(6), 587-605. <https://doi.org/10.1079/BJN2002725>.
- GOMAR, M.S., DRIEMEIER, D., COLODEL, E.M.; GIMENO, E.J., 2005. Lectin histochemistry of foam cells in tissues of cattle grazing *Brachiaria spp*. *Journal*

of Veterinary Medicine. Physiology, Pathology, Clinical Medicine. 52, 18-21.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00683.x>.

GRACINDO, C.V., LOUVANDINI, H., RIET-CORREA, F., BARBOSA-FERREIRA, M., CASTRO, M.B., 2014. Performance of sheep grazing in pastures of *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum*, and *Andropogon gayanus* with different protodioscin concentrations. Tropical Animal Health and Production. 46, 733–737. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-014-0556-y>.

GRACINDO, C.V., 2014. Investigação dos mecanismos de resistência à intoxicação por *Brachiaria ssp.* em ovinos. 62f. Tese de doutorado- Faculdade de agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília.

KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L., 2008. (Ed.). Clinical biochemistry of domestic animals. Academic press.

LOW, SUSAN G., 2015. Signal Grass (*Brachiaria decumbens*) Toxicity in Grazing Ruminants. Agriculture. 5, 971-990.
<http://dx.doi.org/10.3390/agriculture5040971>.

LOZANO, M. C., MARTINEZ, N. M., DIAZ, G. J., 2017. Content of the Saponin Protodioscin in *Brachiaria spp.* from the Eastern Plains of Colombia. Toxins. 9(7), 220. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins9070220>.

MASSAD, T.J., DYER, L.A., VEGA, C.G., 2012. Costs of Defense and a Test of the Carbon-Nutrient Balance and Growth-Differentiation Balance Hypotheses for Two Co-Occurring Classes of Plant Defense. PLOS ONE 7(10): e47554.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047554>.

MUSTAFA, V.S., MOSCARDINI, A.R.C., BORGES, J.R., RECKZIEGEL, G.C., RIET-CORREA, F. AND CASTRO, M.B., 2012. Caracterização da intoxicação natural por *Brachiaria spp.* em ovinos no Brasil Central. Pesquisa Veterinária Brasileira. 32 (12), 1272-1280. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001200010>.

MOREIRA, C.M., BANYS, V.L., PINTO, A.S., FRANCO, L.A.S., HARAGUSHI, M., FIORAVANTI, M.C.S., 2009. Bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon*: desempenho, avaliação da quantidade de esporos do fungo *Pythomices chartarum* e teor de saponina das pastagens. Ciência Animal Brasileira. 10, 184-194.

OLIVEIRA, R.S., SILVA, R.M.M., DUTRA, P.A., FERREIRA, E.A., PINHEIRO, E.G., MACÊDO, J.T.S.A., PEDROSO, P.M.O., 2012. Intoxicação espontânea

por *Brachiaria decumbens* em ovinos no Estado da Bahia. Arquivos de Pesquisa Animal.

PACHECO, J.C.G., 2014. Fotossensibilização em cordeiros recriados e suplementados em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Diss. Universidade de São Paulo.

PACIULLO, D.S.C., CARVALHO, C.A.B., AROEIRA, L.J.M., MORENZ, M.F., LOPES, F.C.F., ROSSIELLO, R.O.P., 2007. Morfofisiologia e valor nutritivo do capim-braquiária sob sombreamento natural e a sol pleno. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 42, 573-579.

PORTO, M.R., SATURNINO, K.C., LIMA, E.M.M., LEE, S.T., LEMOS, R.A.A., PEREIRA, C.M., CORREA, F.R., CASTRO, M.B., 2013. Avaliação da exposição solar na intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 33 (8), 1009-1015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100736X2013000800011>.

PUPIN, R. C., MELO, G. K., HECKLER, R. F., FACCIN, T. C., ÍTAVO, C. C., FERNANDES, C. E., and LEMOS, R. A., 2016. Identificação de rebanhos de cordeiros suscetíveis e resistentes a intoxicação por braquiária. Pesquisa Veterinária Brasileira. 36(5), 383-388.

QUINN, J. C., KESSELL, A., LESLIE, A., 2014. Secondary Plant Products Causing Photosensitization in Grazing Herbivores: Their Structure, Activity and Regulation. Int. Journal of Molecular Sciences. 15, 1441-1465; <http://dx.doi.org/10.3390/ijms15011441>.

RIET-CORREA, B., CASTRO, M.B., LEMOS, R.A.A., RIET-CORREA, G., MUSTAFA, V.S., RIET-CORREA, F., 2011. *Brachiaria spp.* poisoning of ruminants in Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira. 31(3), 183-192. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000300001>.

RUSSOMANNO, O.M.R., PORTUGAL, M.A.S.C., COUTINHO, L.N., CALIL, E.M.B., FIGUEIREDO, M.B., 2003. *Leptosphaerulina chartarum* e seu envolvimento no eczema facial. Arquivo do Instituto Biológico. 70, 385-390.

SANTOS, J.C.A., RIET-CORREA, F., SIMÕES, S.V., BARROS, C.S.L., 2008. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira. 28, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000100001>.

SATURNINO K.C., MARIAN T.N., BARBOSA-FERREIRA M., BRUM K., FERNANDES C.E.S. & LEMOS R.A.A. 2010. Intoxicação experimental por

Brachiaria decumbens em ovinos confinados. Pesquisa Veterinária Brasileira. 30(3):195-202.

SOUZA R.I.C., RIET-CORREA F., BARBOSA-FERREIRA M., BRUM K.B., FERNANDES C.E. and LEMOS R.A.A., 2010. Intoxicação por *Brachiaria spp.* em bovinos no Mato Grosso do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira. 30(12), 1036-1042.

TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J., SILVA, M.F., 1979. Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, IBGE, Rio de Janeiro.

TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P.V., 2000. Plantas Tóxicas do Brasil. Helianthus: Rio de Janeiro. 311p.

WINA, E., MUETZEL, S., BECKER, K., 2005. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production. A Review. Journal of agricultural and food chemistry. 53(21), 8093-8105. <http://dx.doi.org/10.1021/jf048053d>.