



Comparação dos efeitos das folhas de *Cestrum axillare* Vell. com as saponinas isoladas em caprinos¹

Jéssica B.R. Marinho², Antônio U. Carvalho², Felipe Pierezan², Kelly M. Keller³, Franklin Riet-Correa⁴, Marília M. Melo² e Benito Soto-Blanco^{2*}

ABSTRACT.- Marinho J.B.R., Carvalho A.U., Pierezan F., Keller K.M., Riet-Correa F., Melo M.M. & Soto-Blanco B. 2018. [Comparison of the effects of *Cestrum axillare* leaves with isolated saponins in goats.] Comparação dos efeitos das folhas de *Cestrum axillare* Vell. com as saponinas isoladas em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(5):852-861. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brazil. E-mail: benito.blanco@pq.cnpq.br
Cestrum axillare Vell. (formerly *Cestrum laevigatum* Schltd.), family Solanaceae, is the most important hepatotoxic plant in Brazil that causes acute poisoning. It occurs in the Southeast and Center-West regions and in coastal areas of the Northeast Brazil. Spontaneous poisoning was described in cattle, goats and sheep, with clinical signs evidenced within 24 hours after ingestion of the leaves and death within 48 hours after signs onset. The clinical signs observed in acute poisoning are apathy, anorexia, ruminal arrest, arched back, constipation with feces in small spheres, sometimes covered with mucus and blood streaks, muscle tremors, staggering gait and sometimes sialorrhoea. Neurological signs may be observed, due to interference in the urea cycle due to hepatic insufficiency resulting in hyperammonemia (hepatic encephalopathy). The main pathological finding is centrilobular hepatic necrosis. The toxic principle present in *C. axillare* was not yet definitively proven, but some authors attribute the toxicity of the plant to the presence of saponins gitogenin and digitogenin. However, it has not been determined whether the saponins present in *C. axillare* are responsible for the hepatotoxic effect of the plant. Thus, the objective of this work is to determine if the saponins are the compounds responsible for the hepatotoxic effects produced by the ingestion of the leaves of *C. axillare*, using goats as experimental model. For this, the effects of the administration of the leaves were compared with those produced by the saponins isolated from the leaves in goats. Six goats were randomly assigned to three experimental groups that received [1] dry leaves of *C. axillare* (animals A1 and A2), [2] saponins extract from leaves (animals S1 and S2) or [3] control group (animals C1 and C2). For goats receiving the dry leaves the administered dose of plant was 10g/kg for one animal (A1) and 5g/kg for the other one (A2). For animals receiving the saponins extract, administration was done at a dose equivalent to 20g/kg repeated after 24 hours. The dry leaves administered at a dose of 10g/kg to a goat produced toxic effects, with alterations in biochemistry (indicating hepatic lesion) and histopathology showing centrilobular hepatic necrosis. At the dose of 5 g/kg of dry leaves, clinical signs of poisoning were not observed, but hepatic necrosis was found; after 15 days after the last administration, the hepatic parenchyma of this animal was already normal, with only hemorrhagic areas, demonstrating full regeneration. The administration of extracts of saponins containing gitogenin and digitogenin to goats did not produce significant toxic effects, proving that these compounds are not responsible for intoxication. In addition, goats are a good experimental model for studies of this intoxication.

INDEX TERMS: Poisonous plants, *Cestrum axillare*, saponins, goats, *Cestrum laevigatum*, hepatotoxic plants, hepatic necrosis, saponins, plant poisoning, toxicoses.

¹ Recebido em 18 de maio de 2017.

Aceito para publicação em 25 de maio de 2017.

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brasil. *Autor para correspondência: benito.blanco@pq.cnpq.br

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 30123-970.

⁴ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela, Entrada principal INIA LE, Ruta 50 Km 11, CP 05748192, Colonia, Uruguay.

RESUMO. - *Cestrum axillare* Vell. (anteriormente *C. laevigatum* Schldt.), família Solanaceae, é a mais importante planta hepatotóxica do Brasil que causa intoxicação aguda. Tem ocorrência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e em áreas litorâneas do Nordeste. A intoxicação natural foi descrita em bovinos, caprinos e ovinos, com sinais clínicos evidenciados em até 24 horas após a ingestão das folhas e morte em até 48 horas após o início da sintomatologia. Os sinais clínicos observados na intoxicação aguda são apatia, anorexia, parada ruminal, dorso arqueado, constipação com fezes em formas de pequenas esferas, por vezes recobertas com muco e com estrias de sangue, tremores musculares, andar cambaleante e, às vezes, sialorreia. Podem ser observados sinais neurológicos, devido à interferência no ciclo da ureia pela insuficiência hepática resultando em hiperamonemia (encefalopatia hepática). O principal achado patológico é a necrose hepática centrolobular. O princípio tóxico presente no *C. axillare* ainda não está definitivamente comprovado, mas alguns autores atribuem a toxicidade da planta à presença das saponinas gitogenina e digitogenina. No entanto, ainda não foi determinado se as saponinas presentes em *C. axillare* são as responsáveis pelo efeito hepatotóxico da planta. Assim, o objetivo deste trabalho é determinar se as saponinas são os compostos responsáveis pelos efeitos hepatotóxicos produzidos pela ingestão das folhas de *C. axillare*, usando caprinos como modelo experimental. Para isto, foram comparados os efeitos da administração das folhas com os produzidos pelas saponinas isoladas destas folhas em caprinos. Foram utilizados seis caprinos, distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais que receberam [1] folhas secas de *C. axillare* (Caprinos A1 e A2), [2] extrato de saponinas das folhas (Caprinos S1 e S2), e [3] grupo controle (Caprinos C1 e C2). Para os caprinos que receberam as folhas secas a dose administrada de planta foi de 10g/kg para um animal (A1) e de 5g/kg para outro (A2). Para os animais que receberam o extrato de saponinas, a administração foi feita na dose equivalente a 20g/kg, repetida após 24 horas. Foi verificado que as folhas secas, quando administradas na dose de 10g/kg a um caprino, produziram efeitos tóxicos, com alterações na bioquímica (indicando lesão hepática) e histopatológica apresentando necrose hepática centrolobular. Na dose de 5g/kg de folhas secas, não foi observado sintomatologia clínica da intoxicação, mas houve necrose hepática; 15 dias após a última administração, o parênquima hepático deste animal já se encontrava normal, apenas com áreas hemorrágicas, demonstrando plena regeneração. A administração do extrato de saponinas contendo gitogenina e digitogenina a caprinos não produziu efeitos tóxicos significantes, comprovando não serem estes compostos os responsáveis pela intoxicação. Além disto, a espécie caprina é um bom modelo experimental para estudos desta intoxicação.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, *Cestrum axillare*, saponinas, caprinos, *Cestrum laevigatum*, plantas hepatotóxicas, necrose hepática, saponinas, intoxicação por plantas, toxicoses.

INTRODUÇÃO

A família Solanaceae está incluída na subclasse Asteridae, ordem Solanales. Compreende cerca de 3.000 espécies e 90 gêneros de ampla distribuição, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. O gênero *Cestrum* pode

ser encontrado como arbusto ou árvore (Silva et al. 2003). *Cestrum axillare* Vell., anteriormente *Cestrum laevigatum* Schldt., é a mais importante planta hepatotóxica do Brasil que causa intoxicação aguda. No Brasil, esta planta ocorre em muitas áreas das regiões Sudeste e Centro-Oeste (Sul de Goiás e Mato Grosso do sul) e litorâneas do Nordeste (Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco), sendo encontrada em áreas não alagadas e grotas (Marques 2010, Tokarnia et al. 2012).

Sob condições naturais, a espécie mais frequentemente intoxicada é a bovina (Döbereiner et al. 1969, Afonso & Santos 1995, Coutinho et al. 2013), mas já foram relatados casos em bubalinos (Barbosa et al. 2010), caprinos (Brito et al. 2010) e ovinos (Tokarnia et al. 2012). Apenas a intoxicação aguda foi observada nos casos espontâneos (Tokarnia et al. 2012).

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

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

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

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

O princípio tóxico presente no *C. axillare* ainda não está definitivamente comprovado, mas alguns autores atribuem a toxicidade da planta à presença das saponinas gitogenina e digitogenina (Canham & Warren 1950, Tokarnia et al. 2012), também encontradas em *Cestrum nocturnum* (dama da noite) (Cuartas & Castano, 2008). Algumas saponinas, como as presentes no pericarpo dos frutos do *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril, timbaúva, orelha-de-macaco), podem promover efeito hepatotóxico (Gadelha et al. 2015). No entanto, ainda não foi determinado se as saponinas presentes em *C. axillare* são as responsáveis pelo efeito hepatotóxico da planta. Assim, o objetivo deste trabalho é determinar se as saponinas são os compostos responsáveis pelos efeitos hepatotóxicos produzidos pela ingestão das folhas de *C. axillare*, usando caprinos como modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

Administração das folhas e do extrato de saponinas de *Cestrum axillare* em caprinos. O experimento foi conduzido no galpão de Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária-UFMG. Foram utilizados seis caprinos, sem raça definida, de 4 meses a 6 meses de idade e peso de 18 a 41kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais que receberam

[1] folhas secas de *C. axillare* (Caprinos A1 e A2), [2] extrato de saponinas das folhas de *C. axillare* (Caprinos S1 e S2) e [3] grupo controle (Caprinos C1 e C2). Os caprinos foram submetidos a jejum de 8 horas previamente ao início do experimento.

Para os caprinos que receberam as folhas secas a dose administrada de planta foi de 10g/kg para um animal (A1) e de 5g/kg para outro (A2). A planta triturada foi misturada a água e administrada aos animais via sonda oro-gástrica, em dose única. Para os animais que receberam o extrato de saponinas, a administração foi feita por meio de sonda oro-gástrica, com concentração equivalente a 20g de folhas secas/kg de peso vivo. Após 24 horas da primeira administração do extrato, repetiu-se o mesmo procedimento. Os animais do grupo controle receberam apenas água por meio de sonda oro-gástrica com repetição da administração após 24 horas da administração inicial.

Avaliação clínica e bioquímica sérica. Após a administração, os caprinos foram monitorados por meio de exames físicos para avaliação de alterações comportamentais, frequências cardíaca e respiratória, dos movimentos ruminais, da temperatura retal, da coloração das mucosas e do tempo de preenchimento capilar. A avaliação foi realizada antes da administração do extrato (T0) e após 3 horas (T3), 6 horas (T6), 12 horas (T12), 24 horas (T24), 27 horas (T27), 30 horas (T30) e 48 horas (T48).

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

Estudo patológico. Nos caprinos que não vieram à morte em 48 horas após a primeira administração foi realizada a coleta de fragmentos do fígado por meio de biópsia hepática percutânea guiada por ultrassonografia conforme descrito por Néspoli et al. (2010). Nos animais que receberam as folhas e sobreviveram, foi realizada a biópsia hepática 15 dias após o último procedimento.

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extrato de saponinas

Canham & Warren (1950) realizaram extração alcoólica das saponinas a partir dos frutos verdes de *Cestrum axillare*, e encontrou os compostos denominados digitogenina e gitogenina. Alguns autores consideram estas saponinas como as responsáveis pelos quadros de intoxicação pela planta (Tokarnia et al. 2012). Assim, no presente estudo foi feito um extrato de saponinas das folhas de *C. axillare* para verificar sua toxicidade em caprinos. A quantificação das saponinas no extrato foi realizada segundo a técnica descrita por Vigo et al. (2003), que utilizaram a raiz da planta *Pfaffia glomerata* (ginseng brasileiro) para validar a técnica de quantificação espectrofotométrica das saponinas após extração hidroalcoólica seguida por fracionamento com butanol. Nas folhas utilizadas de *C. axillare*, foi verificado que a concentração de saponinas totais foi de 13,5±2,0%.

A concentração de saponinas nos extratos administrados aos caprinos neste estudo foi de 6,17 mg/ml, resultando em 1,5425g de saponina em cada administração do extrato.

Por meio de cromatografia LC-MS/MS, foi identificada a presença das saponinas gitogenina e digitogenina. A digitogenina foi encontrada em um tempo de retenção de 8,96 minutos e a massa 449,32 (Fig.1A). Já a gitogenina foi identificada por meio da infusão direta com massa de 433,33. Além disto, a gitogenina combinada com a fase móvel (acetato de amônio) formou um aduto com a amônio, de massa 466,36 que foi mais abundante que a gitonenina em sua forma monovalente (Fig.1B). Evans (1974) identificou as saponinas de espécies diversas da planta *Digitalis* através da espectrometria de massas de alta resolução, foi observado gitogenina e digitogenina com massas iguais as encontradas neste estudo.

Efeitos das folhas e do extrato de saponinas de *Cestrum axillare* em caprinos

O caprino que recebeu as folhas de *C. axillare* trituradas na dose de 10g/Kg (A1), apresentou alterações ao exame físico 3 horas após a administração. O animal se encontrava apático, cabeça pendular, ausência de movimentos ruminais, mucosas congestas e aumento da frequência respiratória (100 a 120 movimentos por minuto). Após 6 horas, o animal se encontrava em decúbito esternal, extremamente

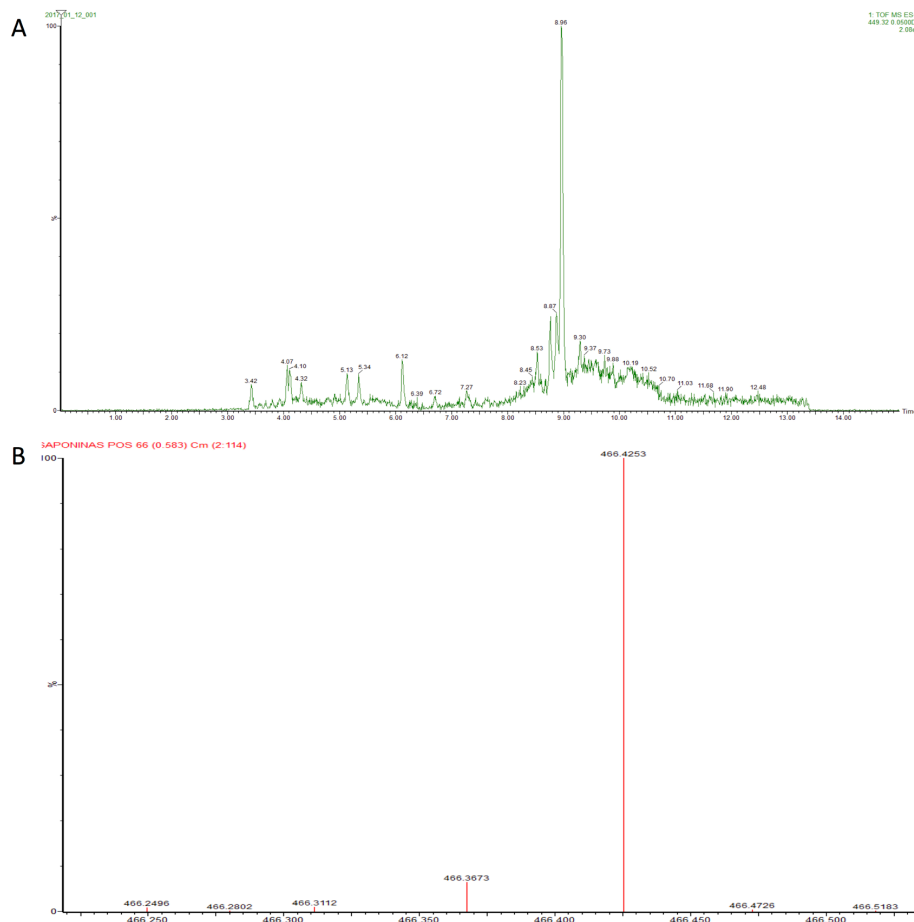


Fig.1. (A) Cromatograma total do extrato saponinas, tempo de retenção 8,96 (digitogenina). (B) Gitogenina (massa 433,3318) combinada com fase móvel formando aduto com amônio de massa 466,4253.

apático, desidratado e mucosas congestas. Doze horas após a administração da planta, o animal apresentava decúbito lateral, ausência dos reflexos corneano e palpebral, opistótono, hipotermia, redução da sensibilidade cutânea, movimentos de pedalagem e inconsciência, culminando em morte.

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

As alterações clínicas observadas neste estudo são similares às encontrados por Brito et al. (2010), que relataram um caso de intoxicação natural em caprino, que apresentou cansaço, dificuldade de manter em estação, andar cambaleante, decúbito lateral e morte. Os sinais clínicos mais evidentes descritos em bovinos foram tremores musculares, opistótono, apatia, moderada desidratação, comprometimento em número e intensidade da atividade retículo-ruminal, fezes em pouca quantidade, ressecadas e com muco (Döbereiner et al. 1969, Van der Lugt et al. 1991, Coutinho et al. 2013). No trabalho de Barbosa et al. (2010), os búfalos intoxicados experimentalmente apresentaram apatia, anorexia, diminuição ou ausência dos movimentos ruminais, sialorreia, dificuldade na inspiração, andar cambaleante, excitação, agressividade, constipação, fezes recobertas por muco e estrias de sangue, decúbito lateral, movimentos de pedalagem e então evoluíram para morte. Estes mesmos sinais clínicos foram observados em ovinos (Van der Lugt et al. 1992).

Em nosso estudo, o caprino que recebeu a planta na dose de 5mg/kg de folhas secas (A2) e os caprinos que receberam o extrato saponinas em concentração equivalente a 20g/kg de folhas secas não apresentaram sinais clínicos da intoxicação. Döbereiner et al. (1969) administraram diferentes doses de folhas frescas a bovinos e estabeleceu uma relação entre a quantidade ingerida e o grau de intoxicação; a planta fresca foi tóxica para bovinos a partir da dose de 10mg/kg. Considerando que as folhas perdem cerca de 50% de seu peso

com a secagem, a toxicidade das folhas em caprinos parece ser similar à dos bovinos. Por outro lado, apesar da relativa elevada dose equivalente de folhas, o extrato de saponinas não resultou em alterações clínicas, indicando não serem estas o princípio tóxico da planta.

Avaliação bioquímica sérica

A avaliação bioquímica sérica dos caprinos no presente estudo consistiu na determinação das atividades de AST, e GGT e das concentrações de proteínas totais, albumina, glicose e colesterol. Com relação à atividade sérica de AST, após a administração das folhas (A1 e A2), as atividades desta enzima aumentaram gradativamente, sendo que no tempo final de cada animal o aumento foi considerável (Quadro 1). Os valores de AST em todos os caprinos, mesmo no tempo zero, estão abaixo dos níveis relatados por Kaneko et al. (2008). Silva et al. (2004) estudou os níveis de AST em 355 caprinos saudáveis da raça Saanen, na faixa de idade de 91 a 180 dias, e o valor médio foi de 87,08±26,41 U/L. Valores similares também foram encontrados por Duarte (2007) em caprinos saudáveis e sem raça definida. Assim, podemos considerar que a atividade sérica de AST em caprinos saudáveis chega a até 114 U/L.

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

As atividades séricas de GGT apresentaram alteração apenas no tempo final, após a administração das folhas de *C. axillare* nos Caprinos A1 e A2 (Quadro 2), enquanto nos demais caprinos as atividades se mantiveram dentro

Quadro 1. Níveis de AST (U/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas de *Cestrum axillare* (A1 e A2)

Tempos (horas)	A1	A2	S1	S2	C1	C2
0	87,35	107,12	108,90	124,27	62,25	61,14
3	113,97	102,19	133,26	65,18	65,11	68,64
6	133,67	91,60	132,45	65,18	61,42	69,44
12	3431,62	111,28	136,20	76,07	61,17	67,28
24	-	79,43	129,83	77,51	59,95	67,67
27	-	97,405	123,98	73,78	63,23	68,52
30	-	140,09	130,71	80,65	64,47	67,77
48	-	1321,49	113,95	70,52	60,51	63,04

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

Quadro 2. Níveis de GGT (U/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas de *Cestrum axillare* (A1 e A2)

Tempos (horas)	A1	A2	S1	S2	C1	C2
0	38,71	35,20	53,63	60,14	30,32	36,28
3	39,30	35,25	69,32	47,61	32,03	39,77
6	45,70	31,51	68,04	48,68	29,33	39,73
12	63,45	34,26	66,05	51,55	29,04	39,25
24	-	28,25	62,60	51,29	29,86	39,19
27	-	29,68	64,98	51,14	30,79	39,12
30	-	38,63	64,01	52,75	32,60	38,06
48	-	112,65	57,65	45,20	24,71	35,93

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

da faixa de normalidade (Kaneko et al. 2008). Este mesmo resultado foi encontrado em estudos experimentais com bovinos (Van der Lugt et al. 1991) e ovinos (Van der Lugt et al. 1992). Coutinho et al. (2013) acompanharam um surto de intoxicação natural em bovinos leiteiros e encontraram valores dessa enzima extremamente aumentados (269,32±127,60). Em bubalinos, o valor aumentou de 16,33 U/L no tempo zero para 128,3 U/L após a ingestão da planta (Barbosa et al. 2010). A GGT é considerada um marcador primário para doenças hepatobiliares que são associadas a colestase, sendo encontrada no fígado (membranas canaliculares e do conduto biliar), rim (túbulos renais), pâncreas e intestino. Possui maior atividade no fígado de bovinos, equinos, ovinos e caprinos (Tennant & Center 2008).

Na dosagem de proteínas totais (Quadro 3), não foi observada diferença entre os grupos controle e saponinas. Já no grupo que recebeu as folhas, houve um aumento principalmente no A1, que veio a morte 12 horas após a administração das folhas. Coutinho et al. (2013) encontraram elevação nos níveis de proteínas totais, nos animais intoxicados por *C. axillare*. A elevação dos níveis de proteínas totais neste estudo provavelmente é devido a desidratação (Eckersall 2008).

A dosagem de albumina neste estudo esteve dentro dos valores de referência nos grupos controle e saponina e no Caprino A2 que recebeu as folhas na dose de 5mg/kg. O Caprino A1, a partir de 3 horas após a administração da planta, apresentou aumento nos teores de albumina (Quadro 4). A concentração plasmática da albumina é determinada pela taxa de síntese hepática (único órgão que a produz) em equilíbrio com a degradação (Kaneko et al. 2008). Coutinho et al. (2013) encontraram em seu estudo 3 animais com hipoalbuminemia e somente um animal com hiperalbuminemia. De acordo com Eckersall (2008), a hipoalbuminemia pode ser causada pela deficiência na síntese de albumina associada à doença hepatocelular ou aumento da perda por glomerulopatia, inflamação intestinal severa ou linfangiectasia intestinal. Já a hiperalbuminemia neste estudo é provavelmente devido à desidratação.

Os níveis séricos de colesterol não apresentaram alterações em todos os caprinos (Quadro 5). A hipercolesterolemia pode ser causada pela dieta ou também por insuficiência hepática. Como o colesterol é eliminado na forma de ácidos biliares, o aumento da sua concentração no plasma pode estar associado com obstrução biliar extra-hepática, fibrose hepática e hiperplasia de ductos biliares (Araújo & Silva

2008, Kaneko et al. 2008). O colesterol pode ser usado como indicador direto do balanço energético em ruminantes, assim como triglicerídeos, β-hidroxibutirato e ácidos graxos não esterificados (Fernandes et al. 2012).

Os níveis séricos de glicose estão apresentados no Quadro 6. O Caprino A1 apresentou um aumento da glicemia 3 e 6 horas após a administração da planta, enquanto 12 horas houve severa hipoglicemia. Em 24 horas após a primeira administração houve hiperglicemia em todos os grupos, que pode ser atribuída à alimentação.

Achados patológicos

Na necropsia do Caprino A1, foi observado fígado apresentando aspecto de noz moscada ao corte e presença da planta no rúmen, retículo, omaso, abomaso e duodeno; os demais órgãos se encontravam macroscopicamente sem alterações dignas de nota. Ao exame histológico do fígado, foi verificado que os hepatócitos da região centrolobular apresentavam citoplasma intensamente eosinofílico, com núcleos picnóticos ou fragmentados (necrose centrolobular). Na região mediazonal, foram observados hepatócitos contendo microvacúolos intracitoplasmáticos bem delimitados (degeneração) e infiltrado neutrofilico moderado (Figs. 2A e 2B). Os demais órgãos se apresentaram histologicamente normais. Na biopsia hepática do Caprino A2, foram observados hepatócitos da região centrolobular com citoplasma intensamente eosinofílico, com núcleos picnóticos ou fragmentados (necrose centrolobular). Na região mediazonal, observou-se hepatócitos contendo microvacúolos intracitoplasmáticos bem delimitados (degeneração), infiltrado neutrofilico moderado e discreta hemorragia (Figs. 2C e 2D). Após 15 dias da administração das folhas, foi realizada outra biopsia hepática e o caprino já se encontrava sem alterações na morfologia das células hepáticas, sendo somente encontrado pequenas áreas de extravasamento de hemácias (hemorragia). Os demais caprinos submetidos à biopsia hepática não apresentaram alterações dignas de nota.

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

Quadro 3. Níveis de proteínas totais (g/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas de *Cestrum axillare* (A1 e A2)

Tempos (horas)	A1	A2	S1	S2	C1	C2
0	6,33	6,47	5,78	5,54	5,16	5,02
3	7,18	6,44	6,05	5,38	5,62	5,39
6	7,69	5,86	5,95	5,42	5,51	5,41
12	9,66	6,53	5,57	5,38	5,28	5,34
24	-	5,26	5,47	5,53	5,29	5,37
27	-	5,31	5,76	5,55	5,53	5,57
30	-	6,99	5,70	5,63	5,64	5,30
48	-	5,99	5,46	5,02	5,64	5,31

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

Quadro 4. Níveis de albumina (g/L) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas de *Cestrum axillare* (A1 e A2)

Tempos (horas)	A1	A2	S1	S2	C1	C2
0	3,54	3,30	3,11	3,34	3,10	3,08
3	3,96	3,32	3,71	2,6	3,20	3,27
6	4,70	2,99	3,58	2,67	3,14	3,27
12	5,32	3,40	3,44	2,71	3,10	3,26
24	-	2,83	3,37	2,73	3,08	3,27
27	-	2,90	3,43	2,74	3,23	3,25
30	-	3,52	3,37	2,79	3,24	3,22
48	-	3,16	3,12	2,55	3,14	3,15

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

Quadro 5. Níveis de colesterol (mg/dL) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas de *Cestrum axillare* (A1 e A2)

Tempos (horas)	A1	A2	S1	S2	C1	C2
0	72,47	61,90	103,21	107,8	53,90	54,97
3	66,71	61,90	118,15	46,96	57,53	59,02
6	68,52	54,11	108,01	44,40	56,03	58,06
12	68,52	62,65	102,67	44,93	57,42	58,81
24	-	57,95	99,26	53,90	58,38	58,70
27	-	59,55	103,10	53,90	62,01	59,02
30	-	75,35	102,35	54,22	63,40	59,66
48	-	62,76	100,65	50,27	67,67	65,96

Valores de referência segundo Kaneko et al. (2008) = 80-130mg/dL, Araújo & Silva (2008) = 91,7±25,1mg/dL.

Quadro 6. Níveis de glicose (mg/dL) em caprinos que receberam o extrato saponinas (S1 e S2), grupo controle (C1 e C2) e folhas de *Cestrum axillare* (A1 e A2)

Tempos (horas)	A1	A2	S1	S2	C1	C2
0	78,92	87,18	74,99	69,79	78,37	71,84
3	149,58	86,00	73,10	78,21	82,31	83,01
6	103,55	77,35	78,61	83,56	84,27	88,76
12	0,39	78,69	77,98	88,52	80,97	84,12
24	-	63,74	72,00	84,98	83,25	75,46
27	-	68,77	64,76	73,81	82,15	71,76
30	-	82,70	64,84	85,06	84,27	73,26
48	-	84,04	65,07	72,94	70,97	63,50

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

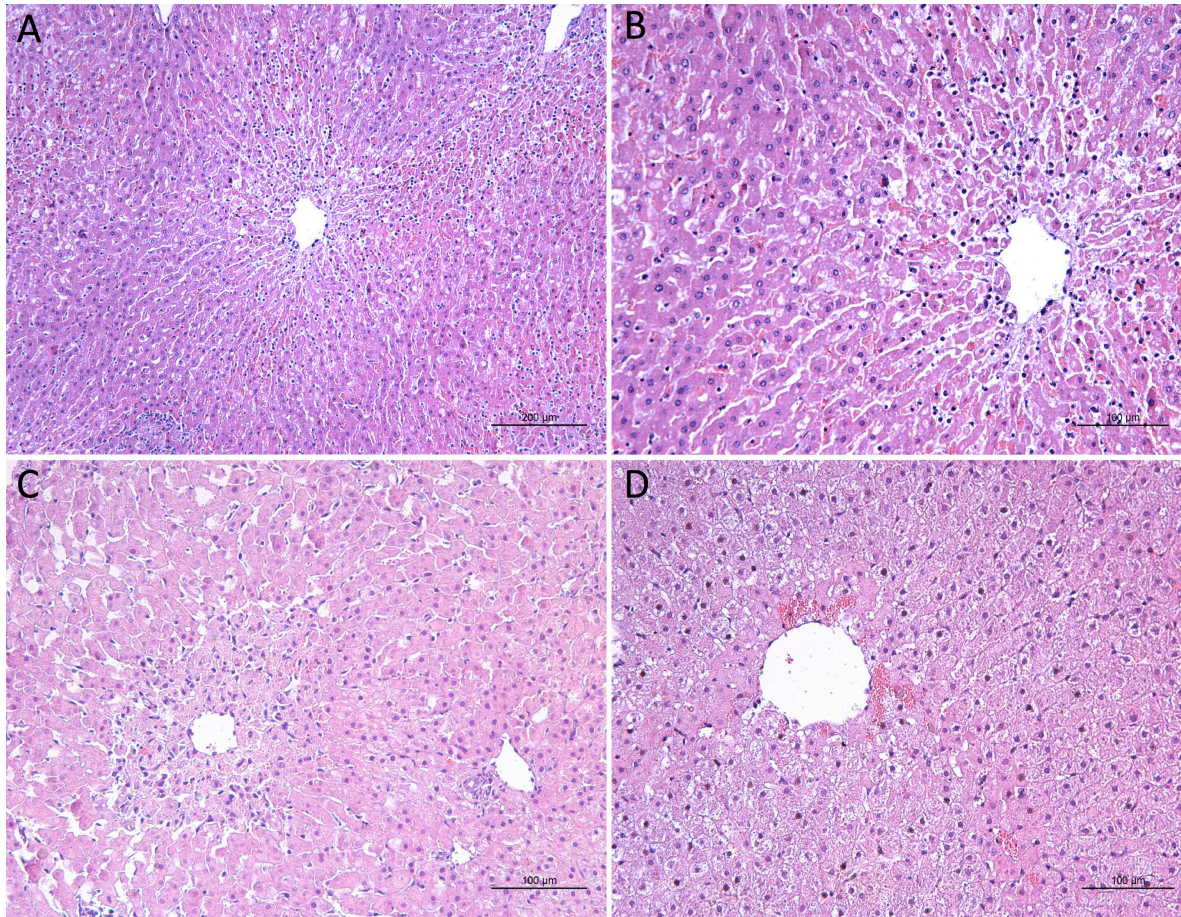


Fig.2. (A) Fígado de caprino que recebeu folhas de *Cestrum axillare* na dose de 10g/kg mostrando necrose nas áreas no entorno da veia centrolubular, vacuolização dos hepatócitos ao redor das áreas de necrose. HE, obj.10x. (B) Fígado do mesmo animal com neutrófilos entre as células necróticas, picnose, diferenciação entre as células necróticas e hepatócitos normais. HE, obj.20x. (C) Biopsia hepática de caprino que recebeu folhas de *C. axillare* na dose de 5g/kg apresentando necrose centrolubular aguda com vacuolização das células ao redor das áreas de necrose, picnose e cariorrexis e citoplasma eosinofílico. HE, obj.20x. (D) Biopsia hepática de caprino que recebeu folhas de *C. axillare* na dose de 5g/kg. Área de necrose centrolubular, hepatócitos ainda íntegros e discreta hemorragia. HE, obj.40x.

bom modelo experimental para o estudo dos efeitos tóxicos desta planta.

Um aspecto característico do fígado é a habilidade de regenerar de forma rápida e eficiente a massa hepática perdida. A necrose na área centrolubular do lóbulo leva a uma onda de proliferação de hepatócitos nas áreas remanescentes do lóbulo, particularmente de hepatócitos periportais. Um único episódio de necrose hepática extensa é geralmente seguido por regeneração parenquimatosa sem cicatriz, desde que a estrutura da matriz extracelular normal (reticulina) da parte afetada permaneça intacta e não entre em colapso (McGavin & Zachary 2013). Reconhece-se que a regeneração hepática é um evento que promove crescimento tecidual altamente ordenado e organizado. A perda do parênquima hepático, induzida por tratamento agudo, cirúrgico ou químico, desencadeia um processo regenerativo até que a massa hepática seja completamente restaurada. A restauração ocorre por hiperplasia celular compensatória do parênquima remanescente, de forma regulada e precisa, até o fígado atingir seu peso original, com pequena variação de 5 a 10% (Jesus et al. 2000).

A ausência de alterações clínicas e patológicas significativas nos caprinos que receberam o extrato de saponinas contendo digitogenina e gitogenina é indicativa que estas não são o princípio tóxico do *C. axillare*. Além disto, as alterações clínicas e patológicas induzidas pelas folhas desta planta são similares às induzidas pelo carboxiatractilosídeo, que foi sugerido como o provável princípio tóxico desta planta (Santos et al. 2008). De fato, Driemeier et al. (1999) relataram a intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (planta que possui como princípio tóxico carboxiatractilosídeos) em bovinos. Os sinais clínicos foram similares aos encontrados neste estudo e consistiam em anorexia, apatia, tenesmo retal com discreto prolapso de reto, desidratação progressiva com retração dos globos oculares e sinais nervosos como incoordenação motora, tremores musculares e agressividade. Além disto, os achados patológicos do fígado, caracterizados pela aparência macroscópica de aspecto de noz moscada e microscopicamente a necrose hepática, observados na intoxicação por *C. axillare* são similares as descritas na intoxicação de plantas que possuem como princípio tóxico os carboxiatractilosídeos (Cole et al. 1989), como *Xanthium cavanillesii* (Driemeier et al. 1999),

Xanthium strumarium (Turgut et al. 2005, Botha et al. 2014) e *Atractylis gummifera* (Carlier et al. 2014). No entanto, ainda não foi determinada a ocorrência de carboxiatractilosídeo nas folhas de *C. axillare*.

CONCLUSÕES

No presente estudo, foi verificado que as folhas secas de *Cestrum axillare*, quando administradas na dose de 10g/kg a um caprino, produziram efeitos tóxicos, com alterações na bioquímica (indicando lesão hepática) e histopatológica apresentando necrose hepática centrolobular.

Na dose de 5g/kg de folhas secas, não foi observado sintomatologia clínica da intoxicação, mas houve necrose hepática. Por outro lado, sinais de regeneração do parênquima hepático neste caprino foram observados 15 dias após a última administração das folhas.

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

A espécie caprina é um bom modelo experimental para estudos desta intoxicação.

REFERÊNCIAS

- Afonso E. & Santos H.L. 1995. Intoxicação experimental por coeranea Mart. ex. Sendt. (Solanaceae) em bovinos. *Pesq. Agropec. Bras.* 30(6):875-883.
- Araújo D.F. & Silva I.P. 2008. Valores de amilase, glicose, colesterol e triglicérides em soro de cabras de Mossoró, RN. *Acta Vet. Brasilica* 2(3):97-100.
- Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Pinheiro C., Lopes C.T.A., Marquiere D., Brito M.F., Yamasaki E.M. & Tokarnia C.H. 2010. Intoxicação por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) em bubalinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(12):1049-1052. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001200008>.
- Birgel E.H. 1969. Variações nos teores protéicos no sangue de caprinos durante o desenvolvimento etário. *Revta Fac. Med. Vet. Zootec.* 8(1):299-305. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2318-5066.v8i1p299-315>.
- Botha C.J., Lessing D., Rosemann M., van Wilpe E. & Williams J.H. 2014. Analytical confirmation of *Xanthium strumarium* poisoning in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26(5):640-645. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638714542867>. PMID:25012081.
- Brito M.F., França T.N., Oliveira L.I. & Ramos A.S. 2010. Intoxicação espontânea por *Cestrum laevigatum* em um caprino no Rio de Janeiro: relato de caso. *Revta Bras. Med. Vet.* 21(1):55-57.
- Canham P.A.S. & Warren F.L. 1950. The saponins: part I. The isolation of gitogenin and digitogenin from *Cestrum laevigatum*. *J. S. Afr. Chem. Inst.* 3(1):9-12.
- Carlier J., Romeuf L., Guitton J., Priez-Barallon C., Bévalot F., Fanton L. & Gaillard Y. 2014. A validated method for quantifying atractyloside and carboxyatractyloside in blood by HPLC-HRMS/MS, a non-fatal case of intoxication with *Atractylis gummifera* L. *J. Anal. Toxicol.* 38(9):619-627. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bku078>. PMID:24990875.
- Cole R.J., Cutler H.G. & Stuart B.P. 1989. Carboxyatractyloside, p.253-263. In: Cheeke P.R. (Ed.). *Toxicants of Plant Origin: glycosides*. Vol.2. CRC Press, Boca Raton.
- Coutinho L.T., Costa N.A., Mendonça C.L., Afonso J.A.B., Riet-Correa F., Dantas A.F.M. & Silva N.A.A. 2013. Intoxicação natural de bovinos leiteiros por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) no agreste de Pernambuco, Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.* 4(3):352-359.
- Cuartas Y.B. & Castano E.R. 2008. Descripción botánica y fitoquímica Del jazmín de noche (*Cestrum nocturnum* L.). *Boln Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas* 12(1):17-23.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H. & Canella C.F.C. 1969. Intoxicação por *Cestrum laevigatum* Schlecht., a causa de mortandades em bovinos no estado do Rio de Janeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 4(1):165-193.
- Diemeier D., Irigoyen L.F., Loretti A.P., Colodel E.M. & Barros C.S.L. 1999. Intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 19(1):12-18. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X199900100003>.
- Duarte A.L.L. 2007. Biópsia hepática guiada por videolaparoscopia em caprinos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 53p. Disponível em <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/89064/duarte_all_me_jabo.pdf?sequence=1> Acesso em 10 mar. 2016.
- Eckersall P.D. 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias, p.117-155. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6ª ed. Academic Press, Burlington. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00005-2>.
- Evans F.J. 1974. Thin-layer chromatography-mass spectrometry for the identification of saponin species. *Biomed. Mass Spectrom.* 1(3):166-168. <http://dx.doi.org/10.1002/bms.1200010304>. PMID:4433733.
- Fernandes S.R., Freitas J.A., Souza D.F., Kowalski L.H., Dittrich R.L., Rossi Junior P. & Silva C.J.A. 2012. Lipidograma como ferramenta na avaliação do metabolismo energético em ruminantes. *Revta Bras. Agrociências* 18(1/4):21-32.
- Gadelha I.C.N., Câmara A.C.L., Pacífico da Silva I., Batista J.S., Melo M.M. & Soto-Blanco B. 2015. Toxic effects of the pericarp of the *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong fruit on chicks. *Int. J. Applied Res. Vet. Med.* 13(2):135-140.
- Jesus R.P., Waitzberg D.L. & Campos F.G. 2000. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Revta Assoc. Med. Bras.* 46(3):242-254. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-4230200000300010>.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Academic Press, Burlington.
- Marques D.M. 2010. Intoxicação experimental por *Cestrum laevigatum* em bubalinos (*Bubalus bubalis*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém. 42p. Disponível em <http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/4703/1/Dissertacao_IntoxicacaoExperimentalCestrum.pdf> Acesso em 17 out. 2016.
- McGavin M.D. & Zachary J.F. 2013. *Bases da Patologia em Veterinária*. 5ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Néspoli P.B., Gheller V.A., Peixoto P.V., França T.N., Carvalho A.U., Araújo D.K.G. & Malm C. 2010. Avaliação de técnicas de biópsia hepática em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(1):29-36. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000100005>.
- Pinheiro R.R., Andrade M.L.R., Santiago L.B., Brito R.L. & Eloy A.M.X. 2008. Níveis de proteínas totais, albuminas, globulinas e gama-globulinas no soro de matrizes caprinas da raça Moxotó e Saanen criadas no semiárido nordestino. *Anais V Congresso Nordeste de Produção Animal, Aracaju, SE.*
- Santos J.C.A., Riet-Correa F., Simões S.V.D. & Barros C.S.L. 2008. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 28(1):1-14. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000100001>.
- Silva S.L., Flagliari J.J. & Cesco F.T.R.S. 2004. Atividade sérica das enzimas AST, ALP e GGT de caprinos das raças Anglo-Nubiana e Saanen criados nos Estados de São Paulo e Paraíba. *Ars Vet.* 20(1):22-27.
- Silva S.N., Carvalho A.M.V. & Santos F.A.R. 2003. *Cestrum* L. (Solanaceae) da mata higrófila do Estado da Bahia, Brasil. *Acta Scient. Biol. Sci.* 25(1):157-166. <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v25i1.2112>.

- Tennant B.C. & Center S.A. 2008. Hepatic function, p.379-412. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6^a ed. Academic Press, Burlington. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00013-1>.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. *Plantas Tóxicas do Brasil*. 2^a ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro.
- Turgut M., Alhan C.C., Gürgöze M., Kurt A., Doğan Y., Tekatli M., Akpolat N. & Aygün A.D. 2005. Carboxyatractilósido poisoning in humans. *Ann. Trop. Paediatr.* 25(2):125-134. <http://dx.doi.org/10.1179/146532805X45728>. PMID:15949201.
- Van der Lugt J.J., Nel P.W. & Kitching J.P. 1992. Experimentally-induced *Cestrum laevigatum* (Schlechtld.) poisoning in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 59(2):135-144. PMID:1513594.
- Van Der Lugt J.J., Nel P.W. & Kitching J.P. 1991. The pathology of *Cestrum laevigatum* (Schlechtld) poisoning in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 58(3):211-221. PMID:1923385.
- Vigo C.L.S., Narita E. & Marques L.C. 2003. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Speng.) Pedersen, Amaranthaceae. *Revta Bras. Farmacogn.* 13(Supl.2):46-49. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2003000400016>.