

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

INTOXICAÇÃO POR *Indigofera suffruticosa* EM CAPRINOS E OVINOS

ANNA PRISCILLA MOREIRA DE FIGUEIREDO

PATOS – PB

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

INTOXICAÇÃO POR *Indigofera suffruticosa* EM CAPRINOS E OVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Mestranda: Anna Priscilla Moreira de Figueiredo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosane Maria Trindade de Medeiros

Patos – PB

2011

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DA UFCG
CSTR - CENTRO DE PATOS - PB

F475r
2011

Figueiredo, Anna Priscilla Moreira de
Intoxicação por *Indigofera suffruticosa* em caprinos e ovinos / Anna
Priscilla Moreira de Figueiredo. - Patos: CSTR/PPGMV, 2011.

26 p.

Inclui bibliografia.

Orientador(a): Rosane Maria Trindade de Medeiros

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e
Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Plantas Tóxicas – Dissertação. 2 – Toxicologia Veterinária 3 -
Caprinos e ovinos - 4 – Pequenos ruminantes. I – Título.

CDU: 632.52

CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

INTOXICAÇÃO POR *Indigofera suffruticosa* EM CAPRINOS E OVINOS

Dissertação elaborada por

ANNA PRISCILLA MOREIRA DE FIGUEIREDO

Aprovada em

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Rosane Maria Trindade de Medeiros
UAMV da UFCG/CSTR – Patos/PB
(ORIENTADORA)

Prof. Dr. Pierre Castro Soares
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE
(EXAMINADOR I)

Prof. Antônio Flávio Medeiros Dantas
UAMV da UFCG/CSTR – Patos/PB
(EXAMINADOR II)

Patos – PB

2011

*Não só este trabalho, mais a
minha vida dedico aos meus pais, que
são a razão do meu viver.*

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, e por ter me dado forças para conseguir mais essa vitória.

Aos meus pais (Valdecy e M^a de Fátima), que sempre fizeram o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui, principalmente a minha mãe, que nunca mediu esforços para me fazer a pessoa mais feliz do mundo.

A minha irmã, Lorena, por todo o amor e a paciência que ela teve comigo durante essa caminhada.

Aos meus avós (Valdomiro e Raimunda), que são parte fundamental da minha vida.

A todos os meus tios e tias, que são parte essencial da minha vida, Valdeni, Roseni, Valmir (*In Memoriam*), Valdeir, Valdemar, José de Alecar, Vilmar, Regina, Adenes, Marivalda e Gorete, que ajudaram direta ou indiretamente na minha formação pessoal.

Aos meus primos (Neto, Júnior, Marcelo, Rodolfo, Camila, Rebeca, Bruno, Valmir, Vinícius, Pedro Ivo, Roberta, Maria Luiza, Raquel, Arthur, Lucas, Maria Clara, Marcos, Alberto, André e Rayce) por todo amor que dedicam a mim.

A France, Marina e Dantas, que são mais do que amigos, são parte da minha Família.

A Amélia Lizziane, que me ajudou muito, principalmente no início desse trabalho.

A todos os professores que me ajudaram a chegar até aqui.

A minha orientadora, Rosane, por toda a paciência que teve comigo, e por todos os ensinamentos que me passou, e por ser mais do que uma orientadora, sendo uma mãe para mim.

Aos funcionários da UFCG/CSTR, em especial, Gileno Alves (Cuité) e Odimar Lima (Finha) que sempre estiveram presentes quando eu precisei.

SUMÁRIO

| | Pág |
|---|-----|
| Capítulo I | |
| Plantas que causam anemia hemolítica em ruminantes..... | 1 |
| Introdução..... | 2 |
| <i>Brassica</i> | 4 |
| <i>Allium cepa</i> | 4 |
| <i>Ditaxis desertorum</i> | 5 |
| <i>Brachiaria radicans</i> | 6 |
| <i>Indigofera suffruticosa</i> | 7 |
| Referências..... | 10 |
| Capítulo II | |
| Intoxicação experimental por <i>Indigofera suffruticosa</i> em caprinos e ovinos..... | 13 |
| Abstract | 14 |
| Resumo | 14 |
| Introdução..... | 15 |
| Material e Métodos..... | 15 |
| Resultados..... | 17 |
| Discussão..... | 21 |
| Referências..... | 23 |

Lista de quadros

| | Pág. |
|--|------|
| Capítulo II | |
| Intoxicação experimental por <i>Indigofera suffruticosa</i> em caprinos e ovinos..... | 13 |
| Quadro 1 | |
| Animais experimentais, doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> administradas e início da anemia (hematócrito de menos de 20%)..... | 18 |
| Quadro 2 | |
| Parâmetros hematológicos avaliados dos caprinos e ovinos que ingeriram <i>Indigofera suffruticosa</i> em diferentes doses..... | 19 |
| Quadro 3 | |
| Parâmetros Hematológicos avaliados do caprino e ovino que ingeriram <i>Indigofera suffruticosa</i> na dose de 40 g/kg/pv..... | 20 |

CAPÍTULO I

Revisão da literatura

Plantas que causam anemia hemolítica em ruminantes

PLANTAS QUE CAUSAM ANEMIA HEMOLÍTICA EM RUMINANTES

Introdução

Anemia na maioria dos casos é um sintoma secundário de alguma doença e ocorre quando a quantidade de eritrócitos, de hemoglobina ou de ambos diminui. (Kerr 2003, Thrall 2007). A classificação da anemia pode ser dada pelo índice hematimétrico, por meio do valor do Volume Corpuscular Médio (VCM) e da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), sendo este o método mais aceito mundialmente. A anemia pode ser classificada como não regenerativa ou regenerativa. Na anemia não regenerativa ocorre perda normal de eritrócitos, no entanto, a produção destes está diminuída. Na anemia regenerativa ocorre aumento na perda dos eritrócitos, mas a produção destes permanece normal. As anemias são divididas em seis grupos: macrocítica hipocrômica, macrocítica normocrômica, microcítica hipocrômica, microcítica normocrômica, normocítica hipocrômica e normocítica normocrômica, sendo a anemia macrocítica hipocrômica a única das seis que é essencialmente regenerativa, esse tipo de anemia acontece por hemorragia ou hemólise (Figuera 2001, Kerr 2003).

Os principais sinais de anemia regenerativa são a presença de macrocitose, reticulocitose e hemácias nucleadas (Figuera 2001). Os sinais clínicos que um animal anêmico apresenta são causados por três mecanismos básicos: diminuição do éritron, hipóxia e compensação orgânica. Diminuição do éritron causa palidez de todas as mucosas e perda da viscosidade sanguínea, causando sopros cardíacos. A hipóxia ocorre em casos mais graves de anemia, ocorrendo cianose, intolerância ao exercício, dispnéia e disfunção orgânica geral. A taquicardia aparece como o principal sinal da compensação orgânica (Garcia-Navarro & Pachaly 1994, Figuera 2001).

Anemia Hemolítica

Na anemia hemolítica há aumento da concentração de hemoglobina no plasma, em decorrência da destruição excessiva dos eritrócitos. Ocorre quando há quebra na cadeia do metabolismo antioxidativo, levando à formação de metemoglobina e depois a formação dos corpúsculos de Heinz, que são inclusões intracelulares pálidas presentes nas hemácias, que apresentam de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro. Eles são formados quando ocorre desnaturação da metemoglobina. São observados facilmente em esfregaços corados pelo novo azul de metileno ou azul cresil brilhante, assemelhando-se a estruturas azuis (Thrall 2007).

A anemia hemolítica pode ser intravascular ou extravascular. Na anemia hemolítica intravascular, a destruição dos eritrócitos ocorre dentro dos vasos, onde a hemoglobina é liberada,

ficando livre no plasma sanguíneo. Quando isso ocorre, ela se liga a uma proteína, denominada haptoglobina, que é retirada da circulação sanguínea pelo sistema fagocítico mononuclear. A hemoglobina que não se liga com a haptoglobina é oxidada em metemoglobina, que também é retirada pelo sistema fagocítico mononuclear. Quando a quantidade de hemoglobina dentro do plasma é maior que a quantidade de haptoglobina, a hemoglobina é excretada pela urina, causando hemoglobinúria (Figuera 2001). A anemia decorrente da hemólise pode causar necrose tubular isquêmica; a hemoglobina eliminada na urina pode ter efeito deletério adicional sobre o epitélio tubular (McGavin & Zachary 2009)

Na anemia hemolítica extravascular, a destruição dos eritrócitos ocorre fora dos vasos e eles são capturados pelo sistema fagocítico mononuclear, principalmente no fígado e baço. Os eritrócitos são fagocitados, ocorrendo liberação da hemoglobina a qual é degradada e reaproveitada para sintetizar hemoglobina e originar a bilirrubina (Figuera 2001).

Dentre os agentes que causam hemólise estão as bactérias *Clostridium perfringens* tipo A, *C. haemoliticum* e *Leptospira interrogans*, as quais produzem toxinas que causam hemólise; os hemoparasitas *Anaplasma* spp., *Eperythrozoon ovis* e *Babesia* spp.; os fármacos benzocaína, vitamina K, azul de metileno, propilenoglicol, acetaminofen, propofol, fenozopirimidina, fenotiazina, fenilidrazina e naftaleno; substâncias químicas como zinco, cobre, nitratos e nitritos e plantas como couve (*Brassica* spp.), cebola (*Allium cepa*), bordo vermelho (*Acer rubrum*), tanner-grass (*Brachiaria radicans*), *Ditaxis disertorum* e anil (*Indigofera suffruticosa*) (Garcia-Navarro & Pachaly 1994, Figuera 2001).

Algumas plantas tóxicas afetam mais os não ruminantes do que os ruminantes, porque em ruminantes o ataque microbiano sobre compostos tóxicos ocorre antes de serem expostos à digestão gástrica e absorção. A esse respeito, a microflora ruminal seria considerada como a primeira linha de defesa contra compostos tóxicos em alimentos, e a degradação de material tóxico pela microflora ruminal provavelmente tem tido um papel no sucesso competitivo de espécies ruminantes. Em alguns casos as variações das dietas podem levar à seleção de populações microbianas que degradam substâncias tóxicas específicas mais rapidamente. Tais adaptações são na realidade manipulação da população microbiana, e os fatores mais bem conhecidos, que estão envolvidos melhorariam as decisões de manejo acerca da mudança de dieta. Em contraste com essas ações benéficas, a microflora ruminal também pode produzir compostos tóxicos. Em alguns casos esses produtos podem ser subsequentemente detoxificados pelos micróbios, mas as últimas reações podem não ocorrer rapidamente o bastante para evitar o acúmulo de concentrações prejudiciais de intermediários tóxicos (Pugh 2004).

Plantas que causam anemia hemolítica

Plantas do gênero *Brassica* spp. (repolho, nabo, couve, couve-flor) causam anemia hemolítica em ruminantes, mas não em monogástricos (Cheeke 1998). Estas plantas contêm glicosinolatos e um aminoácido chamado S-metilcisteína sulfóxido (SmCo). O agente causador da anemia, chamado de dimetil dissulfeto é uma substância oxidante (Thrall 2007), produto do metabolismo do SmCo no rúmen, o qual é realizado pelos microrganismos como *Lactobacillus* spp., *Veillonella alcalescen*, *Anaerovibrio lipolytica* e *Megasphaera elsderri* (Pugh 2004). A hemólise ocorre geralmente entre 1 e 2 dias após a ingestão da substância tóxica (Thrall 2007), exceto na intoxicação por cobre onde a hemólise ocorre após a liberação do mesmo no fígado (Stalker e Hayes 2007).

Em bovinos o envenenamento espontâneo por estas plantas resulta em recuperação parcial seguido de ciclos de anemia e de recuperação, devido provavelmente a uma adaptação parcial dos microorganismos do rúmen produzindo menos dimetil dissulfeto (Cheeke 1998). Animais monogástricos não são afetados pelas plantas do gênero *Brassica* porque o SmCo é absorvido no intestino delgado antes de atingir o ceco, onde ocorre a fermentação bacteriana (Cheeke 1998).

A anemia hemolítica tem sido relatada em ruminantes e não ruminantes após a ingestão de cebola comum (*Allium cepa*) e cebola silvestre (*Allium validum*), onde bovinos, caninos e felinos são mais susceptíveis, os equinos e caprinos estão no nível intermediário de susceptibilidade e os ovinos são os mais resistentes (Cheeke 1998, Figuera et al. 2002). A ingestão de cebola comum por gatos, cães, cavalos e ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos), resulta em metemoglobinemia, anemia hemolítica e a presença de corpúsculos de Heinz nos eritrócitos, podendo levar os animais a óbito se o consumo não for descontinuado (Figuera et al. 2002, Rae 1999).

O ingrediente ativo da cebola é o n-propil dissulfeto, um oxidante que, provavelmente, causa inibição das enzimas das vias do metabolismo energético (glicólise anaeróbica e pentose fosfato) (Figuera 2002, Jain 1986), com isso ocorre a queda na quantidade de NADH e NADPH, causando a quebra do mecanismo antioxidativo, levando a hemoglobina a se transformar em metemoglobina (Figuera 2001).

Estudos recentes têm demonstrado que plantas do gênero *Allium* contêm mais de uma toxina que causa anemia hemolítica, além do n-propil dissulfeto, são os ácidos aminados relativamente raros S-metilcisteína sulfóxido (SmCo) e S-propilcisteína sulfóxidos, esses dissulfetos são responsáveis pela oxidação do eritrócito (Borelli et al. 2009, Rae 1999).

No entanto, S-metilcisteína sulfóxido (SmCo) é hidrolisado no rúmen para thiosulfonate, que é posteriormente metabolizado em dissulfetos dipropil e dissulfetos dipropenil. Um estudo

recente mostrou que os dissulfetos dipropenil insaturados podem ser agentes hemolíticos mais poderosos do que o n-propil dissulfeto (Rae 1999).

A toxicidade da cebola depende de outros fatores como a variação da susceptibilidade da espécie. As cebolas contêm quantidades variáveis de toxinas dissulfeto e SmCo, dependendo da espécie de cebola, época do ano, e as condições de crescimento. Armazenar as cebolas em grandes pilhas também proporciona um ambiente propício para a contaminação da cultura com outras toxinas, como as micotoxinas, que podem contribuir para o processo de outras doenças (Rae 1999).

Em búfalos ocorre intoxicação pelo consumo de cebolas, apresentado os seguintes sinais clínicos: mucosas pálidas, letargia, vocalização constante, tenesmo, dispnéia, urina com coloração escura e presença de odor de cebola na respiração. Na necropsia é observado mucosas pálidas, diminuição da coagulação e da viscosidade sanguínea, petequias multifocais, equimoses na pele e urina, rins com coloração escura, pedaços de cebola no conteúdo ruminal e forte odor de cebola no conteúdo ruminal e nos músculos esqueléticos. Na microscopia renal são observados degeneração e necrose tubular renal e depósitos de material eosinofílico contendo hemoglobina nos túbulos. No fígado é observada necrose coagulativa moderada multifocal centrolobular (Borelli et al. 2009).

Ditaxis desertorum (sem nome vulgar) é uma planta encontrada no Oeste da Bahia, que causa anemia hemolítica em bovinos. Quando administrada na dose única de 7,7 g/kg ou em doses médias de 2,5 e 3,0 g/kg por dois dias seguidos, provocam quadro clínico de cólica e levam os animais a morte em poucas horas. Quando administrada em dose menores de 1,0 a 2,5 g/kg diariamente levam a um quadro de anemia com hemoglobinúria a partir do 4º ao 8º dia de ingestão (Tokarnia et al. 1997).

No quadro clínico, caracterizado por cólica seguida de morte, ocorre grande edema da parede do rúmen, principalmente na região do sulco esofágico e da parede do retículo. As papilas ruminais apresentam-se avermelhadas e em algumas áreas a lâmina própria das papilas fica exposta e também avermelhada. Observa-se também leve ascite e leve esplenomegalia.

No quadro de anemia hemolítica os animais podem apresentar alguns sinais de cólica no primeiro dia de ingestão da planta e anemia com hemoglobinúria a partir do 4º dia de ingestão até o dia da morte, que ocorre aproximadamente no 8º dia de ingestão. Alguns animais podem ter anemia com hemoglobinúria e mesmo com a continuidade da ingestão da planta podem se recuperar após 12 a 14 dias de ingestão da planta, tendo rápida recuperação dos valores sanguíneos.

Os achados de necropsia são alterações no aparelho digestivo, mucosas esbraquiçadas, sangue aquoso, bexiga contendo urina com cor de vinho tinto, rins aumentados de volume com consistência de borracha, córtex renal na superfície e ao corte com coloração marrom-escura, moderada esplenomegalia, o fígado com coloração alaranjada na superfície e ao corte, apresentando também um aspecto mosqueado, a vesícula biliar apresenta-se distendida por bile verde-grossa e

mucosa, o rúmen, omaso, ceco e colón apresentam-se com conteúdo ressequidos. Na histopatologia ocorrem principalmente lesões de desprendimento do epitélio na parede do rúmen, congestão da lâmina própria, edema, congestão e hemorragia da submucosa e edema da muscular e da serosa, em alguns casos acompanhado de congestão e hemorragia, necrose de coagulação centrolobular acentuada, os rins apresentam grande quantidade de cilindros densos, com coloração vermelho-amarronzada na luz dos túbulos uriníferos e no espaço de Bowman e gotas de diversos tamanhos nas células epiteliais dos túbulos uriníferos, o baço apresenta-se com acentuada congestão (Tokarnia et al. 1997).

Brachiaria radicans popularmente conhecida como capim “tanner-grass” é uma gramínea encontrada principalmente no litoral, caracterizada como sendo uma planta invasora, se desenvolvendo mais rapidamente em solos úmidos. Possui ótima palatabilidade, o que provoca grande ingestão desta planta pelos bovinos, podendo causar anemia hemolítica nesses animais. O princípio ativo desta planta é desconhecido. Os sinais clínicos da intoxicação por *B. radicans* são urina de cor âmbar, chegando a ficar escura se o animal continuar a ingestão da planta, causa também diarreia, perda de peso, diminuição do apetite, os animais demonstram cansaço, principalmente durante as horas mais quentes do dia, podendo causar a morte dos animais (bovinos) quando estes são movimentados nestas horas, devido ao estresse e a anemia causada pela intoxicação com a planta. Os animais que vivem em regiões onde ocorre a presença da *B. radicans* ficam “adaptados” e podem se intoxicar, porém com sinais mais leves, já os animais trazidos de outras regiões para as áreas onde ocorre a planta, se intoxicam gravemente (Gava et al. 2010, Gava 1993).

Os sinais clínicos da intoxicação se manifestam a partir do 3º ou 4º dias após a ingestão da planta. Observa-se a coloração da urina escurecendo a partir do 6º a 7º dias de ingestão e as fezes se apresentam amolecidas. O sangue é aquoso, com coloração vermelho-marrom, a esclera e a conjuntiva se apresentam nesta coloração também. Ocorre perda de peso e a respiração fica acelerada, sendo agravada quando o animal é movimentado. O animal morre entre o 3º e 4º dia após a urina começar a ficar escura. A recuperação ocorre poucos dias depois que eles são retirados da pastagem de “tanner-grass” (Gava et al. 2010).

Na necropsia observa-se a serosa intestinal, a esclera e a conjuntiva com coloração vermelho-marrom. Os rins ficam tumefeitos e escuros. O fígado apresenta-se com áreas escuras intercaladas com áreas levemente amareladas. Na histologia observa-se necrose coagulativa centrolobular e paracentral. Os rins apresentam nefrose caracterizada por tumefação do epitélio tubular, contendo grande quantidade de gotículas hialinas no citoplasma e cilindros hialinos na luz dos túbulos (Gava et al. 2010, Gava 1993).

A intoxicação ocorre quando 75% da dieta dos animais é composta por *B. radicans* plantada em solos férteis ou quando 100% da dieta dos animais é composta por *B. radicans* plantada em solos argilosos (Gava et al. 2010).

Uma diferença entre *B. radicans* e as plantas hepatotóxicas de ação aguda é que na intoxicação por *B. radicans*, nas áreas de necrose hepática, não se observa a presença de hemácias porque a anóxia é causada pela anemia hemolítica, e não pelo princípio tóxico da planta (Gava et al. 2010). Além disso, a necrose observada é paracentral (Salvador et al. 2010).

O diagnóstico da intoxicação é realizado pelos sinais clínicos, epidemiologia da intoxicação e principalmente pela presença em grande quantidade e de crescimento vigoroso da *B. radicans* (Gava et al. 2010). Na intoxicação por *B. radicans* não ocorre febre nem icterícia, o que diferencia da infecção por babesia e hemoglobinúria bacilar, apesar de ambas causarem urina escura. Na intoxicação por *Lantana* spp. pode ocorrer a presença de urina escura nos bovinos, podendo ser diferenciada da intoxicação por *B. radicans* porque essa planta não provoca fotossensibilização (Gava et al. 2010).

Indigofera suffruticosa (anil, anileira) é uma planta invasora, arbustiva, com até 2 metros de altura, da família *Papilionoideae*, encontrada em todo o Nordeste. Originária das Antilhas e América Central é pouco exigente, nascendo em qualquer tipo de solo (Alzugaray & Alzugaray 1988, Lorenzi 2000). Durante a época da chuva *I. suffruticosa* brota rapidamente, permanecendo verde durante todo o período chuvoso, e na época seca, permanece viva, porém visualizando-se apenas os galhos e algumas vagens secas. Em anos de boa pluviosidade aparece em quantidade suficiente para causar surtos de intoxicação (Riet-Correa et al. 2009).

É tóxica para bovinos (Barbosa Neto et al. 2001), caprinos e ovinos (Figueiredo et al. 2011, dados não publicados) nas doses de 10 a 40 g/kg/dia, e para cobaios (*Cavia porcellus*) a dose tóxica é 10g/kg/dia (Salvador et al. 2011). Os bovinos começam a apresentar os sinais clínicos a partir do 6º dia, com a ingestão de 10 g/kg/dia. Os bovinos intoxicados apresentam anemia hemolítica intravascular com hemoglobinúria que pode ser passageira, mesmo com a continuação da ingestão da planta, porém se os animais estiverem com o estado corporal ruim, eles podem morrer, mesmo se a ingestão da planta for interrompida (Barbosa Neto et al. 2001).

Os sinais clínicos apresentados pelos bovinos são hemoglobinúria, apatia, mucosas ocular, prepucial e bucal esbranquiçadas, pêlos arrepiados, anorexia, diminuição da frequência e intensidade dos movimentos ruminais, taquicardia intensa, com alteração no ritmo e na intensidade da frequência cardíaca, pulso venoso positivo, vasos episclerais pouco visíveis, aumento na frequência e na intensidade dos movimentos respiratórios. Há coloração azulada na mucosa prepucial, devido ao pigmento presente na planta. Após a centrifugação do sangue, o plasma

apresenta-se hemolizado durante a fase da hemoglobinúria. Antes da crise hemolítica, a urina apresenta coloração verde azulada (Barbosa Neto et al. 2001).

Na necropsia pode ser visto mucosas pálidas, sangue aquoso, bexiga contendo urina cor de vinho tinto, rins aumentos de volume com coloração marrom-escuro, fígado na superfície e ao corte apresentando coloração azulada e lobulação perceptível (Barbosa Neto et al. 2001, Salvador et al. 2010).

Na histologia, os principais órgãos afetados são o fígado e os rins. No fígado podem ser vistas áreas de necrose coagulativa, caracterizada por marcada eosinofilia citoplasmática e figuras de picnose ou cariorrexia, principalmente nos hepatócitos das zonas centrolobulares. As lesões se caracterizam por sua irregularidade, pois podem ser encontradas nas veias centrolobulares, nas veias sublobulares ou próxima aos vasos, causando necrose paracentral. Observa-se também tumefação e microvacuolização citoplasmática com leve picnose nuclear, principalmente nas zonas intermediárias do lóbulo hepático. Pode ocorrer retenção de bile, formando trombos biliares. Nos rins ocorre acentuada nefrose caracterizada por tumefação e degeneração, podendo ocorrer lise das células epiteliais dos túbulos do córtex e da junção corticomedular, com grande quantidade de filtrado glomerular e hemoglobina nos espaços de Bowman, nos túbulos, em forma de glóbulos, grânulos ou cilindros. Ocorre degeneração em gotas hialinas dentro do citoplasma das células epiteliais e, no rúmen ocorre hiperqueratose (Barbosa Neto et al. 2001, Salvador et al. 2010).

Os caprinos também começam a apresentar os sinais clínicos a partir do 6º dia, com a ingestão de 10 g/kg/dia, os ovinos a partir do 3º dia, porém estes são mais resistentes a intoxicação e reagem mais rápido do que os caprinos e bovinos, sendo que os bovinos são os mais susceptíveis à intoxicação por *I. suffruticosa* (Cheeke 1998, Figuera et al. 2002, Rae 1999).

Os caprinos e ovinos apresentam anemia hemolítica extravascular, caracterizada pela ausência de hemoglobinúria, pois a hemólise ocorre no baço e não na corrente sanguínea, desta forma não se observa hemoglobinúria, ocorrendo recuperação espontânea, mesmo com a continuidade do consumo da planta, quando estes estão com o estado corporal bom (Figueiredo et al. 2011, dados não publicados). Os caprinos que ingeriram 10 g/kg/pv de *I. suffruticosa* apresentaram anemia no 16º dia de ingestão da planta e começaram a se recuperar da anemia no 24º dia de ingestão. Os caprinos que ingeriram 20 g/kg/pv da planta, apresentaram o pico da anemia no 15º dia em média e só apresentaram recuperação entre 2 e 3 dias depois que pararam a ingestão da planta (Figueiredo et al. 2011, dados não publicados).

Os ovinos mostraram-se mais resistentes à intoxicação pela *I. suffruticosa*, pois quando eles ingeriram 10 g/kg/pv da planta, o pico da anemia foi no 3º dia de ingestão, e na dose de 20 g/kg/pv da planta, o pico da anemia foi no 5º dia de ingestão. Nas duas doses os ovinos se recuperaram entre dois e três dias, mesmo com a ingestão da planta, que foi administrada durante 12 dias nas duas

doses. Nenhum dos animais desse experimento apresentou hemoglobinúria, nem icterícia, que são sinais de anemia hemolítica intravascular, demonstrando que essa anemia hemolítica é extravascular (Figueiredo et al. 2011, dados não publicados).

Os cobaios (*Cavia porcellus*) começam a apresentar os sinais clínicos (apatia e presença de pigmento azulado na urina) da intoxicação a partir do 1º dia de ingestão da planta (Salvador et al. 2011). Esses animais apresentam anemia hemolítica extravascular, mas não apresentam recuperação espontânea da anemia, como ocorre nas outras espécies (Salvador et al. 2011).

Embora pouco se saiba sobre a patogênese da intoxicação pela *I. suffruticosa* em animais, é possível que a anemia hemolítica seja causada pela presença de anilina na planta. Casos de crise hemolítica tóxica em seres humanos (Williams e Challis, 1933; Hughes & Treon 1954) e metemoglobinemia (Smith & Olson 1973, Anônimo 2001) causada por intoxicação por anilina são conhecidas há quase um século.

Sabe-se que após a ingestão, a anilina é metabolizada no fígado (Smith & Olson 1973, Kiese 1974, Khan et al. 1998) em fenilhidroxilamina (Harrison & Jollow 1987) e nitrobenzeno (Von Jagow et al. 1966, Murayama 1960, Kiese 1966, Khan et al. 2000) e induz alterações no metabolismo dos eritrócitos, formação de corpúsculos de Heinz (a maior tendência para formar corpúsculos de Heinz resulta, principalmente, pelo número de grupos sulfidrila na hemoglobina (McLean et al. 1969)) e redução de 50% nos níveis de eritrócitos (Pauluhn 2004). Esta alteração nas células vermelhas resulta em diminuição no metabolismo da síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). O NADH é um nucleotídeo formado pela via da pentose fosfato (Murayama 1960), sendo uma co-enzima importante na redução do glutation pela glutation-redutase (Harvey 1989). Em casos de intoxicação por primaquina (Bolchoz et al. 2001) e fenacetina (Jensen & Jollow 1991), os dois derivados conhecidos da anilina, a diminuição da NADH é acentuada, resultando na queda da atividade da glutation-redutase. A ação indireta dessas drogas sobre a atividade da glutation-redutase faz com que a maior parte do glutation oxidado permaneça nos eritrócitos, comprometendo a sua função antioxidante (Bowman et al. 2004). Assim, 3% a 5% de hemoglobina é oxidada diariamente em metemoglobina, não podendo ser reduzida, é então acumulada (Khan et al. 1993, Valentovic et al. 1997) e desnaturada pelos organismos que dão origem aos corpúsculos de Heinz (Pauluhn 2004). Após a formação das inclusões, os eritrócitos começam a serem retirados da circulação pelo sistema fagocítico mononuclear (hemólise extravascular) através dos sítios antigênicos ocultos nas criptas (Singh et al. 2007). A susceptibilidade de cobaios à intoxicação pela *I. suffruticosa* sugere que o agente desta planta é diferente do SmCo, uma vez que a intoxicação por essa substância causa anemia intravascular.

No Brasil, *B. radicans* (Gava et al. 2010), *Ditaxis desertorum* (Tokarnia et al. 1997) e *I. suffruticosa* (Barbosa Neto et al. 2001) causam anemia hemolítica em bovinos e *Allium cepa* em búfalos (Borelli et al. 2009).

Experimentalmente a intoxicação pela *D. desertorum* em bovinos tem características semelhantes à intoxicação pela *I. suffruticosa*, ocorrendo recuperação espontânea, apesar de os animais continuarem a ingestão da planta (Tokarnia et al. 1997), no entanto, não existem experimentos de longa duração mostrando que a recuperação está completa ou se ocorre reincidência da intoxicação se os animais continuarem a ingerir a planta. Com a *B. radicans*, a recuperação espontânea é relatada somente quando o gado para de ingerir a planta (Gava et al. 2010).

REFERÊNCIAS

- Alzugaray D. & Alzugaray K. 1988. Enciclopédia de plantas brasileiras. Editora Três, São Paulo. p. 54.
- Anônimo, 2001. Aniline-Acute exposure guideline levels. Inhalation. Toxicol. 13 (Suppl.), 7–42.
- Barbosa Neto J.D., Oliveira C.M.C., Peixoto P.V., Barbosa I.B.P., Ávila S.C. & Tokarnia C.H. 2001. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 21 (1): 18-22.
- Bolchoz L.J., Budinsky R.A., McMillan D.C., & Jollow D.J. 2001. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. J Pharmacol Exp Ther 297:509–515.
- Borelli B., Luciola J., Furlan F.H., Hoepers P.G., Roveda J.F., Traverso S.D. & Gava A. 2009. Fatal onion (*Allium cepa*) toxicosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*). J. Vet. Diagn. Invest. 21 (3), 402–405.
- Bowman Z.S., Oatis J.E.Jr., Whelan J.L., Jollow D.J. & Mcmillan D.C. 2004. Primaquine-Induced Hemolytic Anemia: susceptibility of normal versus glutathione-depleted rat erythrocytes to 5-Hydroxyprimaquine. J Pharmacol Exp Ther. 309 (1): 79-85.
- Cheeke P.R. 1998. Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants. 2nd ed. Danville, Illinois. p.302-306.
- Figuera R.A. 2001. Anemia em medicina veterinária. Editora Pallotti, Santa Maria, 214p.
- Figuera R.A., Souza M.T., Langohr I. & Barros C.S.L. 2002. Intoxicação experimental por cebola, *Allium cepa* (Liliaceae), em gatos. Pesq. Vet. Bras. 22(2):79-84.
- Garcia-Navarro C.E.K. & Pachaly J.R. 1994. Manual de hematologia veterinária. Editora Varela, São Paulo. pp. 117.

- Gava A., Simone de Deus M.R., Branco J.V., Mondadori A.J. & Barth A. 2010. Intoxicação espontânea e experimental por *Brachiaria radicans* (tanner-grass) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):255-259.
- Gava A. 1993. Intoxicação por *Brachiaria radicans*, p.319-322. In: Riet-Correa F., Méndez M.C. & Schild A.L. (Eds), *Intoxicação por Plantas e Micotoxinoses*. Editorial Hemisfério Sul do Brasil, Pelotas.
- Jain N.C. 1986. *Schalm's Veterinary Hematology*. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 1221p.
- Jensen C.B. & Jollow D.J. 1991. The role of N-hydroxyphenetidine in phenacetin-induced hemolytic anemia. *Toxicol Appl Pharmacol* 111:1-12.
- Harrison J.J.R. & Jollow D.J. 1987. Contribution of aniline metabolites to aniline-induced methemoglobinemia. *Mol Pharmacol.* 32:423-431.
- Harvey J.W. Erythrocyte metabolism. p. 185-273. 1989. In: Kaneko J.J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th ed. Academic Press, San Diego.
- Hughes J.P. & Treon J.F. 1954. Erythrocytic inclusion bodies in the blood of chemical workers. *AMA Arch. Ind. Health.* 10, 192.
- Khan M.F., Kaphalia B.S., Boor P.J. & Ansari G.A. 1993. Subchronic toxicity of aniline hydrochloride in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24 (3):368-74.
- Khan M.F., Green S.M., Ansari G.A. & Boor P.J. 1998. Phenylhydroxylamine: role in aniline-associated splenic oxidative stress and induction of subendocardial necrosis. *Toxicol Sci.* 42 (1): 64-71.
- Khan M.F., Wu X. & Ansari G.A. 2000. Contribution of nitrosobenzene to splenic of aniline. *J Toxicol Environ Health A.* 60(4):263-73.
- Kerr M.G. 2003. *Exames laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica clínica e hematologia*. 2ª ed. Rocca, São Paulo. 436p.
- Kiese M. 1966. The biochemical production of ferrihemoglobin-forming derivatives from aromatic amines, and mechanisms of ferrihemoglobin formation. *Pharmacol Rev.* 18(3): 1091-161.
- Kiese M. 1974. *Methemoglobinemia: A Comprehensive Treatise*. CRC Press, Cleveland, OH. 260 p.
- Lorenzi H. 2000. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*. 3.ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 608 p.
- McGavin M.D. & Zachary J.F. 2009. *Bases da Patologia em Veterinária*. 4.ed. Elsevier (Mosby), Rio de Janeiro. 1504p.
- McLean S., Stamer G.A. & Thomas J. 1969. Methaemoglobin formation by aromatic amines. *J. Pharm. Pharmacol.* 21 (7): 441-50.

- Murayama M. 1960. The Combining Power of Normal Human Hemoglobin for Nitrosobenzene. *The Journal of Biological Chemistry*. 235:1024-1028.
- Pauluhn J. 2004. Subacute Inhalation Toxicity of Aniline in Rats: Analysis of Time-Dependence and Concentration-Dependence of Hematotoxic and Splenic Effects. *Toxicological Sciences*. 81, 198–215.
- Pugh D.G. 2004. *Clínica de ovinos e caprinos*. 1ª Ed. Roca, São Paulo. pp. 513.
- Rae H.A. 1999. Onion toxicosis in a herd of beef cows. *Can Vet J*. 40: 55-57.
- Riet-Correa F., Medeiros R.M.T., Pfister J., Schild A.L. & Dantas A.F.M. 2009. Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in brazilian livestock. Editora da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB. 246p.
- Salvador I.S., Medeiros R.M.T., Pessoa C.R.M., Dantas A.F.M., Sucupira Júnior G. & Riet-Correa F. 2010. Intoxicação por *Indigofera suffruticosa* (leg. *papilionoideae*) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(11):953-957.
- Salvador I.S., Medeiros R.M.T., Pessoa C.R.M., Oliveira D.M., Duarte A.L.L., Figuera R.A. & Riet-Correa F. 2011. Experimental poisoning of guinea pig (*Cavia porcellus*) with *Indigofera suffruticosa*. *Toxicon*. 57, 927–931.
- Singh H., Purnell E. & Smith C. 2007. Mechanistic study on aniline-induced erythrocyte toxicity. *Arh Hig Rada Toksikol*. 58:275-285.
- Smith R.P. & Olson M.V. 1973. Drug-induced methemoglobinemia. *Semin. Hematol*. 10, 253–268.
- Stalker M.J. & Hayes M.A. 2007. Liver and biliary system, p.298-388. In: Jubb, Kennedy and Palmer's. *Pathology of Domestic Animals*. Chap.2. 5ª Ed. Elsevier Saunders, New York. p. 298-388.
- Thrall M.A. 2007. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. Roca, São Paulo. 582p.
- Tokarnia C.H., Chagas B.R., Chagas A.D. & Silva H.K. 1997. Anemia hemolítica causada por *Ditaxis desertorum* (*Euphorbiaceae*) em bvinos. *Pesq. Vet. Bras*. 17 (3/4): 112-116. 1997.
- Valentovic M.A., Yahia T., Ball J.G., Hong S.K., Brown P.I. & Rankin G.O. 1997. 3,4-Dichloroaniline acute toxicity in male Fischer 344 rats. *Toxicology*. 124:125–134.
- Von Jagow R., Kies M. & Renner G. 1966. Urinary excretion of N-hydroxy derivatives of some aromatic amines by rabbits, guinea pigs, and dogs. *Biochemical Pharmacology*.v. 15, n. 12, p.1899-1910.
- Williams J.R. & Challis F.E. 1933. Methylene blue as an antidote for aniline dye poisoning. Case report with confirmatory experimental study. *J. Clin. Med*. 19, 166.

CAPÍTULO II

Intoxicação experimental por *Indigofera suffruticosa* em caprinos e ovinos

Enviado à Pesquisa Veterinária Brasileira

Intoxicação experimental por *Indigofera suffruticosa* em caprinos e ovinos¹

Anna P. M. de Figueiredo², Rosane M. T. Medeiros^{2*}, Francielicia P. M. Dantas², Amélia L. D. Leite², Rafael A. Figuera³ e Franklin Riet-Correa²

ABSTRACT.- Figueiredo A.P.M., Medeiros R.M.T., Dantas F.P.M., Leite A.L.D., Figuera R.A. & Riet-Correa F. 2011. [Experimental poisoning by *Indigofera suffruticosa* in goats and sheep.] Intoxicação experimental por *Indigofera suffruticosa* em caprinos e ovinos. Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, 58700-970, Patos, PB, Brazil. E-mail: rmtmed@uol.com.br.

Indigofera suffruticosa is a weed, which causes hemolytic anemia and hemoglobinuria in cattle and, experimentally, anemia without hemoglobinuria in guinea pigs. With the objective to determinate the toxicity of *I. suffruticosa* to sheep and goats aerial parts of the plant were administrated to six goats and four sheep at daily doses of 10, 20 e 40 g of fresh plant per kg body weight, during two to 24 days. Blood samples were collected daily for the determination of packed cell volume, hemoglobin concentrations, and red blood cells count. Urine was also collected daily for urine examination and observation of color changes. Osmotic fragility and blood concentrations of hemoglobin and methemoglobin were determined in one goat and one sheep. Anemia due to extravascular hemolysis, without hemoglobinuria, was observed in the experimental sheep and goats. Heinz bodies were observed in brilliant cresyl blue stained blood smears. There was total or partial recovery of the anemia in spite of the continued in the urine. It is suggested that aniline is the toxic compound of *I. suffruticosa* responsible for the hemolysis.

INDEX TERMS: Anemia, hemolytic anemia, extravascular hemolysis, poisoning by plants, poisonous plants.

RESUMO.- [Intoxicação experimental por *Indigofera suffruticosa* em caprinos e ovinos.]

Indigofera suffruticosa é uma planta invasora, que causa anemia hemolítica com hemoglobinúria em bovinos e, experimentalmente, anemia sem hemoglobinúria em cobaias. O objetivo deste trabalho foi determinar a toxicidade de *I. suffruticosa* para caprinos e ovinos. Partes aéreas da planta foram administradas a seis caprinos e quatro ovinos em doses diárias de 10, 20 e 40g por kg de peso vivo, durante períodos de 2 a 24 dias. Foram avaliados os parâmetros hematológicos (hematócrito, níveis de hemoglobina e contagem de hemácias) e foi coletada urina para urinálise e observação de

¹ Enviado para publicação em...

Aceito em.....

² Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, 58700-000. *Autor para correspondência Email; rmtmed@uol.com.br

³ Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, CEP 97105-900.

variações na coloração. Em um caprino e um ovino foram realizados os testes de fragilidade osmótica, determinação de hemoglobina e metemoglobina e pesquisa de corpúsculos de Heinz. Foi comprovado que em caprinos e ovinos, *I. suffruticosa* causa anemia hemolítica sem hemoglobinúria com formação de corpúsculos de Heinz. Os animais recuperaram-se da anemia, total ou parcialmente, mesmo com a continuidade da administração da planta. Oito a 12 horas após a coleta observa-se pigmento azulado na urina. Sugere-se que o pigmento seja anilina ou algum metabolito dessa substância e que a anilina seja o princípio ativo responsável pela hemólise causada por *I. suffruticosa*.

TERMO DE INDEXAÇÃO: Anemia, anemia hemolítica, hemólise extravascular, intoxicações por plantas, plantas tóxicas.

INTRODUÇÃO

Indigofera suffruticosa (anil, anileira) é uma planta invasora, arbustiva, com até 2 metros de altura, da família *Papilionoideae*, encontrada em todo o Nordeste. Originária das Antilhas e América Central é pouco exigente, nascendo em qualquer tipo de solo (Alzugaray & Alzugaray 1988, Lorenzi 2000). Durante a época da chuva *I. suffruticosa* brota rapidamente, permanecendo verde durante todo o período chuvoso; na época seca, permanece viva, porém visualizando-se apenas os galhos e algumas vagens secas. Em anos de boa pluviosidade aparece em quantidade suficiente para causar surtos de intoxicação (Riet-Correa et al. 2009), na forma de uma doença hemolítica intravascular caracterizada por hemoglobinúria e anemia em bovinos (Barbosa Neto et al. 2001, Salvador et al. 2010). Experimentalmente, causa anemia hemolítica sem hemoglobinúria em cobaias (*Cavia porcellus*) (Salvador et al. 2011).

No semiárido do Nordeste do Brasil produtores mencionam a ocorrência de casos em ovinos e caprinos que pastejam em áreas invadidas por *I. suffruticosa*. A suspeita tem como base a presença de urina vermelha. O objetivo deste trabalho foi determinar se *I. suffruticosa* causa anemia hemolítica e hemoglobinúria em caprinos e ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Campus de Patos, Paraíba, utilizando seis caprinos da raça Moxotó e cruzas e quatro ovinos da raça Santa Inês e cruzas, machos, com 10-20 kg, de seis meses a um ano de idade, que permaneceram alojados em baias de alvenaria. Os animais foram vermifugados e, antes do início do experimento, passaram por um

período de adaptação de uma semana. Durante o experimento foram alimentados com uma mistura de capim verde e concentrado (ração comercial® e farelo de milho e de trigo) em quantidade equivalente a 1,5% do peso vivo (PV) e água à vontade.

As doses das partes aéreas de *Indigofera suffruticosa* administradas e o período de administração para cada animal experimental são apresentadas no Quadro 1. A planta foi coletada, no Campus de Patos, CSTR/UFCG. A coleta foi realizada diariamente, sempre pela manhã, durante todo experimento, no período de junho de 2009 a agosto de 2010. Quando na falta de chuva, a planta era irrigada para mantê-la verde. Foram coletadas as partes aéreas da planta e administradas por via oral.

A cada dia antes da administração da planta era realizada avaliação clínica, coleta de sangue da veia jugular com uso de tubo com vácuo contendo anticoagulante (ácido etilendiaminotetracético [EDTA]), para avaliação dos parâmetros hematológicos (hematócrito, níveis de hemoglobina e contagem de hemácias), e coleta de urina para urinálise. O hemograma e a urinálise foram realizados utilizando-se as técnicas descritas por Kerr (2003). No Caprino 5 e no Ovino 9 foi realizado o teste de fragilidade osmótica (Vallada 1999) e foi determinada a presença de hemoglobina e metemoglobina no plasma sanguíneo (Nauom 1997). Para pesquisa de corpúsculos de Heinz, foram realizados esfregaços sanguíneos com sangue previamente incubado com azul cresil brilhante (Nauom 1997).

A urina foi coletada com o uso de coletor de urina infantil adaptado para pequenos ruminantes, e posteriormente colocada em um pote coletor universal e avaliada por meio de fitas reagentes⁴. A coloração da urina do animal era observada, quando ainda no coletor infantil e várias vezes ao dia, por no máximo 12 horas. Para isso, o pote coletor com urina permanecia no laboratório à temperatura ambiente.

No Caprino 6 e no Ovino 10 a coleta e análise de sangue foi realizada três vezes ao dia, durante os dois dias de administração da planta (antes de administrar a planta, ao meio dia e no final da tarde), e duas vezes ao dia (manhã e final da tarde), nos dois dias subsequentes à administração da planta.

Foram avaliados os parâmetros de peso do animal, comportamento (apático, normal ou agitado), grau de hidratação (Grau 1[0-5%]; Grau 2[5%-10%]; e Grau 3[acima de 10%]), apetite, coloração das mucosas (rosa, pálida ou porcelana), temperatura retal, coloração da urina (amarelo citrino, vermelha ou azul), frequências cardíaca e respiratória, motilidade ruminal, peristaltismo intestinal e aspecto das fezes (normal ou pastoso).

⁴ Uriquest® Plus, Labtest.

RESULTADOS

Tanto os ovinos quanto os caprinos apresentaram, no início do experimento, alteração em alguns dos parâmetros clínicos avaliados. Foram observados apatia, desidratação de Grau 1 e hiporexia (diminuição do consumo de volumoso) nos primeiros dois a cinco dias após o início da ingestão, principalmente nos animais que ingeriram doses diárias de 20 g/kg/PV. A coloração das mucosas variou de acordo com os parâmetros hematológicos, ficando mais pálidas quando ocorria anemia. A temperatura retal se manteve dentro dos parâmetros normais (entre 38,5°C e 39,2°C). Os animais apresentaram taquicardia (120 batimentos/minuto) e taquipnéia (40 respirações/minuto) apenas nos três primeiros dias do experimento; posteriormente as frequências cardíaca e respiratória se mantiveram dentro dos parâmetros normais. Todos os animais tiveram uma perda de peso entre 0,5-1 kg, entre o 5^o e 10^o dia após o início da administração e, posteriormente, os que permaneceram por um período maior no experimento, se recuperaram.

Os dados dos parâmetros hematológicos avaliados estão descritos nos Quadros 2 e 3. A partir do primeiro dia de administração da planta já se observou variação nesses parâmetros; no entanto, o início da anemia (hematócrito de 21% ou menor) variou entre o 3^o e 7^o dia de ingestão. O maior grau de anemia observado foi no Caprino 3, com hematócrito de 11%, no 13^o dia de ingestão da planta. Nos demais caprinos, o nível menor de hematócrito variou de 17-18%, entre os dias 11 e 18. A maioria dos animais apresentou recuperação parcial do hematócrito, mesmo continuando a ingerir a planta, porém até o final do experimento todos os animais apresentaram hematócrito abaixo da primeira avaliação. Em relação à hemoglobina, o menor valor observado foi de 4,1%, no 16^o dia de ingestão da planta, no Caprino 3. O Ovino 7 apresentou o menor hematócrito (20%) no dia 9. O ovino 8 apresentou o menor hematócrito (21%) do dia 5 até o dia 9. Posteriormente houve recuperação total nos dois ovinos. Os Ovinos 9 e 10 não apresentaram diminuição nos valores hematológicos.

O teste de fragilidade osmótica demonstrou uma pequena oscilação de 77,7% para 83,3%, no Caprino 5 e de 61,1% para 77,7% no Ovino 9, no 1^o e 2^o dias de ingestão de *I. suffruticosa*, respectivamente. Observou-se, também, aumento dos valores de metemoglobina, sendo o maior pico de 13,5% no Caprino 5, no 12^o dia de administração da planta, e 4,3% no Ovino 9, no 5^o dia de administração. Foi observada a presença intensa de corpúsculos de Heinz nos esfregaços sanguíneos.

Em nenhum momento foi observada hemoglobinúria. A única anormalidade observada na urina foi uma pigmentação azulada que aparecia entre 8-12 horas após a coleta. Nos Caprinos 1 e 2, o pigmento foi observado a partir do 15^o dia e nos Caprinos 3, 4 e 5 a partir do 6^o dia. Nesses

animais, a urina voltou ao normal dentro de 24 horas após o final da ingestão da planta. No Caprino 6, o pigmento foi visto já no 1º dia e voltou ao normal no 2º dia após cessada a ingestão da planta.

Nos Ovinos 7 e 8 a presença do pigmento foi observada no 3º dia de ingestão de *I. suffruticosa*, desaparecendo no 9º dia, mesmo com a continuidade da ingestão da planta. No Ovino 10 não foi observada a presença do pigmento na urina.

Quadro 1. Animais experimentais, doses de *Indigofera suffruticosa* administradas e início da anemia (hematócrito $\geq 20\%$)

| Animal N ^o | Espécie | Peso (kg) | Dose diária (g/kg) | Dias de administração | Início da anemia (dias) |
|-----------------------|---------|-----------|--------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | Caprino | 17,0 | 10 | 24 | 6 |
| 2 | Caprino | 14,5 | 10 | 24 | 3 |
| 3 | Caprino | 14,4 | 20 | 20 | 3 |
| 4 | Caprino | 11,0 | 20 | 20 | 3 |
| 5 | Caprino | 14,5 | 20 | 13 | 7 |
| 6 | Caprino | 13,5 | 40 | 2 | 1 |
| 7 | Ovino | 17,0 | 10 | 12 | 3 |
| 8 | Ovino | 16,0 | 20 | 12 | 5 |
| 9 | Ovino | 17,0 | 20 | 5 | SA ^a |
| 10 | Ovino | 17,0 | 40 | 2 | SA ^a |

^aSem Alteração

Quadro 2. Parâmetros hematológicos avaliados dos caprinos e ovinos que ingeriram *Indigofera suffruticosa* em doses diárias de 10 e 20 g/kg

| Animal Dose | Parâmetros Avaliados | Dias nos que foi administrada a planta | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| C ^a 1 10g/kg | Hematócrito (%) | 27 | 26 | 24 | 22 | 23 | 21 | 19 | 18 | 18 | 19 | 19 | 19 | 19 | 18 | 18 | 17 | 17 | 18 | 21 | 22 | 22 | 22 | 22 | 24 |
| | Hemoglobina (g/dl) | 8,3 | 9,0 | 9,6 | 8,0 | 8,3 | 7,5 | 7,3 | 8,0 | 8,8 | 7,0 | 7,6 | 7,4 | 7,2 | 7,1 | 6,7 | 6,3 | 6,6 | 5,6 | 8,2 | 9,1 | 8,8 | 9,3 | 9,2 | 8,9 |
| | Eritrócitos (x 10 ⁶) | 12,0 | 12,0 | 15,9 | 14,3 | 11,4 | 10,7 | 10,5 | 9,4 | 10,5 | 9,2 | 8,7 | 10,2 | 9,6 | 9,3 | 4,9 | 9,4 | 7,3 | 6,4 | 7,9 | 10,3 | 9,5 | 9,1 | 10,8 | 10,7 |
| C 2 10g/kg | Hematócrito (%) | 23 | 23 | 21 | 22 | 25 | 22 | 22 | 21 | 21 | 23 | 18 | 20 | 20 | 20 | 19 | 20 | 19 | 18 | 20 | 18 | 18 | 18 | 19 | |
| | Hemoglobina (g/dl) | 9,8 | 10,5 | 8,5 | 8,5 | 10,5 | 6,5 | 7,4 | 8,7 | 8,8 | 9,4 | 7,5 | 8,0 | 8,1 | 8,6 | 7,9 | 7,8 | 8,6 | 8,5 | 7,2 | 8,9 | 7,3 | 7,6 | 7,6 | 7,2 |
| | Eritrócitos (x 10 ⁶) | 11,4 | 13,2 | 13,0 | 14,3 | 16,7 | 15,7 | 16,8 | 12,5 | 14,1 | 13,9 | 14,9 | 14,9 | 14,4 | 11,6 | 12,7 | 12,3 | 11,5 | 12,7 | 14,1 | 14,0 | 10,4 | 13,7 | 13,5 | 13,5 |
| C 3 20g/kg | Hematócrito (%) | 25 | 23 | 21 | 20 | 19 | 16 | 16 | 15 | 15 | 13 | 13 | 12 | 11 | 12 | 12 | 13 | 15 | 18 | 16 | 16 | | | | |
| | Hemoglobina (g/dl) | 10,8 | 7,4 | 8,5 | 7,2 | 6,9 | 5,9 | 5,9 | 5,8 | 5,8 | 5,0 | 5,3 | 4,4 | 4,3 | 4,2 | 4,4 | 4,1 | 5,4 | 6,4 | 6,2 | 5,8 | | | | |
| | Eritrócitos (x 10 ⁶) | 13,8 | 11,8 | 13,7 | 9,1 | 9,8 | 9,1 | 8,7 | 7,9 | 7,5 | 6,9 | 7,2 | 6,6 | 4,0 | 7,0 | 6,0 | 7,0 | 5,9 | 8,8 | 8,1 | 8,1 | | | | |
| C 4 20g/kg | Hematócrito (%) | 23 | 23 | 21 | 22 | 25 | 22 | 22 | 21 | 21 | 23 | 18 | 20 | 20 | 20 | 19 | 20 | 19 | 18 | 20 | | | | | |
| | Hemoglobina (g/dl) | 9,8 | 10,5 | 8,5 | 8,5 | 10,5 | 6,5 | 7,4 | 8,7 | 8,8 | 9,4 | 7,5 | 8,0 | 8,1 | 8,6 | 7,9 | 7,8 | 8,6 | 8,5 | 7,2 | 8,9 | | | | |
| | Eritrócitos (x 10 ⁶) | 11,4 | 13,2 | 13,0 | 14,3 | 16,7 | 15,7 | 16,8 | 12,5 | 14,1 | 13,9 | 14,9 | 14,9 | 14,4 | 11,6 | 12,7 | 12,3 | 11,5 | 12,7 | 14,1 | 14,0 | | | | |
| C 5 20g/kg | Hematócrito (%) | 23 | 26 | 22 | 24 | 23 | 25 | 21 | 24 | 21 | 21 | 22 | 23 | 20 | | | | | | | | | | | |
| | Hemoglobina (g/dl) | 8,4 | 9,5 | 7,3 | 8,4 | 8,3 | 8,2 | 7,7 | 8,8 | 7,3 | 7,2 | 7,6 | 7,3 | 7,5 | | | | | | | | | | | |
| | Eritrócitos (x 10 ⁶) | 16,5 | 18,2 | 14,5 | 16,4 | 14,8 | 15,8 | 12,4 | 15,6 | 15,2 | 15,1 | 14,0 | 13,9 | 14,7 | | | | | | | | | | | |
| | Metemoglobina (%) | 6,4 | 3,7 | 7,3 | 6,8 | 3,8 | 4,0 | 5,1 | 3,9 | 7,7 | 6,9 | 6,0 | 13,5 | 6,3 | | | | | | | | | | | |
| | F. Osmótica (%)* | 77,7 | 83,3 | 77,7 | 77,7 | 77,7 | 83,3 | 77,7 | 77,7 | 72,2 | 77,7 | 77,7 | 77,7 | | | | | | | | | | | | |
| O 7 10g/kg | Hematócrito (%) | 29 | 26 | 21 | 25 | 26 | 26 | 24 | 21 | 22 | 20 | 25 | 25 | | | | | | | | | | | | |
| | Hemoglobina (g/dl) | 8,9 | 8,5 | 8,3 | 8,7 | 9,3 | 8,5 | 8,1 | 5,8 | 8,9 | 6,9 | 8,6 | 8,5 | | | | | | | | | | | | |
| | Eritrócitos (x 10 ⁶) | 8,5 | 8,4 | 8,3 | 7,5 | 8,3 | 8,0 | 7,0 | 6,3 | 7,0 | 5,8 | 7,2 | 8,4 | | | | | | | | | | | | |
| O 8 20g/kg | Hematócrito (%) | 30 | 28 | 25 | 23 | 21 | 21 | 21 | 25 | 21 | 25 | 24 | 23 | | | | | | | | | | | | |
| | Hemoglobina (g/dl) | 10,5 | 9,8 | 8,8 | 7,7 | 7,2 | 7,0 | 7,5 | 8,4 | 7,2 | 8,6 | 7,5 | 7,6 | | | | | | | | | | | | |
| | Eritrócitos (x 10 ⁶) | 8,5 | 8,3 | 8,1 | 7,4 | 8,1 | 6,3 | 6,3 | 6,5 | 6,2 | 6,9 | 4,9 | 5,4 | | | | | | | | | | | | |
| O 9 20g/kg | Hematócrito (%) | 35 | 34 | 33 | 33 | 33 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Hemoglobina (g/dl) | 10,1 | 12,0 | 12,4 | 11,5 | 11,8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Eritrócitos (x 10 ⁶) | 11,9 | 10,2 | 11,0 | 10,7 | 11,7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Metemoglobina (%) | 3,1 | 2,4 | 4,2 | 4,3 | 4,3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | F. Osmótica (%)* | 61,1 | 77,7 | 72,2 | 77,7 | 77,7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

^aC=caprino; O=ovino

Quadro 3. Parâmetros Hematológicos avaliados do caprino e ovino que ingeriram *Indigofera suffruticosa* na dose de 40 g/kg/pv durante dois dias

| Animal | Parâmetros Avaliados | Dias de Experimento | | | | | | | | | |
|--------------------|---------------------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | 1 (1ª coleta) | 1 (2ª coleta) | 1 (3ª coleta) | 2 (1ª coleta) | 2 (2ª coleta) | 2 (3ª coleta) | 3 (1ª coleta) | 3 (2ª coleta) | 4 (1ª coleta) | 4 (2ª coleta) |
| C ^a – 6 | Hematócrito (%) | 21 | 18 | 19 | 19 | 18 | 19 | 20 | 20 | 18 | 20 |
| | Hemoglobina (g/dl) | 7,5 | 6,7 | 7,2 | 7,6 | 7,1 | 7,3 | 11,0 | 10,0 | 8,1 | 9,2 |
| | Eritrócitos (x10 ⁶) | 11,2 | 9,7 | 9,7 | 9,3 | 11,9 | 12,1 | 10,7 | 10,2 | 10,3 | 10,5 |
| O – 10 | Hematócrito (%) | 36 | 35 | 36 | 36 | 35 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| | Hemoglobina (g/dl) | 12,3 | 12,1 | 12,2 | 11,8 | 12,4 | 12,6 | 12,3 | 12,4 | 12,1 | 12,3 |
| | Eritrócitos (x10 ⁶) | 12,5 | 10,6 | 10,3 | 13,2 | 11,5 | 12,3 | 11,9 | 12,3 | 12,5 | 12,4 |

^aC=caprino; O=ovino

DISCUSSÃO

Indigofera suffruticosa causou em ovinos e caprinos anemia, uma vez que se observou diminuição dos parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos). Esta anemia é hemolítica, pois se observou a presença de metemoglobina e corpúsculos de Heinz nos eritrócitos. O fato de não haver hemoglobinúria indica que a hemólise é extravascular. Neste caso, os eritrócitos são destruídos pelo sistema fagocítico monocitário, principalmente no fígado e baço (Figuera 2001).

A anemia causada por *I. suffruticosa* em ovinos foi reversível, pois, mesmo com a ingestão continuada da planta, os animais se recuperaram espontaneamente, com níveis de hematócrito acima de 21%. No entanto, nos caprinos a recuperação da anemia foi parcial, uma vez que, com exceção do Caprino 1, todos os demais, ao final do experimento, apresentavam hematócrito menor do que em seu início ($\leq 20\%$).

A semelhança do que foi observado nesse experimento, recuperação espontânea também ocorre em bovinos que ingerem *I. suffruticosa* (Barbosa Neto et al. 2001, Salvador et al. 2010) e *Ditaxis desertorum* (Tokarnia et al. 1997) talvez se deva a modificações da flora ruminal que se adapta para alterar a estrutura química do princípio ativo da planta, ainda desconhecido. Recuperação parcial, seguida de ciclos de anemia e recuperação, é observada em bovinos intoxicados por plantas do gênero *Brassica*, que contém S-metilcisteína sulfóxido (SMCO), metabólito que no rúmen, por ação de bactérias, sofre metabolização em dimetil dissulfeto, que causa hemólise (Cheeke 1998). A recuperação da anemia ocorre, provavelmente, devido a uma adaptação parcial dos microorganismos do rúmen produzindo menos dimetil dissulfeto. Neste trabalho, os ovinos, que apresentaram leve anemia, tiveram recuperação mais rápida do que os caprinos, provavelmente por que são mais resistentes aos agentes que causam oxidação de eritrócitos quando comparados com os caprinos (Cheeke 1998, Rae 1999, Figuera 2002).

Na intoxicação por *I. suffruticosa* em cobaios (Salvador et al. 2011) foi observada anemia hemolítica, sem hemoglobinúria, porém os valores do hematócrito e da hemoglobina foram diminuindo continuamente, não se observando o comportamento de recuperação espontânea, visto nos ruminantes. Nos monogástricos, o SMCO é absorvido no intestino, antes de chegar ao ceco, onde deveria ocorrer a fermentação bacteriana, desta forma, as plantas do gênero *Brassica*, causam anemia hemolítica em

ruminantes, mas não em monogástricos (Cheeke 1998). A suscetibilidade de cobaios à intoxicação por *I. suffruticosa* sugere que o princípio ativo da planta não é o SMCO (Salvador et al. 2011).

Outro sinal clínico na intoxicação experimental por *I. suffruticosa* em caprinos e ovinos foi o pigmento azulado observado na urina, 8-12 horas após a coleta. Esse pigmento também foi observado na urina de cobaios, 8-10 horas após a urinação (Salvador et al. 2011), e em bovinos (Barbosa Neto et al. 2001, Salvador et al. 2010) e pode ser utilizado como parâmetro para diagnóstico diferencial da intoxicação por *I. suffruticosa* com outras causas de anemia hemolítica. No Brasil, há pelo menos outras três plantas que causam hemólise: *Brachiaria radicans* em bovinos (Gava et al. 2010); *Allium cepa* em búfalos (Borelli et al. 2009) e bovinos (Bernardino 2010); e *Ditaxis desertorum*, em bovinos (Tokarnia et al. 1997), mas em nenhuma delas foi relatada a presença de pigmento azulado na urina.

A presença de pigmento azulado na urina dos animais intoxicados por *I. suffruticosa* sugere que o princípio ativo da planta seja a anilina ou algum derivado da mesma (Salvador et al. 2010). A anilina ($C_6H_5NH_2$), obtida inicialmente por processo de destilação destrutiva do Indigo (*I. suffruticosa*) (Anônimo 2006), causa crise hemolítica tóxica (Williams e Challis 1933, Hughes e Treon 1954) e metemoglobinemia em seres humanos (Smith e Olson 1973, Anônimo 2001) e em cães (Pauluhn 2002).

Sabe-se que após a ingestão, a anilina é metabolizada no fígado (Smith e Olson 1973, Kiese 1974, Khan et al. 1998) em fenilhidroxilamina (Harrison e Jollow 1987) e nitrobenzeno (Von Jagow et al. 1966, Murayama 1960, Kiese 1966, Khan et al. 2000) e induz alterações no metabolismo dos eritrócitos, formação de corpúsculos de Heinz e redução de 50% nos níveis de eritrócitos circulantes, sequencialmente (Pauluhn 2004). O aumento na formação de corpúsculos de Heinz é resultante, principalmente, do maior número de grupamentos sulfidrila da hemoglobina (McLean et al. 1969). Esta alteração eritróide resulta da diminuição no metabolismo da síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). O NADH é um nucleotídeo formado pela via da pentose fosfato (Murayama 1960) que atua como co-enzima na redução do glutation pela glutation-redutase (Harvey 1989). Em casos de intoxicação por primaquina (Bolchoz et al. 2001) e fenacetina (Jensen e Jollow 1991), os dois derivados conhecidos da anilina, a diminuição da NADH é acentuada, resultando na falha da atividade da glutation-redutase e, conseqüentemente, na incapacidade de redução do glutation. A ação indireta dessas drogas sobre a atividade da glutation-redutase, faz com que a maior parte do

glutation permaneça oxidado nos eritrócitos, levando a formação de corpúsculos de Heinz (Bowman et al. 2004). Após a formação das inclusões, os eritrócitos começam a serem retirados da circulação pelo sistema fagocítico mononuclear (hemólise extravascular) mediante exposição dos sítios antigênicos previamente protegidos nas criptas (Singh et al. 2007).

Pelos resultados deste trabalho conclui-se que *Indigofera suffruticosa* causa anemia hemolítica, sem hemoglobinúria, em caprinos e ovinos. No entanto não deve ser descartada a possibilidade de que, ocasionalmente, a planta possa causar hemoglobinúria nestas espécies, já que há produtores que mencionam o fato de terem observado urina de cor vermelha em caprinos e, menos frequentemente, em ovinos pastejando em áreas invadidas pela planta.

REFERÊNCIAS

- Alzugaray D. & Alzugaray K. 1988. Enciclopédia de plantas brasileiras. Editora Três, São Paulo. p. 54.
- Anônimo, 2001. Aniline-Acute exposure guideline levels. Inhalation. Toxicol. 13 (Suppl.), 7–42.
- Anônimo 2006. Aniline. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/25473/aniline> (acessado 23.07.2011.).
- Barbosa Neto J.D., Oliveira C.M.C., Peixoto P.V., Barbosa I.B.P., Ávila S.C. & Tokarnia C.H. 2001. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. *Papilionoideae*) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 21 (1): 18-22.
- Bernardino J.N.N. 2010. Comunicação pessoal (Veterinário Autônomo, Tabira, Pernambuco).
- Bolchoz L.J., Budinsky R.A., McMillan D.C., & Jollow D.J. 2001. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. J Pharmacol Exp Ther 297:509–515.
- Borelli B., Lucioi J., Furlan F.H., Hoepers P.G., Roveda J.F., Traverso S.D. & Gava A. 2009. Fatal onion (*Allium cepa*) toxicosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*). J. Vet. Diagn. Invest. 21 (3), 402–405.
- Bowman Z.S., Oatis J.E.Jr., Whelan J.L., Jollow D.J. & Mcmillan D.C. 2004. Primaquine-Induced Hemolytic Anemia: susceptibility of normal versus

- glutathione-depleted rat erythrocytes to 5-Hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther.* 309 (1): 79-85.
- Cheeke P.R. 1998. *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants.* 2nd ed. Danville, Illinois. p.302-306.
- Figuera R.A. 2001. *Anemia em medicina veterinária.* Editora Pallotti, Santa Maria, 214p.
- Figuera R.A., Souza M.T., Langohr I. & Barros C.S.L. 2002. Intoxicação experimental por cebola, *Allium cepa (Liliaceae)*, em gatos. *Pesq. Vet. Bras.* 22(2):79-84.
- Gava A., Simone de Deus M.R., Branco J.V., Mondadori A.J. & Barth A. 2010. Intoxicação espontânea e experimental por *Brachiaria radicans* (tanner-grass) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):255-259.
- Harrison J.J.R. & Jollow D.J. 1987. Contribution of aniline metabolites to aniline-induced methemoglobinemia. *Mol Pharmacol.* 32:423– 431.
- Harvey J.W. 1989. Erythrocyte metabolism. p. 185-273. In: Kaneko J.J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 4th ed. Academic Press, San Diego.
- Hughes J.P. & Treon J.F. 1954. Erythrocytic inclusion bodies in the blood of chemical workers. *AMA Arch. Ind. Health.* 10, 192.
- Jensen C.B. & Jollow D.J. 1991. The role of N-hydroxyphenetidine in phenacetin-induced hemolytic anemia. *Toxicol Appl Pharmacol* 111:1–12.
- Khan M.F., Kaphalia B.S., Boor P.J. & Ansari G.A. 1993. Subchronic toxicity of aniline hydrochloride in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24 (3):368-74.
- Khan M.F., Green S.M., Ansari G.A. & Boor P.J. 1998. Phenylhydroxylamine: role in aniline-associated splenic oxidative stress and induction of subendocardial necrosis. *Toxicol Sci.* 42 (1): 64-71.
- Khan M.F., Wu X. & Ansari G.A. 2000. Contribution of nitrosobenzene to splenic of aniline. *J Toxicol Environ Health A.* 60(4):263-73.
- Kerr M.G. 2003. *Exames laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica clínica e hematologia.* 2ª ed. Rocca, São Paulo. 436p.
- Kiese M. 1966. The biochemical production of ferrihemoglobin-forming derivatives from aromatic amines, and mechanisms of ferrihemoglobin formation. *Pharmacol Rev.* 18(3): 1091-161.
- Kiese M. 1974. *Methemoglobinemia: A Comprehensive Treatise.* CRC Press, Cleveland, OH. 260 p.

- Lorenzi H. 2000. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 3.ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 608 p.
- McLean S., Stamer G.A. & Thomas J. 1969. Methaemoglobin formation by aromatic amines. *J. Pharm. Pharmacol.* 21 (7): 441-50.
- Murayama M. 1960. The Combining Power of Normal Human Hemoglobin for Nitrosobenzene. *J. Biolog. Chem.* 235:1024-1028.
- Nauom P.C. 1997. Hemoglobinopatias e talassemias. Sarvier, São Paulo, 171p.
- Pauluhn J. 2002. Aniline-induced methemoglobinemia in dogs: pitfalls of route-to-route extrapolations. *Inhalation Toxicol.* 14:959-973.
- Pauluhn J. 2004. Subacute Inhalation Toxicity of Aniline in Rats: Analysis of Time-Dependence and Concentration-Dependence of Hematotoxic and Splenic Effects. *Toxicol. Scien.* 81:198-215.
- Rae H.A. 1999. Onion toxicosis in a herd of beef cows. *Can Vet J.* 40: 55-57.
- Riet-Correa F. Medeiros R.M.T., Pfister J., Schild A.L. & Dantas A.F.M. 2009. Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in brazilian livestock. Palotti, Santa Maria. 246p.
- Salvador I. S., Medeiros R.M.T., Pessoa C.R.M., Dantas A.F.M., Sucupira Júnior G. & Riet-Correa F. 2010. Intoxicação por *Indigofera suffruticosa* (leg. papilionoideae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):953-957.
- Salvador I.S., Medeiros R.M.T., Pessoa C.R.M., Oliveira D.M., Duarte A.L.L., Figuera R.A. & Riet-Correa F. 2011. Experimental poisoning of guinea pig (*Cavia porcellus*) with *Indigofera suffruticosa*. *Toxicon.* 57, 927-931.
- Singh H., Purnell E. & Smith C. 2007. Mechanistic study on aniline-induced erythrocyte toxicity. *Arh Hig Rada Toksikol.* 58:275-285.
- Smith R.P. & Olson M.V. 1973. Drug-induced methemoglobinemia. *Semin. Hematol.* 10, 253-268.
- Tokarnia C.H., Chagas B.R., Chagas A.D. & Silva H.K. 1997. Anemia hemolítica causada por *Ditaxis desertorum* (*Euphorbiaceae*) em bvinos. *Pesq. Vet. Bras.* 17 (3/4): 112-116.
- Valentovic M.A., Yahia T., Ball J.G., Hong S.K., Brown P.I. & Rankin G.O. 1997. 3,4-Dichloroaniline acute toxicity in male Fischer 344 rats. *Toxicology.* 124:125-134.
- Vallada E.P. 1999. Manual de técnicas hematológicas. Atheneu, São Paulo. 423p.

Von Jagow R., Kies M. & Renner G. 1966. Urinary excretion of N-hydroxy derivatives of some aromatic amines by rabbits, guinea pigs, and dogs. *Bioch. Pharmacol.* 15(12):1899-1910.

Williams J.R. & Challis F.E. 1933. Methylene blue as an antidote for aniline dye poisoning. Case report with confirmatory experimental study. *J. Clin. Med.* 19, 166.