



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DE CASO – INTOXICAÇÃO POR TANINOS EM BOVINOS DE CARNE

CAROLINA DOS SANTOS SIMÕES TEIXEIRA DE FRIAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutor Rui José Branquinho Bessa

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutor George Thomas Stilwell

2015

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Miguel Saraiva Lima pelo tempo que dedicou a acompanhar-me no meu estágio e elaboração desta tese de mestrado e por ser o exemplo de um bom profissional, um ótimo professor e uma excelente pessoa.

Agradeço á minha mãe pelo esforço financeiro que fez para que pudesse concluir o curso que me deixou mais perto de ser o que sempre sonhei ser desde criança – Médica Veterinária.

Um obrigado, também a toda a minha família que sempre me acompanhou e compreendeu que o estudo às vezes era prioritário em relação aos serões passados com eles.

Agradeço, e muito, aos meus amigos, em especial às minhas melhores colegas de curso.

Elas sabem bem que esta caminhada nem sempre foi fácil, mas com a companhia umas das outras tudo se tornou melhor.

Por fim, e não menos importante, um agradecimento à *Herdado do Pinheiro*, S.A. pela disponibilidade que mostrou sempre em responder às minhas questões. Sem esta colaboração este trabalho não teria sido possível.

ESTUDO DE CASO – INTOXICAÇÃO POR TANINOS EM BOVINOS DE CARNE

Resumo

A intoxicação por taninos é um problema que afeta principalmente explorações de bovinos de carne, em especial na região do Alentejo rica em Sobreiro (*Quercus suber*) e Azinheira (*Quercus ilex*). Neste sentido é de grande importância uma nova análise sobre esta problemática, desta vez adaptada a algumas especificidades do nosso país como sejam as espécies arbóreas presentes no nosso clima e as nossas espécies autóctones, em especial raças da espécie bovina.

Este estudo decorreu numa exploração do concelho de Alcácer do Sal, dedicada, entre outras coisas, à cria e recria de bovinos de engorda, e que possui um efetivo de cerca de 800 animais. Em Novembro de 2014 notaram um aumento no número de mortes, algumas súbitas, nas vacas do seu efetivo. Na sequência desta situação a Faculdade de Medicina Veterinária foi contactada no sentido de tentar resolver este problema.

Após esse contato fizemos várias visitas à herdade nas quais, entre outras atividades, realizámos um total de oito necrópsias. Em vida estes animais apresentavam um marcado edema submandibular, além de evidentes sinais de magreza. Os dados mais marcantes nas necrópsias realizadas foram edemas submandibulares e da barbela muito evidentes, acumulação de líquido na cavidade abdominal, edema das pregas do abomaso e atrofia renal.

Desde 2001 que casos semelhantes têm sido reportados, suspeitando-se na altura de uma intoxicação crónica por taninos, resultante da ingestão de bolota de sobreiro. A análise mais extensa e cuidada destes novos casos permitiu confirmar as suspeitas iniciais.

Apesar do número de mortes súbitas ocorridas, a intoxicação por taninos é geralmente um processo crónico e arrastado, ainda sem antídoto ou tratamento eficaz. Nesta altura a Faculdade juntamente com a Herdade do Pinheiro estão a tentar implementar algumas estratégias que permitam minimizar as perdas ocasionadas pela ingestão de taninos. A aposta será em estratégias de prevenção.

Palavras-chave: taninos, *Quercus*, bovinos de carne, necrópsia

CASE REPORT – TANNIN INTOXICATION IN BEEF CATTLE

Abstract

Tannin poisoning is a problem that occurs mainly in beef cattle grazing in farms, especially in Alentejo (south of Portugal). This region is rich in trees of the genus *Quercus*: Sobreiro (*Quercus suber*) and Azinheira (*Quercus ilex*). It is of most importance a new analysis and approach to this problem, based in the specificities of portuguese flora, weather and bovine species.

This work is based on a bovine population on a farm in Alcácer do Sal that raises beef cattle. This farm has a bovine population of almost 800 animals. In November of 2014 the owners noticed an increased in the number of sudden deaths and decided to contact the School of Veterinary Medicine, in Lisbon, to make a diagnosis of this problem.

The team of the Vet School visited the farm several times and until the date of publication of this report, besides other activities, eight necropsies were performed. All the animals observed presented very pronounced submandibular and brisket edemas and weight loss. At necropsy, the major findings were submandibular edemas, fluid in the abdominal cavity and a very marked renal atrophy.

Since the year of 2001 that similar cases had been reported to the same team and the suspicious was tannin poisoning. A most accurate and deep analysis of this problem allowed the team to confirm their initial suspicion – tannin poisoning.

Although we faced a number of sudden deaths, tannin poisoning is usually a chronic disease and has no effective treatment or antidote. Prevention is the best way to minimize the cattle losses.

Palavras-chave: tannins, *Quercus*, beef cattle, necropsy

Índice

RESUMO DAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O ESTÁGIO.....	1
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
Caracterização dos taninos	3
Taninos na natureza – espécie arbórea <i>Quercus</i>	5
Sinais clínicos	7
Lesões	8
Fisiopatologia	9
Mecanismos de defesa.....	16
Prevenção e tratamento	18
DESCRIÇÃO DE CASOS CLÍNICOS	20
20 de Novembro de 2014.....	20
24 de Novembro de 2014.....	21
1 de Dezembro de 2014	21
8 de Dezembro de 2014	22
12 de Janeiro de 2015	22
26 de Abril de 2015	23
29 de Abril de 2015	23
23 de Junho de 2015	24
Resumo dos casos clínicos	25
DIAGNÓSTICO	27
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÃO	31
BIBLIOGRAFIA.....	32

Índice de tabelas

Tabela nº 1 - Evolução da composição química da bolota ao longo da sua maturação (Adaptado de Almeida e Marinho, 1992).....	6
Tabela nº 2 - Efeitos de taninos condensados na digestão em ruminantes (Adaptado de Waghorn, 2008).	14
Tabela nº 3 - Resumo dos achados de necrópsia.....	25
Tabela nº 4 - Resumo dos resultados das análises de sangue e urina em 5 animais	25
Tabela nº 5 - Resumos dos resultados das análises histopatológicas em 5 animais.....	26

Índice de figuras

Figura nº 1 - Analisador Portátil (iSTAT®).....	20
Figura nº 2 - Grande acumulação de líquido na cavidade abdominal.....	21
Figura nº 3 - Bolotas parcialmente digeridas encontradas no rúmen de um animal necropsiado.	21
Figura nº 4 - Cadáver apresentando marcado edema submandibular.....	22
Figura nº 5 - Rim de aspeto semelhante ao encontrado nos animais necropsiados, apresentando atrofia.....	23
Figura nº 6 – Animal antes do abate apresentando evidentes sinais de magreza.....	24
Figura nº 7 – Evidente edema das pregas do abomaso.....	24

Índice de abreviaturas

AVG – Ácidos Gordos Voláteis

BVD – Bovine Viral Diarrhea (Diarreia Viral Bovina)

FEDNA – Fundacion Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

HRP – Histatin Rich Proteins (Proteínas ricas em histatina)

MS – Matéria Seca

PEG – Polietilenoglicol

PRP – Proline Rich Proteins (Proteínas ricas em prolina)

PVP – Polivinilpirrolidona

TAE – *Tannic Acid Equivalent* (Equivalente em Ácido Tânico)

TBSP – Tannin Binding Salivar Proteins (Proteínas salivares de ligação a taninos)

TCM – Teste Californiano de Mastites

Resumo das atividades realizadas durante o estágio

Entre Fevereiro e Julho de 2015, o meu estágio centrou-se no exercício de Clínica de Espécies Pecuárias. Todas as semanas, acompanhando o Professor Miguel Saraiva Lima, visitámos duas a três explorações diferentes e tive oportunidade de conhecer qual o papel do Médico Veterinário na área dos animais de produção, tanto na sua vertente de apoio clínico, mas também como consultor em áreas mais técnicas da exploração, como o manejo e a alimentação, por exemplo.

As explorações às quais prestámos o nosso apoio foram: *Barão e Barão Lda*, *Herdade do Pinheiro S.A.*, *Agropecuária Terrim*, *Pinhal Gados*, *Casal de Quintanelas* e *Herdade do Zambujal*.

Durante estes seis meses tive a oportunidade de contactar com caprinos de aptidão leiteira, bovinos de leite e bovinos de carne. A grande maioria dos casos clínicos com os quais contactámos eram problemas de Toxémia de Gestação e Listeriose (em caprinos), intoxicação por taninos (em bovinos de carne), quebras de produção (em bovinos de leite), atrasos no crescimento em jovens (caprinos e bovinos), claudicações (bovinos de carne).

Pude ainda realizar algumas intervenções como recolha de sangue nas veias jugular e da cauda, recolha de líquido cefalorraquidiano, recolha de urina, recolha de leite (para TCM), administração de fármacos por via endovenosa, intramuscular e subcutânea, administração de fluidoterapia oral e endovenosa (em vitelos), corte e aparagem de cascos, resolução de distócias (em caprinos), cesarianas (em caprinos) e resolução de prolapso uterino (em bovinos de carne). Também realizei inúmeras necrópsias que se provaram bastante úteis no diagnóstico de problemas de rebanho e na aplicação de medidas profiláticas ou metafiláticas na exploração.

1) Introdução

Em Novembro de 2014, a Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) foi contactada pelos responsáveis de uma exploração (*Herdade do Pinheiro*, S.A.) devido à morte de alguns bovinos suspeitos de intoxicação por taninos (presentes na bolota e folhas de sobreiro). Casos semelhantes já tinham sido reportados em 2001, embora esta seja uma situação conhecida por produtores e tratadores desde sempre. Todos os animais identificados resultavam de cruzamentos entre as raças presentes nesta exploração.

A *Herdade do Pinheiro*, S.A., situa-se na freguesia do Pinheiro, Alcácer do Sal. Esta é uma exploração de 5000 hectares dedicada à cria e engorda de bovinos de carne, à cultura do arroz (cerca de 200 hectares) e pinhão e ainda à caça, sobretudo de pombos. Tem um efetivo de reprodutores das raças Mertolenga, Blonde D' Aquitaine, Charolês e Limousine e possui (à data deste estudo) 120 machos, 93 dos quais com menos de 8 meses e 663 fêmeas, 454 com mais de 2 anos (que constituem o seu efetivo de reprodutoras). O efetivo é vacinado para BVD (*Bovine Viral Diarrhea*) (Bovilis BVD®) e *Clostridium* (Covexin 8®) em Maio e Novembro e desparasitados contra endo e ectoparasitas semestral e alternadamente com Ivermectina e Ivermectina mais Closantel, respetivamente. A herdade situa-se numa zona de montado, com estrato arbóreo constituído sobretudo por Sobreiro (*Quercus suber*) e Pinheiro (*Pinus* spp). A alimentação dos animais é baseada em pastagem natural e semeada, embora em certos períodos do ano de maior carência os animais procurem alimentos alternativos como a bolota de sobreiro (Setembro a Janeiro) e folhas de sobreiro (rama das árvores e árvores jovens) que estão disponíveis todo o ano.

Na sequência deste pedido de colaboração por parte desta exploração surge então a elaboração desta dissertação, cujos objetivos principais são a confirmação do diagnóstico inicialmente efetuado, a elaboração de estratégias preventivas e o levantamento de novas questões, ainda por esclarecer na bibliografia existente, acerca desta problemática.

2) Revisão bibliográfica

2.1) Caracterização dos taninos

Sabe-se que taninos e seus metabolitos, quando consumidos em excesso, são compostos tóxicos para ruminantes. Segundo a sua estrutura química estas substâncias podem ser divididas em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados, sendo que algumas moléculas possuem características destes dois grupos.

Taninos condensados (ou protocianidinas) são polímeros flavonóides, unidos por ligações carbono-carbono, de peso molecular elevado. As protocianidinas tendem a tornar o meio de cor avermelhada quando em contacto com ácido (Van Soest, 1994), sendo um método útil e fácil de identificar a sua presença em alguns alimentos. O peso destas moléculas dificulta a sua degradação pela flora ruminal e absorção intestinal, apresentando uma baixa toxicidade (exceto quando ingeridos em grandes quantidades) (Smith *et al*, 2005). Taninos condensados tendem a ser mais frequentes na natureza. Quanto a taninos hidrolisáveis estes possuem um núcleo central formado por um glúcido e ligações éster entre os grupos hidroxilo e ácido gálico (Van Soest, 1994). Este grupo de compostos químicos já possui um peso molecular adequado à absorção intestinal originando intoxicações sistémicas, por vezes fatais. As tanases ruminais atuam na metabolização do ácido gálico em pirogalol e outras moléculas de baixo peso molecular que são depois absorvidas a nível intestinal (Sandusky *et al*, 1977; Salem *et al*, 2011). Conhecem-se quatro classes de taninos hidrolisáveis: galotaninos, elagitaninos, taragalotaninos e cafetaninos (Van Soest, 1994).

A capacidade de ligação dos taninos a proteínas é a sua característica mais conhecida e bem estudada. A ligação destes compostos a proteínas salivares é, aliás, o que lhes confere a característica adstringência notada em alguns vinhos (Van Soest, 1994). Existem quatro tipos de ligações possíveis entre compostos tanínicos e proteínas (Frutos *et al*, 2004): ligações de hidrogénio (reversíveis e dependentes do pH) entre os radicais hidroxilo os grupos fenólicos e o oxigénio do grupo amida das ligações peptídicas das proteínas; por ligações hidrofóbicas (reversíveis e dependentes do pH) entre os anéis aromáticos dos compostos fenólicos e as regiões hidrofóbicas das proteínas; por ligações iónicas (reversíveis) entre o ião fenólico e o catião das proteínas e por ligações covalentes (irreversíveis) através da oxidação dos polifenóis a quinonas e a posterior condensação com grupos nucleofílicos das proteínas.

Aproveitando esta capacidade de formar complexos com proteínas, métodos de análise quantitativa e qualitativa a compostos polifenólicos baseiam-se na sua precipitação com proteína, adsorção de taninos em proteína insolúvel, precipitação com sais de metais pesados, formação de produtos colorimétricos pela oxidação de taninos e medição UV (Van Soest, 1994). Serão brevemente descritos os métodos mais comumente usados.

2.1.1) Precipitação com proteína

Um método simples de identificação da presença de taninos é a sua precipitação quando adicionados a gelatina, uma metodologia desenvolvida por Hagerman e Butler (1978) (citado por Van Soest, 1994). Para medir a quantidade de taninos presente pode usar-se um método gravimétrico em que é medida a quantidade de gelatina antes e depois de adicionada a solução contendo taninos. Tem sido usada uma metodologia semelhante na indústria cervejeira em que se usa caseína para medir a quantidade de taninos presente na cerveja.

É também muito usado o método *Hide powder* (ISO 14088:2012), em que a amostra contendo taninos é seca e depois de rehidratada é passada por couro reduzido a pó, que tem reatividade para com os polifenóis. As moléculas de polifenóis que ficarem fixas ao pó são classificadas e quantificadas como taninos. Embora seja um bom método de quantificação, não dá informação qualitativa acerca da molécula de taninos envolvida.

Existe ainda a hemanálise, desenvolvida por Bate-Smith (1973), em que uma solução de sangue fresco é misturada à solução de amostra. Após centrifugação desta mistura, é feita uma leitura colorimétrica do sobrenadante (proteína + taninos) e obtém-se um teor em Equivalente de Ácido Tânico (Tannic Acid Equivalent ou TAE).

Como foi referido os métodos de quantificação colorimétricos são os mais usados pela sua facilidade, no entanto a extração e quantificação recorrendo ao método radioquímico de Hagerman e Butler (1980) (citado por Van Soest, 1994) é mais sensível.

2.1.2) Adsorção em proteínas insolúveis

O mais usado é o método de Andersen e Todd (1968) (citado por Van Soest, 1994) que usa polivinilpirrolidona (PVP) que por ser um polímero de moléculas muito grandes é insolúvel em água e pode ser usado como um agente adsorvente. A medição é feita passando a solução amostra por uma coluna de PVP e medindo a quantidade de matéria orgânica perdida na mistura, por gravimetria.

2.1.3) Precipitação com sais de metais pesados

Alguns iões formam complexos coloridos quando em solução com polifenóis. As diferentes cores estão associadas a diferentes moléculas de polifenóis. A mistura da amostra de taninos com os iões é depois lida recorrendo a um espectrofotómetro.

2.2) Taninos na natureza – espécie arbórea *Quercus*

Os taninos são considerados compostos secundários das plantas e encontram-se em várias espécies, sem preferência por determinado clima. Foram detetados taninos em espécies das famílias *Betulaceae*, *Cesalpinaeae*, *Cistaceae*, *Fagaceae* (que inclui o género *Quercus*), *Leguminaceae* e *Poaceae*, por exemplo.

Neste trabalho vamos debruçar-nos sobre o género *Quercus*, uma vez que a exploração na qual se identificaram estes casos clínicos tem uma flora com abundância em Sobreiro (*Quercus suber*). Os taninos são habitualmente mais abundantes nas zonas da planta mais nutritivas e apetecíveis para os herbívoros, como sejam a folha e o fruto. Quanto ao teor de taninos nas folhas de sobreiro, não se encontram estudos que os quantifiquem, no entanto, um estudo efetuado usando folhas de Carvalho inglês (*Quercus rubor*) demonstrou que as folhas num estadio mais imaturo eram mais ricas em taninos hidrolisáveis e glicósidos flavonoides (Salminen *et al*, 2004). No mesmo trabalho verificou-se que as protocianidinas (ou taninos condensados) eram mais abundantes em folhas já maduras.

Relativamente ao teor de taninos na bolota, este varia em função da variação de fatores climáticos (como temperatura e pluviosidade, por exemplo), do grau de maturação dos tecidos vegetais, da exposição a agentes fitogénicos ou a excessiva predação por herbívoros (Frutos *et al*, 2004). Consoante a subespécie de *Quercus*, será também diferente o teor de taninos presente. Alguns autores já mediram a percentagem de taninos hidrolisáveis e condensados na bolota. Um estudo (Tejerina *et al*, 2011) realizado em bolotas de *Quercus suber* e *Q. rotundifolia* conclui que os valores de taninos condensados na bolota (medido em g catequina/kg MS) era sempre inferior à concentração de taninos hidrolisáveis (medidos em g ácido gálico/kg MS e g ácido elágico/kg MS). Quanto ao tipo de taninos hidrolisáveis presente, Tejerina *et al* (2011), concluíram que a concentração de ácido gálico era três vezes superior à de ácido elágico. Resultados diferentes obtiveram Cantos *et al* (2003) que concluíram, por análise cromatográfica, que a bolota de sobreiro era mais rica em polifenóis do espectro do ácido elágico.

Quanto a uma variação sazonal da concentração de taninos na bolota, à semelhança do que acontece nas folhas de sobreiro, o mesmo estudo referido mais acima (Tejerina *et al*, 2011) verificou que ambos os tipos de taninos (hidrolisáveis e condensados) sofriam uma variação sazonal, estando em maior concentração em Novembro e diminuindo progressivamente até Janeiro.

Resultados semelhantes foram também obtidos por Almeida e Marinho (1992) (Tabela nº1) que determinaram que a concentração em taninos na bolota de Azinheira (*Qercus ilex*) é maior em Setembro (9,76 TAE %MS) em comparação com Novembro (2,94 TAE %MS). A FEDNA (Fundacion Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal) analisou bolotas de Azinheira e Sobreiro e concluiu que os taninos constituem cerca de 2,3% da bolota fresca. Dentinho *et al* (2005) analisaram igualmente a bolota de Azinheira e concluíram que a concentração de compostos fenólicos (7,7 em equivalente de ácido tânico na %MS) é superior em Novembro, comparando com Dezembro (3,5 em equivalente de ácido tânico na %MS). Mas por sua vez, a concentração de taninos condensados é maior em Dezembro (5,2 em equivalente de catequina na %MS), do que em Novembro (3,5 em equivalente de catequina na %MS). Estes valores confirmam que a bolota em fases mais imaturas é mais prejudicial, uma vez que a concentração de taninos em equivalente de ácido tânico é maior.

Tabela nº1 - Evolução da composição química da bolota ao longo da sua maturação (Adaptado de Almeida e Marinho, 1992)

	Época de colheita		
	Setembro	Outubro	Novembro
Matéria Seca	46,36 %	53,43 %	58,32 %
Proteína Bruta	3,16 %	3,26%	3,69 %
Gordura Bruta	5,0 %	7,7 %	8,5 %
Açúcares Solúveis	9,41 %	10,20 %	13,43 %
Amido	17,98 %	51,64 %	57,29 %
Fenóis totais	7,32 %	7,94 %	4,90 %
Taninos (Eq. Ácido tânico)	9,76	7,35	2,94

2.3) Sinais clínicos

A ingestão de bolota nem sempre causa uma intoxicação aguda e fatal já que, o curso da intoxicação vai depender da quantidade de bolota consumida, da estrutura e peso molecular do composto tanínico e da espécie animal que consome o fruto (Frutos *et al*, 2004). Por exemplo, grandes quantidades de bolota quando consumidas num curto espaço de tempo podem causar a morte dos animais em menos de 24 horas, mas a ingestão de pequenas quantidades ao longo de um período maior de tempo pode levar a doença crónica com progressiva deterioração renal (Wiseman & Thompson, 1984).

Nem todas as espécies de ruminantes são igualmente afetadas pela ingestão dos taninos. Sabe-se que os cervídeos são uma espécie mais resistente a estes compostos pela produção de quantidades enormes de saliva rica em prolina (efeito descrito mais à frente) (Frutos *et al*, 2005). Os caprinos, por exemplo, são também menos suscetíveis à intoxicação por taninos, embora não tenham uma produção salivar rica em prolina. Deverão, por isso, existir outros mecanismos de adaptação do animal e da própria flora ruminal a este tipo de substâncias tóxicas.

Os efeitos tóxicos provocados pelos taninos prendem-se, sobretudo, à sua capacidade de formação de complexos estáveis com as proteínas.

Os sinais clínicos referidos na literatura associados a uma grande ingestão de bolota são anorexia, letargia, atonia ruminal, um período de constipação seguido de diarreia hemorrágica, edema subcutâneo e anomalias da função renal, que podem ser expressas por poliúria e polidipsia (Sandusky *et al*, 1977, Hervás *et al*, 2003).

Em casos reportados na bibliografia os animais acabam por morrer nos três dias que se seguem ao aparecimento desta sintomatologia, sendo que aqueles cronicamente afetados apresentam fraqueza, edema subcutâneo (mais evidente na zona da barbela), desidratação, hematuria e poliúria (Sandusky *et al*, 1977).

Análises à urina revelam, por vezes, diminuição da densidade urinária, proteinúria, hematuria e glicosúria (Plumlee *et al*, 1998; Frutos *et al*, 2004).

Análises bioquímicas ao sangue de animais intoxicados revelam aumento dos valores de ureia e creatinina (Wiseman & Thompson, 1984; Spier *et al*, 1987; Plumlee *et al*, 1998; Hervás *et al*, 2003; Pérez *et al*, 2011). Um estudo quantificou os valores sanguíneos de alguns iões e encontrou hiponatrémia, hipercalémia, hipoclorémia e acidose metabólica (Spier *et al*, 1987).

2.4) Lesões

No exame *post mortem* observa-se ao exame da cavidade abdominal, acumulação de fluido ascítico, enterite hemorrágica e ulceração ao longo do trato gastrointestinal podendo ser encontradas bolotas no rúmen (Sandusky *et al*, 1977; Wiseman & Thompson, 1984; Hervás *et al*, 2003; Pérez *et al*, 2011) (Figura nº3). Ao longo de todo o trato gastrointestinal a mucosa pode apresentar uma cor alaranjada, quando é fornecido aos animais extrato de quebracho (Hérvás *et al*, 2003). O abomaso e intestino delgado apresentam-se distendidos e com conteúdo mais aquoso. A mucosa cecal pode apresentar-se mais espessa e coberta de muco denso (Hérvás *et al*, 2003).

As úlceras presentes no trato gastrointestinal são geralmente bem demarcadas (de 0,5 a 3 mm de diâmetro), de bordos congestivos, não perfuradas e preenchidas de material necrótico (Hérvás *et al*, 2003; Pérez *et al*, 2011). Quando o grau de ulceração é extenso pode ser sentido, por vezes, um forte cheiro amoniacal ao exame da cavidade oral destes animais (Wiseman & Thompson, 1984).

Pontualmente, ao longo do trato gastrointestinal, as análises histopatológicas revelam infiltrados de células inflamatórias, nomeadamente neutrófilos. Podem também observadas áreas de necrose, correspondentes às úlceras identificadas macroscopicamente (Hérvás *et al*, 2003).

Os rins apresentam-se atrofiados, firmes e de cor cinzenta, por vezes com presença de hemorragias petequiais (Sandusky *et al*, 1977; Wiseman & Thompson, 1984). O córtex apresenta-se geralmente pálido e com sinais de edema perirenal. Exames histopatológicos efetuados revelaram necrose multifocal dos tubos contornados proximais (Sandusky *et al*, 1977; Ostrowski *et al*, 1989; Pérez *et al*, 2011).

2.5) Fisiopatologia

2.5.1) Alteração do estado geral

Apesar dos tão conhecidos efeitos deletérios causados por taninos, vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de encontrar um equilíbrio entre as concentrações ingeridas de taninos e a produção de efeitos benéficos para a produtividade do animal.

Um dos primeiros passos tomados nesse sentido foi a análise química de taninos na tentativa de provar o seu efeito antioxidante. Um destes exemplos é um estudo realizado com compostos flavonoides que concluiu que protocianidinas mostram maior poder antioxidante do que produtos químicos comumente usados na indústria alimentar para esse efeito (Beninger *et al*, 2003). Estes resultados são apoiados por outro autor que revelou que taninos são antioxidantes mais potentes que fenóis monoméricos (Hagerman *et al*, 1998).

Existem, igualmente, artigos que descrevem que concentrações moderadas de protocianidinas (55 g/kg MS) beneficiam o crescimento do velo, o ganho de peso vivo, a produção de leite e a taxa de ovulação em ovelhas (Min *et al*, 2001; Min *et al*, 2003). Quanto aos efeitos benéficos, mais um é geralmente apontado (e será abordado mais à frente) - taninos condensados têm sido adicionados em concentrações moderadas à dieta de ruminantes no sentido de aumentar a eficiência de digestão do azoto, reduzindo os níveis de emissão de metano (Min *et al*, 2003).

Por fim alguns estudos concluíram que a ingestão de taninos diminui a carga parasitária em ovelhas, sendo que estas em alturas de maior infestação parasitária procuram alimentar-se de plantas ricas em taninos (Juhnke *et al*, 2012).

No entanto, os resultados nem sempre são satisfatórios. Um estudo revelou que quando se ultrapassam os 55 g/kg MS de protocianidinas os animais apresentam diminuição da ingestão de matéria seca, inibição da digestão ruminal de fibra e diminuição da produtividade (Min *et al*, 2001).

Efeitos benéficos ao nível da ingestão de alimento verificam-se sobretudo quando existe um consumo de pequenas quantidades de taninos como suplemento à dieta habitual, resultando num aumento da ingestão de alimento (Krueger *et al*, 2010). Estudos confirmam que esta “pequena quantidade” corresponderá a menos de 50 g/kg de matéria seca de protocianidinas (Frutos *et al*, 2004), outros trabalhos definem este limite nos 55 g/kg de matéria seca (Min *et al*, 2003) ou ainda abaixo de 3,0 g extrato quebracho/kg peso vivo (Hervás *et al*, 2003). Acima destes valores os animais apresentam diminuição da ingestão de alimento, perda de peso e depressão, bem como lesões do trato gastrointestinal e alteração de parâmetros sanguíneos (Hervás *et al*, 2003).

De lembrar que os estudos apresentados apenas revelam efeitos de taninos condensados, estando possíveis efeitos benéficos de taninos hidrolisáveis, em especial do ácido tânico, ainda por identificar.

2.5.2) Ação a nível gastrointestinal

Os sinais clínicos que os animais apresentam, bem com as lesões macroscópicas observadas na necrópsia são o reflexo das interações entre taninos e proteína e ainda dos efeitos diretos e indiretos destas moléculas na microflora ruminal.

Relativamente aos efeitos sobre bactérias, fungos e protozoários da flora ruminal, taninos podem afetar estes microrganismos por ação direta sobre os mesmos – através da alteração da permeabilidade das membranas celulares ou interação com a sua atividade enzimática. Vários estudos têm sido realizados no sentido de aprofundar estes efeitos deletérios. Embora sejam investigações *in vitro*, contribuem para a perceção das alterações no ambiente rumino-intestinal *in vivo* e as suas consequências a longo prazo.

Um estudo realizado em ratos revelou que alimentação à base de *Acacia angustissima* (espécie de Acácia rica em taninos condensados) altera a microflora gastrointestinal destes animais, resultando numa predominância de bactérias gram negativas (provavelmente com maior tolerância aos taninos) (Smith *et al*, 2004). Um outro estudo realizado em ovelhas Baloochi (raça originária do Paquistão), concluiu que a inclusão de taninos na dieta diminui a população de bactérias celulolíticas do rúmen (Ghasemi *et al*, 2012). Um outro estudo realizado em ovelhas demonstrou que animais alimentados com plantas ricas em taninos (em específico *Calliandra*) apresentavam menos bactérias celulolíticas do que ovelhas alimentadas apenas com erva (McSweeney *et al*, 2001).

Também as bactérias proteolíticas podem ser afetadas pela ação de taninos. Num estudo a interação de taninos com o conteúdo ruminal causou diminuição das bactérias proteolíticas, embora não tenha ocorrido redução da produção de azoto ou do fluxo deste para o abomaso (Min *et al*, 2002). Estes autores sugerem que os efeitos na inibição das proteases microbianas pelos taninos deve ser específica para cada espécie microbiana.

No que respeita às alterações na atividade enzimática da microflora, um estudo relata que na presença de taninos condensados *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes* têm atividade enzimática reduzida (BAE *et al*, 1993; Nelson *et al*, 1997), o que prejudica o funcionamento do trato gastrointestinal e predispõe a uma acidose ruminal ou proliferação de *Clostridium perfringens*. Outro estudo (Makkar *et al*, 1988) analisou algumas enzimas microbianas ruminais em bovino e concluiu que a atividade enzimática da protease, urease e CMCcase estavam diminuídas na presença de uma alimentação rica em *Quercus incana* (uma subespécie de carvalho).

Há, no entanto, bactérias da flora ruminal capazes de metabolizar taninos hidrolisáveis. Um estudo (Odenyo *et al*, 2001) feito com conteúdo ruminal de animais da região de África revelou que bactérias gram negativas, como *Selenomonas ruminantium*, exibiam uma maior resistência ao ácido tânico do que bactérias gram positivas. É este o caso de *Streptococcus caprinus* que produz pirogalol através da degradação do ácido tânico, na presença de aumento da descarboxilase galato, por ação do ácido tânico (O'Donovan & Brooker, 2001). A possibilidade de os microrganismos ruminais degradarem, também, taninos condensados não está ainda devidamente estudada.

Embora seja ainda uma área com muito a explorar, já existe uma publicação que afirma ter analisado a filogenia de uma bactéria, recolhida a partir do conteúdo fecal de coala, com capacidade de degradar complexos tanino-proteína (Osawa *et al*, 1995).

No que respeita às populações de protozoários do rúmen, um estudo (McSweeney *et al*, 2001) demonstrou que estas populações não são diretamente afetadas pela suplementação alimentar com taninos. Há, no entanto, outros trabalhos cujos resultados revelaram que a população de protozoários do rúmen sofre alterações aquando da interação com taninos (Goel & Makkar, 2012), em especial por ação do ácido tânico (Hristov *et al*, 2003).

Quanto à formação de complexos tanino-proteína, alguns estudos referem que esta interação é inespecífica. No entanto, um estudo conclui que esta ligação é diferente consoante o tipo de tanino e proteína (Asquith & Butler, 1986). Mais estudos deverão ser realizados no sentido de avaliar esta possibilidade, uma vez que o conhecimento de determinadas especificidades pode vir a ser útil na formulação de dietas que aproveitem os efeitos benéficos atribuídos aos taninos, e até na pesquisa de antídotos ou possíveis tratamentos. O que se sabe, até agora, acerca destes complexos é que a sua estabilidade a pH 3,5 a 8 resulta em efeitos tóxicos a nível do rúmen e intestino. No abomaso as lesões são mais raras uma vez que o pH é demasiado ácido e existe dissociação das ligações tanino-proteína (Mangan, 1988; Hagerman *et al*, 1992; Frutos *et al*, 2004). Um outro estudo confirma que taninos são inativados a pH alcalino (acima de pH 8) (Makkar & Becker, 1996), sendo a taxa de inativação maior a temperaturas mais elevadas e podendo ser aumentada pela presença de oxigénio ou outro agente oxidante.

Uma vez que, inicialmente, a nível do rúmen as proteínas se encontram ligadas aos taninos a sua degradação por parte da microflora diminui, conseqüentemente há uma diminuição da produção de azoto e um aumento do fluxo de amónia para o duodeno (MacMahon, 1999).

Um outro estudo (Min *et al*, 2002) demonstrou que alimentar ovelhas à base de *Lotus corniculatus* (forragem que contém taninos condensados) protege a proteína solúvel da planta no rúmen, diminui a actividade da protease ruminal, e aumenta os níveis de azoto bem como o fluxo deste para o abomaso. Isto indica que existe um maior *bypass* ruminal, estando mais proteína disponível para absorção pelo intestino.

No entanto, embora as protocianidinas possam aumentar o fluxo de proteínas para o intestino, uma vez que as tornam indisponíveis para degradação microbiana, um estudo refere que não é garantido que a proteína fique inteiramente disponível após dissociação dos complexos tanino-proteína no abomaso (Waghorn *et al*, 2008). Para que uma adequada quantidade de proteína fique disponível para degradação intestinal é importante que taninos não sejam consumidos em excesso. Um estudo revela que o consumo de *Lotus pedunculatus*, que contém 6 a 12% de taninos na matéria seca, é prejudicial para a degradação proteica no intestino uma vez que estas formam complexos muito estáveis com taninos (Waghorn *et al*, 1994). Como se pode verificar os resultados obtidos não são consensuais, podendo isso dever-se a desenhos experimentais diferentes (*in vivo* versus *in vitro*) ou ainda por se usarem espécies animais e vegetais diferentes.

Conclusões consensuais entre os vários autores é que a formação de complexos tanino-proteína pode ter utilidade na diminuição das emissões de metano e produção de gás, resultante da digestão microbiana ruminal. Um estudo demonstrou que a adição de taninos condensados, provenientes do extrato de acácia, inibiu a fermentação dos substratos presentes no rúmen (Bueno *et al*, 2015). A diminuição de fermentação foi confirmada pela diminuição na produção de gás, não estando a concentração de metano afetada neste caso. O mesmo estudo concluiu que o fator de partição foi maior nos animais suplementados com acácia, revelando uma maior eficiência dos microrganismos ruminais. Vários estudos confirmam estes resultados. Segundo Bhatta *et al* (2009) a produção total de gás foi menor ($P < 0,001$) em incubações que continham taninos, ao contrário de incubações que continham uma mistura de taninos e PEG-6000 (polietilenoglicol-6000), e a diferença foi maior ($P < 0,001$) em incubações taninos hidrolisáveis + taninos condensados do que em incubações apenas com taninos hidrolisáveis. Um outro estudo (Pellikaan *et al*, 2011) verificou que a adição de taninos não afetou a produção total de gás no rúmen, mas reduziu a produção ($P < 0,033$) e concentração de CH₄ (metano) ($P < 0,004$). Neste trabalho a adição de PEG levou a um aumento na produção de gás ($P < 0,018$) e concentração de CH₄ ($P < 0,019$). A adição de PEG parece ter um maior efeito quando em associação com taninos condensados.

Os resultados apresentados são confirmados num outro estudo em que a adição de taninos hidrolisáveis (provenientes de avelã e *Rhus typhina*) numa proporção de 70:30 na dieta diminuiu a produção de metano ($P < 0,05$). A adição de taninos condensados (provenientes de acácia e *Schinopsis* spp), mostrou não alterar significativamente a produção de metano. No entanto, estas fontes de taninos condensados diminuíram a digestibilidade da matéria orgânica e aumentaram a produção de ácidos gordos de cadeia curta, em comparação com as fontes de taninos hidrolisáveis. Foram calculadas as alterações na população microbiana e demonstrou-se uma redução na metanogénese para todas as fontes de taninos exceto para *Rhus typhina*. A adição de taninos condensados aos conteúdos ruminais em estudo diminuiu a produção de gás e a digestibilidade da matéria orgânica em maior grau do que o verificado para os taninos hidrolisáveis. Estes resultados sugerem que taninos hidrolisáveis serão mais eficazes na diminuição das emissões de metano (Goel & Makkar, 2012).

Estudos afirmam que a interação dos taninos no processo da metanogénese se deve não apenas à formação de complexos com proteína, mas também através da sua atividade antiprotozoária (Bhatta *et al*, 2009; Goel & Makkar, 2012). Sugere-se ainda que os taninos hidrolisáveis atuarão pela inibição da atividade dos microrganismos responsáveis pela produção de hidrogénio e que taninos condensados atuarão pela diminuição da digestão de fibra, a cargo das populações de protozoários ruminais (Goel & Makkar, 2012).

É importante realçar que estes resultados se mostram benéficos sempre que as dietas são formuladas com a adequada quantidade em proteína. Sempre que dietas suplementadas com taninos (protocianidinas ou ácido tânico) apresentam concentrações de proteína perto do limite mínimo necessário, a ação de compostos tanínicos torna-se prejudicial (Waghorn, 2008).

Os taninos interferem igualmente no pH ruminal e na produção de ácidos gordos voláteis. Um estudo concluiu que a ação do ácido tânico causa redução drástica da atividade de degradação dos polissacáridos e concentração de amónia, bem como concentrações individuais e totais de ácidos gordos voláteis (Hristov *et al*, 2003). Num outro estudo (Pellikaan *et al*, 2011) a adição de taninos levou a diminuição na concentração de ácidos gordos voláteis, NH_3 (amónia) e pH do conteúdo ruminal. A adição de taninos hidrolisáveis teve como consequência um aumento proporcional da concentração de acetato, já o propionato diminuiu com a adição de taninos hidrolisáveis, mas não com a adição de taninos condensados. Como referido anteriormente, os taninos podem também formar complexos com fibra, embora os seus efeitos deletérios sobre a degradação ruminal de fibra sejam quase negligenciáveis.

Um trabalho acerca dos efeitos de consumo de acácia, *Schinopsis* spp e avelã afirma que este efeito sobre a degradação de fibra se deve à diminuição de fungos anaeróbios como *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens* (Goel & Makkar, 2012).

Já foi referido o potencial efeito benéfico dos taninos na redução das emissões de metano. Outro efeito benéfico que tem vindo a ser estudado é a possibilidade de uma suplementação de taninos na dieta diminuir a incidência de timpanismo. Plantas como *Lotus corniculatus*, *Lotus pedunculatus* e *Onobrychis viciifolia*, que são ricas em taninos condensados foram consideradas como úteis na prevenção de timpanismo. Verificou-se uma redução da proteína solúvel em animais alimentados à base de taninos condensados, em comparação com luzerna. Os autores sugerem que taninos condensados devem prevenir a proteólise da proteína da dieta ou aumentar o seu fluxo intestinal (McMahon *et al*, 2003).

Podemos concluir que os taninos não têm apenas efeitos deletérios sobre o organismo e que podem até ser usados como suplementos alimentares. De ressaltar que os efeitos da ingestão de taninos condensados ou taninos hidrolisáveis podem ser diferentes, sendo da maior importância conhecer a flora das pastagens para que se conheça qual o tipo de taninos com que estamos a lidar.

Tabela nº2 - Efeitos de taninos condensados na digestão em ruminantes (Adaptado de Waghorn, 2008)

Taninos condensados causam:

- Redução da digestão de proteína da dieta
- Redução da concentração ruminal de amoníaco
- Redução da solubilidade proteica
- Aumento da proporção de proteína que atinge o intestino
- Inibição de algumas bactérias ruminais
- Redução da digestibilidade do azoto; aumento da concentração fecal de azoto
- Redução do *output urinário* de azoto
- Diminuição da percentagem de aminoácidos absorvidos pelo intestino
- Redução da quantidade de Matéria Seca da dieta
- Menor proporção de energia da dieta perdida para o metano

Taninos condensados mais raramente causam:

- Alteração da seleção da dieta
- Redução da ingestão voluntária de alimento
- Redução da velocidade digestiva
- Aumento do volume ruminal
- Redução da taxa de produção e concentração de AGV
- Aumento ocasional, mas normalmente redução da absorção de aminoácidos
- Aumento da tolerância gastrointestinal a parasitas
- Redução do número de parasitas gastrointestinais
- Lesões abomasais e intestinais

Consequências de dietas contendo taninos condensados

Aumento da performance animal dependente do tipo ou concentração de taninos dietéticos, mas também:

- Composição da dieta
- Necessidades animais
- Outros metabolitos secundários

2.5.3) Ação a nível renal

Quanto à fisiopatologia das lesões renais, pouco está descrito na bibliografia. No entanto, sabe-se que a intoxicação por taninos causa doença renal na forma de necrose tubular difusa (Wiseman & Thompson, 1984; Ostrowski *et al*, 1989). A perda de albumina pelo rim leva, frequentemente, a hipoalbuminémia (Radotists, 2000; Yeruham *et al*, 2002). Estas lesões podem ser explicadas como uma resposta fisiológica à isquémia renal que ocorre em consequência das lesões gastrointestinais, causando diminuição da taxa de filtração glomerular (Spier *et al*, 1987). Os resultados de um estudo revelaram que *in vitro*, taninos hidrolisáveis têm a capacidade de bloquear os canais de cloro ativados por cálcio das membranas celulares (Borisova *et al*, 2015), sendo que este bloqueio do fluxo de cloro é dose dependente e não tem qualquer efeito no fluxo de cálcio das membranas celulares. Os resultados podem ser explicados pelo seguinte: a presença de taninos torna a membrana permeável a aniões e a voltagem negativa que se cria diminui a condutância ao ião cloro. Os efeitos deletérios dos taninos sobre o funcionamento renal foram também reportados em vitelos. Num estudo de Plumlee *et al* (1998), vitelos alimentados à base de folhas de bolota de carvalho desenvolveram sinais clínicos e lesões característicos de insuficiência renal.

2.5.4) Edemas

Quanto à presença generalizada de edemas, em particular os edemas das pregas do abomaso e da região submandibular, desconhece-se que seja resultado de um efeito direto dos taninos sobre o metabolismo da albumina. A relação entre os edemas que apresentavam estes animais e o consumo de taninos prende-se com as extensas lesões renais causadas por estes compostos e que comprometem o metabolismo proteico, levando a uma proteinúria de origem renal (Ducan & Prasse, 2003) com extensa perda de proteína, em especial albumina.

2.5.5) “Acorn Calves Syndrome”

Os efeitos dos taninos podem também estender-se aos fetos. Foi já descrito um “Síndrome do Vitelo da Bolota” (Maas, 2008) em que filhos de vacas que ingeriram grandes quantidades de bolota na gravidez nasciam com malformações – pernas mais curtas que o normal, úngulas anormais e anomalias cefálicas. Esta síndrome está associada a situações de escassez durante o segundo trimestre de gestação, o que obriga as mães a ingerirem mais bolota. Não se conhece a causa exata destas malformações, mas parece ocorrer após ingestão de grandes quantidades de bolota.

2.6) Mecanismos de defesa

Ainda pouco se sabe sobre os mecanismos de defesa inerentes ao indivíduo ou à espécie animal no que concerne aos efeitos de uma alimentação rica em taninos. Sabe-se que espécies como cervídeos ou suínos não apresentam grande suscetibilidade aos taninos, levando a supor que possam existir mecanismos fisiológicos capazes de atenuar os seus efeitos tóxicos. No que respeita à sensibilidade da espécie ou raça, tem sido colocada a hipótese de que raças autóctones e habituadas ao consumo de bolota sejam mais tolerantes aos seus efeitos. Num artigo publicado por Frutos *et al* (2005), os autores verificaram que raças bovinas como Avilena-Negra-Ibérica, Morucha ou Retinta não mostraram intoxicações tão frequentes como animais resultantes de cruzamentos com raças não autóctones. Um outro estudo efetuado com cabras da raça Mamber (endémicas da zona do Mediterrâneo) em que metade dos animais era alimentado com erva e a outra metade com folhas de carvalho, detetou apenas pequenas diferenças nos valores de ureia entre os dois grupos (Silanikove *et al*, 1996). Neste estudo nenhum animal exibiu sinais clínicos de toxicidade o que corrobora a hipótese colocada anteriormente de que existe algum mecanismo de adaptação nos animais que consomem bolota como base da sua alimentação.

Para além de mecanismos inerentes ao processo evolutivo da raça e espécie têm sido estudados outros mecanismos fisiológicos e medidas de destoxificação. No que respeita às medidas de destoxificação de taninos, os animais apresentam dois tipos de medidas – pré e pós ingestão. Quanto às medidas pré-ingestão a mais simples e prática de todas é o evitar a ingestão de plantas ricas em taninos, seja pela sua identificação através do cheiro ou cor ou pela experiência adquirida ao longo do processo evolutivo da espécie (Shimada *et al*, 2006). Medidas pós-ingestão incluem a secreção de proteínas que formam complexos com taninos, aumento da produção de muco no trato gastrointestinal, a degradação bacteriana de taninos, a ativação de enzimas destoxicantes e aumento da capacidade intestinal de permeabilidade às glicoproteínas (Dearing *et al*, 2005).

De modo a melhor aprofundar esta temática têm sido analisadas espécies mais tolerantes à intoxicação por taninos, incluindo a espécie humana. Já são conhecidas proteínas salivares que se ligam a taninos (TBSP – *Tannin Binding Salivar Proteins*) que interagem com os taninos na fase oral da digestão. Conhecem-se dois tipos de TBSP's – proteínas ricas em prolina (PRP's) e proteínas ricas em histatina (HRP's) (Dearing *et al*, 2005). Pensa-se que as PRP's são o grupo mais abundante deste tipo de proteínas. Os complexos tanino-PRP são estáveis no trato gastrointestinal (Skopec *et al*, 2004) e a maior parte destes complexos são excretados nas fezes.

Tem sido colocada a hipótese da histatina, uma molécula presente na saliva de humanos e outros primatas, ser mais eficaz na destoxificação de taninos. No entanto, não foram ainda feitos estudos em ruminantes no sentido de avaliar a sua presença nestas espécies animais. A par destes estudos, sabe-se que existem algumas estirpes bacterianas e fúngicas com capacidade de destoxificação de taninos, algumas presentes no rúmen. Nelson *et al* (1995) isolaram do conteúdo ruminal de cabras alimentadas com *Desmodium ovalifolium*, uma planta que contém níveis de 17% de taninos condensados, uma bactéria anaeróbia capaz de metabolizar taninos hidrolisáveis através da degradação do ácido tânico em pirogalol. Um outro estudo concluiu que *Streptococcus pneumonia* e *S. bovis* são organismos capazes de hidrolisar os taninos presentes na bolota, diminuindo assim os seus efeitos negativos para o animal (Mosleh *et al*, 2014). Foi ainda isolada uma estirpe *Aspergillus niger van Tieghem*, recorrendo a um meio contendo taninos como única fonte de carbono e energia. A colónia de fungos mostrou crescimento variável em meios contendo ácido tânico e quebracho, tolerando estas moléculas até 150g (ácido tânico + quebracho) (Bhat *et al*, 1997). Mais uma vez é de ressaltar que estes estudos foram efetuados em ambientes *in vitro* ou com concentrações de taninos na dieta controladas. Estes microrganismos podem não estar em concentrações suficientes no rúmen para que o seu efeito se faça sentir. As condições *in vivo* podem ser obviamente diferentes das condições controladas em laboratório ou as concentrações ingeridas pela maioria dos animais afetados serem maiores do que as que a microflora ruminal tem capacidade de processar.

2.7) Prevenção e tratamento

Não existe atualmente nenhum tratamento efetivo para a intoxicação por taninos. Nos casos em que os animais apresentam sinais de intoxicação pode tentar-se tratamento paliativo recorrendo a fluidoterapia, antibióticos e suporte básico de vida (Maas, 2008). Outras soluções paliativas incluem a administração de óleo mineral ou uma solução de catártico oralmente. Uma vez que taninos e ácido tânico são usados como suplementos alimentares, têm sido estudadas algumas moléculas que podem contrariar alguns dos efeitos causados por estes compostos. Polietilenoglicol tem sido usado como possível antídoto, uma vez que tem capacidade para se ligar irreversivelmente a moléculas de taninos, bem como a proteínas, impedindo a ligação destas duas moléculas (Zalipsky, 1995). Um estudo concluiu que a adição de polietilenoglicol a uma dieta rica em taninos permite neutralizar taninos livres (ou taninos condensados) presentes no rúmen e assim aumentar as populações bacterianas ruminais (McSweeney *et al*, 2001). Resultados semelhantes foram também verificados num outro estudo em que a adição de polietilenoglicol a uma dieta com taninos permitiu aumentar a atividade da flora microbiana no rúmen (Bento *et al*, 2005). Numa outra investigação (Tavendale *et al*, 2005) os resultados da adição de polietilenoglicol a duas espécies forrageiras diferentes revelaram que houve um aumento da formação de metano pelo aumento da produção de hidrogénio, o que pode ser resultante do aumento da degradação de fibra (como foi também proposto por outros autores referidos mais acima). Por fim, alguns autores sugerem o uso de *feed blocks* contendo PEG como uma forma eficaz, de fácil aplicação e barata de suplementar dietas ricas em taninos (Salem *et al*, 2000).

Estudos *in vitro* (Dollahite *et al*, 1966; Rayudu *et al*, 1970) especulavam que a suplementação com hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) pudesse minimizar os efeitos de uma alimentação rica em taninos, principalmente na altura em que se encontram em grandes concentrações na bolota. No entanto, um trabalho mais recente demonstrou que tal não será assim tão linear. Um estudo realizado em cabras demonstrou que a suplementação com hidróxido de cálcio a animais alimentados à base de forragens ricas em taninos não diminui os efeitos prejudiciais das mesmas, muito embora os resultados *in vitro* tivessem sido bastante satisfatórios (Alam *et al*, 2005).

Apesar das propostas apresentadas serem válidas, estes são compostos que se podem tornar caros para a maioria dos produtores e de maior aplicabilidade em regimes de produção intensiva, os animais que passam todo ou parte do ano no pasto são de mais difícil contenção e a suplementação alimentar torna-se inviável quando não existe um estábulo em que os animais comam apenas o que o produtor lhes fornece.

As medidas preventivas são por isso de extrema importância e devem ser adaptadas à realidade de cada exploração. Uma vez que se verifica uma certa sazonalidade na concentração de taninos nas folhas e bolotas, a melhor medida preventiva será afastar o gado da bolota, pelo menos até à altura da sua maturação em Janeiro/Fevereiro. Pode conseguir-se isto estabulando o gado durante parte do ano ou fornecendo um suplemento de feno de qualidade diariamente antes de largar os animais na pastagem. Uma suplementação com feno faz com que os animais estejam já parcialmente saciados quando entram no pasto e comam menos bolota.

3) Descrição de casos clínicos

O sinal que mais se destacava nos animais observados era um edema submandibular mais ou menos pronunciado. Alguns animais, ainda vivos, apresentavam evidentes sinais de magreza, para além do edema já mencionado.

No nosso estudo foram realizadas oito necrópsias e exames físicos a vários animais suspeitos com recolha de sangue para análise em três animais. Todos os animais eram fêmeas, cruzadas de raças de carne, entre os quatro e os 14 anos.

3.1) 20 de Novembro de 2014

Na primeira visita à exploração foi realizado exame físico a três vacas suspeitas de estarem afetadas. Duas delas apresentavam um ligeiro edema submandibular.

Colheu-se uma amostra de sangue para análise num analisador portátil (iSTAT®) (Figura nº 1), contudo, os animais não apresentavam alteração de qualquer dos valores sanguíneos. Posteriormente, em laboratório, realizou-se contagem de proteínas totais sanguíneas e duas das vacas apresentavam 6 g/dL e 6,6 g/dL de proteína no sangue, o que se classifica como uma ligeira hipoproteinémia (referência: 6,9 – 9,0 g/dL; Laboratório Professor M. Braço Forte).



FIGURA Nº 1 - ANALISADOR PORTÁTIL (iSTAT®).
(MIGUEL SARAIVA LIMA)

Neste mesmo dia foram-nos mostradas análises sanguíneas de três animais encontrados mortos alguns dias antes com os mesmos sinais clínicos por nós observados, ou seja com edema submandibular. e que mostravam aumento de ureia e creatinina. Na altura, especulou-se que os animais que vimos neste dia poderiam estar na fase de recuperação de uma lesão renal, ou que as lesões renais não seriam suficientemente graves de modo a causarem aumentos dos níveis sanguíneos de ureia e creatinina.

3.2) 24 de Novembro de 2014

Realizou-se a primeira necrópsia a um animal de quatro anos e 11 meses, cruzado, que morreu três dias antes e apresentava, em vida, edema submandibular.

À abertura da cavidade abdominal observou-se a acumulação de líquido, aproximadamente cinco litros. O líquido presente tinha um aspecto hemorrágico (Figura nº 2).



FIGURA Nº 2 - GRANDE ACUMULAÇÃO DE LÍQUIDO NA CAVIDADE ABDOMINAL.
(MIGUEL SARAIVA LIMA).

O rúmen apresentava bolotas no seu conteúdo. No exame do trato gastrointestinal apenas o abomaso

apresentava pequenas úlceras. O rim apresentava um estado de deterioração avançado, uma vez que a morte se tinha dado há três dias.

Foi feita colheita de sangue para pesquisa de hemoparasitas e recolha de rim e abomaso para exame histopatológico. O exame de sangue, recorrendo a Coloração Giemsa, não revelou presença de hemoparasitas. Quanto ao relatório histopatológico este conclui que o animal apresentava “nefrose intersticial esclerosante crónica com degeneração secundária de túbulos e glomérulos” e “abomasite mononuclear moderada”.

3.3) 1 de Dezembro de 2014

Foi dito que este animal de sete anos, cruzado, não teria mostrado sinais evidentes de doença nos dias que precederam à sua morte, classificando-se como uma morte súbita. No entanto, aquando da realização da necrópsia verificámos que apresentava, à semelhança do caso anterior, um ligeiro edema submandibular, bem como acumulação de líquido ascítico na cavidade abdominal, não sendo possível a apreciação da quantidade presente. Foi



FIGURA Nº 3 - BOLOTAS PARCIALMENTE DIGERIDAS ENCONTRADAS NO RÚMEN DE UM ANIMAL NECROPSIADO.
(MIGUEL SARAIVA LIMA)

encontrada bolota no conteúdo ruminal (Figura nº 3). Tinha, igualmente, os rins em avançado estado de deterioração. Não foram enviadas quaisquer amostras para análise histopatológica, uma vez que o cadáver já apresentava algum grau de deterioração.

3.4) 8 de Dezembro de 2014

Foi realizada necrópsia a mais um animal de nove anos, cruzado, encontrado morto no pasto. Ao exame da cavidade abdominal verificou-se que apresentava uma jejunita hemorrágica, com acumulação de coágulos de sangue no intestino grosso de grandes dimensões e sangue no ceco. À abertura do rúmen verificámos que apresentava bolota no seu conteúdo. O rim encontrava-se autolisado, apesar da morte se ter dado apenas na noite anterior e a temperatura ambiente se encontrar baixa. Na altura suspeitou-se de morte devido a uma infeção por *Clostridium perfringens* uma vez que as lesões no trato gastrointestinal visualizadas e a história de morte súbita se assemelhavam às características causadas por este agente.

Em conversa mais pormenorizada com o produtor este referiu que já anteriormente tiveram casos de Fasciolose, por isso optou-se por enviar uma amostra de fígado deste animal para histopatologia.

O relatório histopatológico ao fígado e rim revelou “hepatite multifocal necrótica de etiologia bacteriana (microabcessos)” e “nefrite intersticial de tipo esclero-quístico”.

3.5) 12 de Janeiro de 2015

Foram realizadas duas necrópsias, a animais cruzados, ambos com sinais de doença há alguns dias, mas apenas uma das vacas apresentava edema submandibular (Figura nº 4)

(vaca nº 1, de nove anos). A vaca nº 2, de cinco anos, estava sem comer e a perder peso há alguns dias, estando grávida de termo. A vaca nº 1 ao corte da pele e tecido subcutâneo apresentava petéquias na gordura subcutânea. À abertura da cavidade torácica era evidente uma acumulação de líquido no pericárdio. O exame da cavidade abdominal revelou marcado edema das pregas do abomaso. Os rins



FIGURA Nº 4 - CADÁVER APRESENTANDO MARCADO EDEMA SUBMANDIBULAR.
(MIGUEL SARAIVA LIMA)

encontravam-se atrofiados, de cor cinzenta escura e duros ao corte.

A vaca nº 2 apresentava apenas de relevante lesões renais semelhantes às encontradas na vaca nº 1. Foi encontrada bolota no interior do rúmen.

O relatório da análise histopatológica destes rins revelou presença de “nefrite intersticial crónica”.

3.6) 26 de Abril de 2015

Foi realizada nova necrópsia a um animal de seis anos, cruzado de raças de carne, que morreu no dia anterior. Esta vaca apresentava lesões de enterite hemorrágica no íleo e intestino grosso e rúmen com conteúdo muito líquido. O

conteúdo ruminal não apresentava vestígios de bolota. Os rins encontravam-

se atrofiados e duros ao corte, à semelhança do que já tinha sido encontrado em outros animais necropsiados (Figura nº 5).



FIGURA Nº 5 – RIM DE ASPETO SEMELHANTE AO ENCONTRADO NOS ANIMAIS NECROPSIADOS, APRESENTANDO ATROFIA. (GEORGE STILLWELL)

3.7) 29 de Abril de 2015

Os proprietários optaram por abater um animal de 14 anos, cruzado, que vinha apresentando edema submandibular e magreza (Figura nº 6), tendo sido realizada a necrópsia logo após o abate. À abertura da carcaça era evidente a presença de edemas nas cavidades abdominal (com marcado edema das pregas do abomaso) (Figura nº 7) e torácica. Os pulmões apresentavam algumas lesões consistentes com pneumonia. O conteúdo ruminal não apresentava vestígios de bolota.

De relevante há ainda a assinalar as lesões renais, semelhantes às já encontradas noutros casos e ainda a palidez dos órgãos.

O exame sanguíneo realizado com um analisador portátil (iSTAT®) revelou aumento dos valores de ureia - >140 mg/dL (referência: 6 - 27 mg/dL; Radostits *et al*, 2000) e potássio – 6.6 mg/dL (referência: 3,9 – 5,8 mg/dL; Radostits *et al*, 2000). Tendo estes valores sido interpretados como consequência das lesões renais encontradas.

O exame da urina revelou proteinúria, um achado não encontrado nos outros animais.

Análises bioquímicas, em laboratório, efetuadas ao sangue desta vaca revelaram aumento dos valores de creatinina – 6,6 mg/dL (referência: 1 - 2 mg/dL; Radostits *et al*, 2000), hipoalbuminémia – 2,1 g/dL (referência: 2,5 – 3,6 g/dL; Laboratório Professor M. Braço Forte) e diminuição do hematócrito – 12,3 % (referência: 24 – 46 %; Radostits *et al*, 2000). O baixo valor de hematócrito pode justificar a palidez das mucosas e serosas encontrada.

Colheu-se rim, fígado e pulmão para exame histopatológico, tendo este revelado “nefrite intersticial crónica, complicada por amiloidose glomerular”, “necrose hepática de padrão zonal” e “pneumonia intersticial”.

Foi também pedida uma pesquisa de parasitas sanguíneos na tentativa de encontrar uma explicação para a anemia, revelando-se a presença de Theileria e Anaplasma.



FIGURA Nº 6 - ANIMAL ANTES DO ABATE APRESENTANDO EVIDENTES SINAIS DE MAGREZA. PROFESSOR DOUTOR MIGUEL SARAIVA LIMA.



FIGURA Nº 7 - EVIDENTE EDEMA DAS PREGAS DO ABOMASO. PROFESSOR DOUTOR MIGUEL SARAIVA LIMA.

3.8) 23 de Junho de 2015

Foi realizada uma necrópsia a um animal de quatro anos, cruzado, que havia morrido na noite anterior. O animal apresentava magreza e os proprietários disseram que estava referenciada para refugo, uma vez que aos quatro anos ainda não tinha ficado gestante (mesmo depois de duas épocas montada pelo touro).

Ao exame da cavidade abdominal era evidente a presença de edemas em vários órgãos, embora não fossem observados edemas subcutâneos. Observou-se hidroperitoneu moderado. À abertura dos órgãos abdominais, verificou-se marcado edema das pregas do abomaso, conteúdo hemorrágico e petéquias nos intestinos delgado e grosso. O conteúdo ruminal não apresentava vestígios de bolota.

Uma vez que a morte se tinha dado apenas umas horas antes da realização da necrópsia, foi recolhido sangue para análise bioquímica. Os resultados revelaram aumento da ureia – 627,4 mg/dL e creatinina – 23,6 mg/dL e ligeira hipoalbuminémia – 2,1 g/dL.

Foi também colhido rim, fígado, intestino delgado e intestino grosso para análise histopatológica. Os resultados revelaram uma “glomerulonefrite crónica”. Os outros órgãos não apresentavam alterações significativas.

4) Resumo dos casos clínicos

Pela análise da Tabela nº3 pode concluir-se que o sinal mais consistentemente encontrado é a presença de um edema submandibular, seguido de atrofia renal. Lesões no trato gastrointestinal são encontradas em quase metade dos animais necropsiados, sugerindo que a degenerescência renal em conjunto com estas lesões contribuíram para um desgaste do estado geral e subsequente morte do animal. A presença de bolota no rúmen nalguns destes animais confirma o acesso que estes têm a este alimento em certas épocas do ano, uma vez que a presença de sobreiros é abundante nesta exploração.

Tabela nº3 - Resumo dos achados da necrópsia

Achados	Nº de observações
Edema submandibular	6
Atrofia renal	5
Magreza	3
Líquido cavidade abdominal/peritoneal	3
Enterite hemorrágica	3
Bolota no rúmen	3
Edema das pregas abomasais	3
Palidez dos órgãos	1
Úlceras abomaso	1
Líquido pericárdio	1

Pela Tabela nº4 podemos concluir que a azotémia e hipoalbuminémia são achados comuns. O aumento da ureia e creatinina são achados consistentes com a marcada lesão renal já relatada, o que corrobora a hipótese desta ter contribuído para a morte destes animais. Quanto à hipoalbuminémia, seria um achado que esperaríamos numa maior percentagem de casos, uma vez que a grande maioria dos animais apresentava um marcado edema submandibular.

Tabela nº 5 - Resumo dos resultados das análises ao sangue e urina (5 animais)

Achados	Nº de observações
Aumento ureia	2
Aumento creatinina	2
Hipoalbuminémia	2
Diminuição do hematócrito	2
Aumento potássio	1
Hipoproteinémia	1
Proteinúria	1

A análise da Tabela nº5 permite concluir que um achado frequente é a presença de nefrite intersticial (o que é concordante com a atrofia renal encontrada na maioria dos animais). Alguns animais apresentavam também lesões a nível do abomaso e fígado, o que é concordante com as alterações macroscópicas identificadas na necrópsia.

A lesão pulmonar encontrada num dos animais concluiu-se não ter qualquer relação com o problema principal que estaria a afetar esta exploração, tratando-se de uma lesão apenas deste indivíduo.

Tabela nº 5 - Resumo dos resultados das análises histopatológicas (5 animais)

Achados	Nº de observações
Nefrite intersticial crónica...	4
Tipo esclerosante	1
Tipo esclero-quístico	1
Nefrose intersticial esclerosante crónica	1
Amiloidose glomerular	1
Glomerulonefrite	1
Abomasite mononuclear	1
Hepatite multifocal necrótica	1
Necrose hepática	1
Pneumonia intersticial	1

As análises efetuadas quando analisadas em paralelo com os achados de necrópsia, permitem concluir que estes animais terão morrido por consequência da marcada degenerescência renal.

Como já foi referido acima, as lesões encontradas no fígado e pulmão de alguns animais podem ser atribuídas à idade avançada desses indivíduos e ainda a uma deterioração do seu estado geral, que já estaria comprometido com as marcadas lesões renais e gastrointestinais.

5) Diagnóstico

A história clínica destes animais, associada às especificidades do seu manejo levou a que se considerassem dois diagnósticos diferenciais: Intoxicação por taninos (associada à ingestão de bolota de sobreiro) e Infestação parasitária por *Fasciola hepatica* (uma vez que os animais pastam em locais junto a lagoas e charcas). Uma vez que nenhum dos animais apresentava lesões hepáticas, características de Fasciolose, e sendo que as lesões renais e gastrointestinais encontradas são concordantes com as descritas na bibliografia, concluiu-se que a causa de morte mais provável terá sido uma intoxicação por acumulação sistêmica de taninos.

Neste caso não se tratará de casos de intoxicação aguda, mas antes de uma acumulação sistêmica de taninos ao longo de vários anos, já que os animais têm acesso a bolota e a folhas de sobreiro durante todo o ano, sendo que em épocas de escassez de pasto os animais têm que recorrer a este tipo de alimento como fonte energética.

No entanto, e apesar das evidências apontarem para uma intoxicação por consumo excessivo de bolota, consultámos o programa online *Consultant* (*Cornell University*) a fim de procurar diagnósticos diferenciais que pudessem explicar esta situação. Ao introduzir a nossa lista de sinais clínicos, obtivemos como diagnósticos possíveis: “Intoxicação por consumo de bolota, Intoxicação por gossipol, Fasciolose, Peritonite e Intoxicação por alcaloide de pirrolizidina” (por esta ordem).

6) Discussão

Com base apenas nos sinais clínicos apresentados por estes animais – magreza, anorexia e edema submandibular – poderíamos considerar diversos diagnósticos diferenciais, nomeadamente Amiloidose renal, Fasciolose (referida anteriormente), Paratuberculose, Glomerulonefrite, Fome prolongada, por exemplo. No entanto, a análise das fontes bibliográficas, em especial no que se refere aos achados da necrópsia e sinais clínicos, permitiu confirmar a suspeita inicial de que os animais que acompanhamos sofreram de uma intoxicação por taninos. Embora as lesões de enterite hemorrágica referidas nas fontes consultadas não fossem um achado consistente nas necrópsias que efetuámos, as lesões renais e análises sanguíneas (aumento de ureia e creatinina, hipoalbuminémia) não deixam qualquer dúvida acerca da etiologia destas mortes.

Na altura não pareceu pertinente uma análise laboratorial mais extensa à presença de taninos nestes animais (como sejam a Precipitação com proteína, a Adsorção em proteínas insolúveis ou a precipitação com metais pesados), uma vez que sendo as folhas de sobreiro e a bolota (nos meses de Setembro a Dezembro) a base da sua alimentação esperaríamos encontrar taninos, em particular no seu conteúdo ruminal.

Em estudos futuros, talvez seja interessante quantificar um valor mínimo de taninos do conteúdo ruminal que indique que os animais possam estar em risco, já que não encontramos menção a tal valor na bibliografia consultada.

Apesar das semelhanças com vários casos já reportados há alguns pontos nos quais os nossos casos não encontram concordância com estudos já publicados.

Um fato que nos surpreendeu foi a ocorrência de mortes súbitas (em que nos era referido pelo produtor que os animais não teriam apresentado sinais clínicos anteriores à morte), sendo que a intoxicação por taninos é geralmente um processo mais arrastado que se desenvolve, no mínimo, em cerca de uma semana. Uma explicação para esta problemática pode ser o fato destes animais, que consomem bolota durante parte do ano, irem desenvolvendo uma deficiência imunológica chegando depois a um desequilíbrio do seu sistema imunitário, encontrando-se mais suscetíveis a infeções bacterianas ou parasitismo (como os casos reportados dos animais com lesões por *Clostridium perfringens* e infestação por *Theileria* e *Anaplasma*). Na nossa opinião o consumo repetido de bolota, sem dar possibilidade de o rim recuperar conduz a uma insuficiência renal progressiva.

Este repetido consumo de bolota e folhas de sobreiro pode explicar a situação que foi observada nas vacas no dia 20 de Novembro, apesar de terem edema sub-mandibular não apresentarem valores de ureia creatinina sanguíneos mais elevados. Valores elevados de ureia ou creatinina ocorrem em pequenos animais quando cerca de 75% dos nefrónios estão lesados (Latimer *et al*, 2003). Pode-se especular que para bovinos uma situação semelhante ocorra.

Além desta possível justificação pode também ter uma influência nos resultados já publicados o fato de os estudos serem na sua maioria realizados em condições *in vitro* ou *in vivo*, com recurso a uma indução forçada de intoxicação. Estes resultados podem não representar o que se passa *in vivo*, sendo difícil transpor as condições reportadas na bibliografia para o funcionamento biológico normal de um organismo vivo.

Outro fato curioso é que apenas os animais que resultaram de cruzamento genético de duas ou mais raças se mostraram afetados pelo consumo excessivo de bolota. A exploração possui vacas de raça Mertolenga e, até agora, nenhuma apresentou sinais de intoxicação. Esta hipótese foi também proposta por outros autores (Silanikove *et al*, 1996; Frutos *et al*, 2005), como referido nos capítulos acima.

Outro dado que até agora não encontramos menção na bibliografia é a associação entre a ingestão excessiva de taninos e problemas reprodutivos, nomeadamente morte embrionária precoce. Esta nossa suspeita (não excluindo outras causas, nomeadamente infecciosas, nutricionais e imunológicas) teve início aquando da necrópsia realizada no dia 23 de Junho de 2015 nos ter sido relatado que o animal em causa em duas épocas sucessivas de cobrição não ter tido um diagnóstico positivo de gestação, estando por isso referenciado como animal para refugo. Em conversas posteriores foi-nos dito que este problema ocorre em vários animais, sendo a taxa de refugo da exploração, segundo o responsável, mais elevada do que o desejado. A associação entre taninos e morte embrionária pode fazer-se pelos elevados níveis de ureia resultantes da progressiva deterioração renal, sendo que elevados níveis de ureia no sangue são causa de morte embrionária (McEvoy *et al*, 1997) e ineficiência reprodutiva (Hammon *et al*, 2005).

Na altura foi-nos também relatado pelo responsável da herdade que no passado algumas das vacas da exploração apresentavam um crescimento anormal das unhas. Esta situação é muito pouco comum em vacas de carne podendo pôr-se a hipótese deste crescimento anormal das unhas ser consequência de problemas de acidose ruminal crónica, que pode ocorrer em situações em que a alimentação se baseia quase exclusivamente em bolota com pouco ou nenhum suplemento forrageiro (feno ou palha) (Radostits *et al*, 2000). Esta situação é mais comum a partir de Novembro quando os teores em amidos e açúcares da bolota são mais elevados (Tabela nº 1).

Um dos objetivos principais deste trabalho é poder melhor esclarecer os produtores sobre esta problemática e com eles arranjar soluções para o problema.

Neste sentido, uma das perguntas feita pelos proprietários foi: “Como podem os animais ainda apresentar sinais e continuar a morrer, meses depois da época crítica da bolota (Setembro – Dezembro)?” Uma das explicações é o fato do consumo continuado de taninos debilitar a imunidade destes animais que acabam por morrer (como descrito anteriormente). Outra hipótese colocada é o fato destes animais, que estão permanentemente no pasto, depois da época da bolota irem-se alimentando dos pequenos sobreiros que vão nascendo. Sabemos que os estadios mais imaturos da planta têm uma concentração mais elevada de taninos (Wiseman & Thompson, 1984; Almeida & Marinho, 1992) o que exacerba os efeitos do consumo permanente de bolota.

Na altura, as soluções apresentadas foram a entrada mais tarde nos animais no montado (em Janeiro/Fevereiro) ou a suplementação antes da pastagem com feno de alta qualidade. No entanto, o sistema de produção praticado na exploração não permite a prática de nenhuma destas medidas, uma vez que não existem instalações que permitam a estabulação temporária dos animais ou o impedimento de consumo de bolota que se encontra na maior parte da herdade. Os proprietários lançaram uma sugestão que nos pareceu prática e “inovadora”: permitir a passagem de um grupo de porcos pelos parques onde ficarão as vacadas, consumindo estas partes da bolota. Esta sugestão está assente no conhecimento de que nem todas as espécies animais são igualmente afetadas pelos taninos, como é exemplo os suínos, mas também os cervídeos.

Uma outra medida discutida com o proprietário da exploração foi selecionarem-se animais o mais precocemente possível para serem refugados, concretamente os que apresentem sinais clínicos de intoxicação (como edema submandibular ou magreza). Um controlo periódico de animais em risco, pela medição dos níveis de ureia e creatinina, torna-se uma opção pouco viável uma vez que estes níveis podem não se encontrar alterados se menos de 75% do rim estiver afetado (ver caso clínico de 20 de Novembro de 2014).

7) Conclusão

O objetivo primordial desta dissertação foi a confirmação da causa de morte destes animais. Após a revisão bibliográfica e em conjunto com os vários dados clínicos e laboratoriais recolhidos, foi possível concluir que estes animais sofreram uma intoxicação crónica por taninos (associado a um consumo excessivo de bolota de sobreiro).

Tal como referido no capítulo “Discussão”, o consumo continuado de bolota causa lesões renais crónicas (nomeadamente nefrite intersticial), bem como redução da fertilidade e imunodepressão.

Embora numa exploração característica do montado Alentejano (rica em Sobreiro e Azinheira) seja difícil o controlo de acesso a bolota, a suplementação com feno de qualidade nas alturas em que a pastagem é mais fraca e em que a bolota é mais prejudicial é uma medida que pode reduzir a incidência de lesões e o número de mortes.

Bibliografia

- Alam, M.R., Kabir, A.K.M.A., Amin, M.R. & McNeill, D.M. (2005). The effect of calcium hydroxide treatment on the nutritive and feeding value of *Albizia procera* for growing goats. *Animal Feed Science and Technology*, 122, 135 – 148.
- Almeida, J.A.A., Marinho, A.A.N. & Baptista M.E.S. (1992) Valor nutritivo da balota e da lande. In: *II Coloquio sobre el cerdo ibérico*, pp 9-10. Junta de Extremadura. Badajoz (Espanha).
- Asquith, T.N. & Butler, L.G. (1986). Interactions of Condensed Tannins with selected proteins. *Phytochemistry*, 25, 1591-1593.
- BAE, H.D., McAllister, T.A., Yanke, J., Cheng, K-J. & Muir, A.D. (1993). Effects of Condensed Tannins on Endoglucanase Activity and Filter Paper Digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2132-2138.
- Bate-Smith, E.C. (1973). Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry*, 12, 907-912.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Ben Salem, L. & Tisserand, J.L. (2000). Deactivation of condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage by polyethylene glycol in feed blocks: Effect on feed intake, diet digestibility, nitrogen balance, microbial synthesis and growth by sheep. *Livestock Production Science*, 64, 51-60.
- Beninger, C.W. & Hosfield, G.L. (2003). Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 7879-7883.
- Bento, M.H.L., Acamovic, T. & Makkar, H.P.S. (2005). The influence of tannin, pectin and polyethylene glycol on attachment of 15N-labelled rumen microorganisms to cellulose. *Animal Feed Science and Technology*, 122, 41-57.
- Bhat, T.K., Makkar, H.P.S. & Shing, B. (1997). Preliminary studies on tannin degradation by *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 22-23.
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. & Kurihara, M. (2009). Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92, 5512-5522.
- Borisova, M.P., Kataev, A.A., Mavlyanov, S.M. & Abdullajanova, N.G. (2015). Effects of Hydrolysable Tannins on Native and Artificial Biological Membranes. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 9, 53-60.
- Bueno, I.C.S., Brandia, R.A., Franzolin, R., Benetela, G., Fagundes, G.M., Abdalla, A.L., Louvandini, H. & Muir, J.P. (2015). In vitro methane production and tolerance to condensed tannins in five ruminant species. *Animal Feed Science and Technology*, 205, 1-9.
- Cantos, E., Espín, J.C., López-Bote, C., De La Hoz, L., Ordóñez, J.A. & Tomás-Barberán, F. A. (2003). Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns (*Quercus* spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6248-6256.

- Dearing, M.D., Foley, W.J. & McLean, S. (2005). The influence of plant secondary metabolites on the nutritional ecology of herbivorous terrestrial vertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 36, 169-189.
- Dentinho, T., Navas, D., Potes, J. (2005). Avaliação de complementos alimentares em pecuária extensiva. *Revista Pastagens e Forragens*, 26/27, 41-46.
- Dollahite, J.W., Householder, G. T. & Camp, B. J. (1966). Effect of Calcium Hydroxide on the Toxicity of Post Oak (*Quercus stellata*) in Calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 148, 908 – 912.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J. & Mantecón, A.R. (2004). Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2, 191-202.
- Frutos, P., Pérez, V., Benavides, J. & Mantecón, A.R. (2005). Intoxicação de gado bovino por consume de bolotas. *Albóitar*, 5, 54-59.
- Ghasemi, S., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Tahmasebi, A.M., Vakili, A.R., Behgar, M. & Ghowvati, S. (2012). Inclusion of pistachio hulls as a replacement for alfalfa hay in the diet of sheep causes a shift in the rumen cellulolytic bacterial population. *Small Ruminant Research*, 104, 94-98.
- Goel, G., Makkar, H.P.S. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health Production*, 44, 729-739.
- Hagerman, A.E., Robbins, C.T., Son, Y. & McArthur C. (1992). Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management*, 45, 57-62.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W. & Riechel, T.L. (1998). High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 1887-1892.
- Hammon, D.S., Holyoak, G.R., Dhiman, T.R. (2005). Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 86, 195-204.
- Hervás, G., Pérez, V., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Almar, M.M. & Frutos, P. (2003) Intoxication of Sheep with Quebracho Tannin Extract. *Journal of Comparative Pathology*, 129, 44-54.
- Hristov, A.N., Ivan, M., Neill, L. & McAllister, T.A. (2003). Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 105, 163–184.
- Juhnke, J., Miller, J., Hall, J.O., Provenza, F.D. & Villalba, J.J. (2012). Preference for condensed tannins by sheep in response to challenge infection with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 188, 104-114.
- Krueger, W.K., Gutierrez-Bañuelos, H., Carstens, G.E., Min, B.R., Pinchak, W.E., Gomez, R.R., Anderson, R.C., Krueger, N.A. & Forbes, T.D.A. (2010). Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Animal Feed Science and Technology*, 159, 1-9.
- Latimer, K. S., Mahaffey, E. A. & Prasse, K. W. (2003). Duncan & Prasse - Veterinary Laboratory Medicine – Clinical Pathology (4th ed.). Iowa State Press

- Maas, J. (2008). Killer Oak Trees. California Cattlemen's Magazine – University of California, Davis.
- Mangan, J.L. (1988). Nutritional Effects of Tannins in Animal Feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1, 209-231.
- Makkar, H.P.S., Singh, B. & Dawra, R.K. (1988). Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *British Journal of Nutrition*, 60, 287-296.
- Makkar, H.P.S. & Becker, K. (1996). Effect of pH, Temperature, and Time on Inactivation of Tannins and Possible Implications in Detannification Studies. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1291-1295.
- McEvoy, T.G., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Findlay, P.A. & Robertson, I.S. (1997). Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Animal Reproduction Science*, 47, 71-90.
- McMahon, L.R., McAllister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp, J.D., Coulman, B.E., Wang, Y. & Cheng, K.J. (2003). A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*, 46, 469-486.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., Bunch, R. & Krause, D.O. (2001). Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 78-88.
- Min, B.R., Fernandez, J.M., Barry, T.N., McNabb, W.C. & Kemp, P.D. (2001). The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in ewes during autumn. *Animal Feed Science and Technology*, 92, 185-202.
- Min, B.R., Attwood, G.T., Reilly, K., Sun, W., Peters, J.S., Barry, T.N. & McNabb, W.C. (2002). *Lotus corniculatus* condensed tannins decrease in vivo populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 911-921.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T. & McNabb, G.T. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106, 3-19.
- Mosleh, H., Naghiha, A., Keshtkaran, A.N. & Khajavi, M. (2014). Isolation and Identification of Tannin-degrading Bacteria from Native Sheep and Goat Feces in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2, 176-180.
- Nelson, K.E., Pell, P.N., Schofield, P. & Zinder, S. (1995). Isolation and Characterization of an Anaerobic Ruminant Bacterium Capable of Degrading Hydrolyzable Tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3293-3298.
- Nelson, K.E., Pell, A.N., P.H., Doane, Ginez-Chavez, B.I. & Schofield, P. (1997). Chemical and Biological Assays to Evaluate Bacterial Inhibition by Tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1175-1193.

- Odenyo, A.A., Bishop, R., Asefa, G., Jamnadass, R., Odongo, D. & Osuji, P. (2001). Characterization of Tannin-tolerant Bacterial Isolates from East African Ruminants. *Anaerobe*, 7, 5-15.
- O'Donovan, L. & Brooker, J.D. (2001). Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 147, 1025-1033.
- Osawa, R., Rainey, F., Fujisawa, T., Lang, E., Busse, H.J., Walsh, T.P. & Stackebrandt, E. (1995). *Lonepinella koalarum* gen. nov., sp. nov., a New Tannin-Protein Complex Degrading Bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 368-373.
- Ostrowski, S.R., Smith, M.P., Spier, S.J., Norman, B.B. & Oliver, M.N. (1989). Compensatory weight gain in steers recovered from oak bud toxicosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 195, 481-484.
- Pellikaan, W.F., Stringano, E., Leenaars, J., Bongers, D.J.G.M., Laar-van Schuppen, S., Plant, J. & Mueller-Harvey, I. (2011). Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH₄ production using an automated pressure evaluation system (APES). *Animal Feed Science and Technology*, 166-167, 377-390.
- Pérez, V., Doce, R.R., García-Pariente, C., Hervás, G., Ferreras, M.C., Mantecón, A.R. & Frutos, P. (2011). Oak leaf (*Quercus pyrenaica*) poisoning in cattle. *Research in Veterinary Science*, 91, 269-277.
- Plumlee, K.H., Johnson, B., Galey, F.D. (1998). Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10, 263-267.
- Radotits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. (2000). *Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses* (9th ed.). London: W.B. Saunders Company Ltd – Hartcourt Publishers Limited.
- Rayudu, G.V.N., Kadirvel, R., Vohra, P. & Kratzer, F.H. (1970). Effect of Various Agents in Alleviating the Toxicity of Tannic Acid for Chickens. *Poultry Science*, 49, 1323-1326.
- Salem, A.Z.M., López, S., Ranilla, M.J. & González, J.S. (2011). Influence of quebracho tannins administration on some blood metabolites in sheep and goats. *Options Méditerranéennes – Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context*.
- Salminen, J.P., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pilhaja, K. & Pulkkinen, K. (2004). Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins, flavonoid glycosides and proanthocyanidins in oak leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 30, 1693-1711.
- Sandusky, G.E., Fosnaugh, C.J., Smith, J.B. & Mohan, R. (1977). Oak Poisoning in Cattle in Ohio. *Journal of the American Medical Association*, 171, 627-629.
- Shimada, T., Saitoh, T., Sasaki, E., Nishitani, Y. & Osawa, R. (2006). Role of Tannin-Binding Salivary Proteins and Tannase-Producing Bacteria in the Acclimation of the Japanese Wood Mouse to Acorn Tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 1165-1180.
- Silanikove, N., Gilboa, N., Perevolotsky, A. & Nitsan, Z. (1996). Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes. *Small Ruminant Research*, 21, 195-201.

- Skopec, M.M., Hagerman, A.E. & Karasov, W.H. (2004). Do salivary proline-rich proteins counteract dietary hydrolysable tannin in laboratory rats? *Journal of Chemical Ecology*, 30, 1679-1692.
- Smith, A.H. & Mackie, R.I. (2004). Effect of Condensed Tannins on Bacterial Diversity and Metabolic Activity in the Rat Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1104–1115.
- Smith, A.H., Zoetendal, E. & Mackie, R.I. (2005). Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins. *Microbial Ecology*, 50, 197-205.
- Spier, S.J., Smith, B.P., Seawright, A.A., Norman, B.B., Ostrowski, S.R. & Oliver, M.N. (1987). Oak toxicosis in cattle in Northern California: clinical and pathologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 191, 958-964.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T. & Sivakumaran, S. (2005). Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 403-419.
- Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F.M. & Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “*montanera*” feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Journal of Food Chemistry*, 124, 997-1004.
- Van Soest, P.J. (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant. (2nd ed.) Cornell University Press: Comstock Publishing Associates.
- Waghorn, G.C., Shelton, I.D. & McNabb, W.C. (1994). Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 1. Non-nitrogenous aspects. *Journal of Agricultural Science*, 123, 99-107.
- Waghorn, G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 116-139.
- Wiseman, A. & Thompson, H. (1984). Letters: Acorn Poisoning. *The Veterinary Record*, 105, 605.
- Yeruham, I., Orgad, U., Avidar, Y., Perl, S., Liberboim, M., Adler, H. & Shlosberg, A. (2002). A urinary retention syndrome in beef cows probably caused by ingestion of *Cistus salvifolius*. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153, 627-632.
- Zalipsky, S. (1995). Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 157-182.