



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
-MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA-
OPCIÓN CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES

Título: EVALUACIÓN CITOTÓXICA EN CULTIVOS DE CÉLULAS GLIALES
EXPUESTOS AL EXTRACTO DE *PROSOPIS FLEXUOSA*

Tutor interno: Dra. Cholich, Luciana Andrea.

Tutor externo: Pistan, María Elena.

Residente: Cabrera Benítez, Angelica María

e-mail: angycabrerab@gmail.com

2022

INDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	7
Objetivo general:	7
Objetivos específicos:	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Materiales:	8
- Ámbito de estudio:.....	8
Métodos y técnicas empleados.....	8
1. Obtención del extracto total (ET) de <i>Prosopis flexuosa</i> y determinación cuantitativa de los alcaloides piperidínicos.....	8
2. Fraccionamiento del extracto total (ET) por Cromatografía flash	8
3. Cultivo celular.....	8
4. Análisis estadístico	10
RESULTADOS.....	11
1. Determinación cuantitativa de los alcaloides piperidínicos	11
2. Fraccionamiento del extracto total (ET) en columna flash	11
3. Citotoxicidad del extracto total de <i>P. flexuosa</i> sobre la línea C6.....	12
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIÓN	17
BIBLIOGRAFIA.....	18

DEDICATORIA

A mis padres, motor imprescindible quienes me acompañaron a lo largo de la trayectoria de este viaje que parecía interminable; a pesar de la distancia siempre lograron hacerse sentir presentes en cada paso que di.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras

Dra. Cholich, Luciana Andrea y M.V. Pistan, María Elena. Sin sus conocimientos, consejos y aportes no hubiese sido fácil alcanzar tan preciada meta.

A mis padres

Que desde un principio me apoyaron y lucharon conmigo en este camino largo, con altas y bajas pero que al final tuvo su recompensa; a ellos que me impulsan día a día a seguir. Espero haberlos hecho sentir orgullosos.

A mis compañeros

Con los cuales compartí noches de desvelos, mates, colapsos y festejos interminables. Sin ustedes nada hubiese sido igual. Gracias por estar siempre.

RESUMEN

Especies del género *Prosopis*, conocidas como Algarrobo, son consideradas una fuente de alimento para animales debido a su alto valor nutricional. Sin embargo, también se han registrado intoxicaciones espontáneas en rumiantes. El objetivo del presente trabajo fue contribuir al conocimiento de la toxicología animal, mediante el estudio fitoquímico del extracto total (ET) de *Prosopis flexuosa*, junto a ensayos *in vitro*. Se cuantificaron los alcaloides piperidínicos (juliprosopina y juliprosina) a partir de un extracto clorofórmico de vainas de *P. flexuosa* mediante HPLC-HRMS y se realizó el fraccionamiento del extracto total (ET) por Cromatografía flash en columna. Para los ensayos *in vitro* se empleó la línea celular C6 de glioma murino (ATCC:CCL-107™) y se adicionaron diferentes concentraciones del ET (5- 50 µg/ml). Luego de 48 h de incubación a 37°C y 5% CO₂, la viabilidad celular se cuantificó por tinción con el colorante cristal violeta y se determinó la concentración citotóxica 50 (CC₅₀). Para el análisis morfológico se empleó la tinción de Rosenfeld y para la detección inmunocitoquímica se utilizó el anticuerpo GFAP. Los resultados evidenciaron que el ET de *P. flexuosa* disminuyó la viabilidad celular de manera dosis dependiente, siendo la CC₅₀ de 35,68 µg/mL. Las alteraciones morfológicas se observaron en células tratadas con 10 y 15 µg/mL de ET y a la inmunocitoquímica, los niveles de expresión de GFAP disminuyeron en células tratadas con 20 µg/ml (21,14±3,7 %) de ET. Los estudios *in vitro* realizados evidenciaron efectos citotóxicos y alteraciones morfológicas sobre la línea C6 expuestos al ET de *P. flexuosa*.

INTRODUCCIÓN

La presentación de sintomatología nerviosa en rumiantes empleados en la producción, es comúnmente reportada en la clínica. El profesional veterinario debe realizar un correcto diagnóstico para efectuar o no un tratamiento específico o bien para definir la causa de muerte y tomar acciones de control. Esto plantea la necesidad de ampliar el conocimiento sobre la toxicidad en animales que produce el consumo de vainas de *Prosopis flexuosa* distribuida en la región norte de nuestro país. Dentro de este marco, el género *Prosopis* pertenece a la familia Leguminosae (Fabaceae) y subfamilia Mimosoideae, es nativa de América, África y Asia, y está compuesta por un gran número de especies (Pasiiecznick 2001). En Argentina, las especies de este género se conocen como "Algarrobos" (Verga y col. 2009). Sus vainas son una fuente de alimento para animales en muchas regiones del mundo debido a su valor nutricional (Silva, 1981; Silva y col. 1990; Riet-Correa y col. 2012). A pesar de ello, se han registrado intoxicaciones espontáneas en animales por el consumo de *P. juliflora* en Brasil (Assis y col. 2009; Cámara y col. 2009) y por *Prosopis* sp. en la Región Noroeste de Argentina (Micheloud y col. 2019). La intoxicación se produce en animales que se encuentran en áreas invadidas por "algarrobos" por más de un año o más de un período de fructificación (Lima y col. 2004; Assis y col. 2009). Los principios tóxicos identificados en *P. juliflora* son juliprosine y juliprosopine (Tabosa y col. 2000). La astrogliosis se considera un marcador temprano de neurotoxicidad, ya que generalmente se detecta antes que cualquier otro efecto tóxico sobre las neuronas. En relación a lo mencionado anteriormente, los estudios *in vitro*, demostraron que el extracto alcaloidal y la fracción alcaloidal, compuesta mayoritariamente por los alcaloides juliprosopina y juliprosina, obtenida desde hojas y vainas de *P. juliflora* tienen acción directa sobre el SNC (Hughes y col. 2005; Silva y col. 2007). Recientemente, a partir de la obtención de un extracto rico en alcaloides se ha podido identificar a los mismos desde *P. flexuosa* (Cholich y col. 2021). Teniendo en cuenta estos nuevos conocimientos se pretende evaluar la toxicidad del extracto de las vainas de *P. flexuosa*.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Contribuir al conocimiento de la toxicología animal, mediante el estudio fitoquímico del extracto de *Prosopis flexuosa*, junto a ensayos *in vitro*.

Objetivos específicos:

1. Determinar cuantitativamente los alcaloides piperidínicos desde el extracto total de *P. flexuosa*.
2. Obtener una fracción enriquecida en compuestos bioactivos por cromatografía flash.
3. Estudiar *in vitro* la actividad citotóxica del extracto total de *P. flexuosa* sobre células gliales.
4. Evaluar *in vitro* las alteraciones morfológicas inducidas por el extracto total de *P. flexuosa* sobre células gliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

- Ámbito de estudio:

-Laboratorio de Toxicología anexo a la Cátedra de Farmacología y Toxicología- FCV-UNNE.

- Laboratorio de Productos Naturales “Prof. Armando I. A. Ricciardi”, FaCENA-IQUIBA-UNNE.

Métodos y técnicas empleados

1. Obtención del extracto total (ET) de *Prosopis flexuosa* y determinación cuantitativa de los alcaloides piperidínicos.

El extracto total (ET) se obtuvo a partir de vainas por medio de extracciones ácido/base según lo reportado por Ott-Longoni y col. (1980). La identificación de los alcaloides piperidínicos por HPLC-HRMS y la determinación cuantitativa de esos alcaloides se realizaron en Poisonous Plants Research Laboratory (PPRL) de Logan, Utah (Estados Unidos) bajo la dirección del Dr. Dale Gardner.

2. Fraccionamiento del extracto total (ET) por Cromatografía flash

Unos 500 mg del ET fueron disueltos en etanol 96°, se agregó sílica gel y se secó a presión reducida en un rotaevaporador Büchi, para constituir la muestra a fraccionar. Se dispuso una columna de 24 x 400 mm con robinete y tapón esmerilado para mantener la presión, conectada a una bomba de aire de pecera CX-1000 para realizar la cromatografía flash (sílica gel flash 60 0,04 - 0,063 mm, MN). Se sembró el ET en la parte superior de la columna y se eluyó utilizando mezclas de cloroformo: metanol, iniciando con 50 mL 99:1, y se fue aumentando la polaridad de la serie eluotrópica con metanol hasta llegar a 50ml de metanol puro. En paralelo se realizó TLC en cromatofolios de sílica gel GF de cada uno de los eluidos, utilizando cloroformo:metanol (1:1) como eluyente. Se realizaron lecturas a 254 y 365 nm y se sometió a vapores de yodo como revelador. Los tubos que dieron igual perfil cromatográfico se reunieron en fracciones que fueron secadas a presión reducida en el rotaevaporador. Con la finalidad de obtener fracciones ricas en alcaloides se realizó una TLC de las fracciones reunidas por su perfil cromatográfico similar, con igual eluyente y se empleó el reactivo de Dragendorff como revelador de alcaloides, seguido de nitrito de sodio al 10%.

3 Cultivo celular

Se empleó la línea C6 células de glioma (CCL-107™), se mantuvo en *Dulbecco's minimum essential medium* (DMEM) (GIBCO-Invitrogen) con el agregado de 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (GIBCO-Invitrogen), L-Glutamina (29,2

mg/mL), Penicilina (10,000 unidades/mL) y Estreptomina (10,000 µg/mL) (GIBCO-Invitrogen) como antibióticos.

3.1 Tratamientos

Para realizar los estudios de citotoxicidad por exposición a los extractos vegetales, las células crecidas en frascos se sembraron en placas multipocillo en medio de cultivo y luego de 24 h las células se expusieron al extracto por 48 horas. Se emplearon concentraciones desde 5 µg/ml hasta 50 µg/ml.

3.2 Citotoxicidad

Tinción con Cristal Violeta

La viabilidad celular fue cuantificada por tinción con el colorante Cristal violeta. Las células no adheridas fueron removidas por lavado con PBS y las células que permanecieron adheridas fueron fijadas con 100 uL de metanol:ácido acético glacial (3:1) y posteriormente teñidas con 100 µL de Cristal violeta 0,5% en metanol 20% (v/v). El colorante fue removido de las células por adición de 100 µL de una solución reveladora de etanol:ácido acético glacial (3:1). La densidad óptica de la solución coloreada se determinó a 620 nm en lector de microplacas (Thermo Multiskan Ex). La citotoxicidad se evaluó por comparación de las absorbancias resultantes de los pocillos con el ET, con la absorbancia promedio de los pocillos utilizados como control (sin extracto, considerados como 100% de viabilidad) y fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular. Estos valores se graficaron versus las concentraciones de extractos ensayados. La concentración citotóxica 50 (CC₅₀), se define como la cantidad de extracto capaz de reducir la viabilidad celular en un 50%, en comparación con el control. Los valores de los porcentajes de viabilidad celular fueron graficados contra las concentraciones del ET y la CC₅₀ fue determinada. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

3.3. Análisis morfológico

3.3.1 Microscopía por contraste de fase

Los cultivos se observaron diariamente con un Microscopio Nikon (Eclipse TS100/TS100-F), y se tomaron fotografías con cámara digital Nikon Coolpix P6000 13.5 mega píxeles para la evaluación de cambios morfológicos con respecto al control (sin agregado del extracto) y establecer así el tiempo de incubación necesario para que se compruebe el daño neurotóxico.

3.3.2. Tinción con Rosenfeld

Se realizó una tinción pancrómica, empleando May Grünwald y Giemsa, en todas las células controles y tratadas sembradas sobre vidrios, se fijaron con metanol durante 10 seg., y luego se teñieron durante 20 min. Posteriormente fueron lavados y secados para ser analizados bajo un Microscopio óptico de contraste de fase marca Nikon-Eclipse

TS100/TS100-F y cámara digital Nikon Coolpix P6000 13.5 mega píxeles adaptable al microscopio.

3.3.3. Inmunocitoquímica

Todas las células tratadas y no tratadas del cultivo de astrocitos sembradas sobre vidrios fueron lavados con PBS 1x comercial (500 uL/pocillo) y fijados durante 10 seg. con metanol a temperatura ambiente sin agitación. Una vez realizada la fijación, se procedió a la permeabilización celular con PBS tritón 0,5% durante 15 minutos en agitación suave. Seguidamente, se lavaron los vidrios tres veces durante 5 minutos, esta vez con PBS tritón 0,1%, manteniendo la agitación suave. A continuación, se empleó una solución de bloqueo: 10% de FBS, 1 mg/ml de BSA y PBS tritón al 0,1%. El tiempo de incubación para la solución de bloqueo fue de 30 minutos. Una vez concluido el tratamiento de bloqueo, se realizó la incubación con el anticuerpo primario. En el presente experimento se utilizó anti GFAP, marcador específico de astrocitos, El anticuerpo anti GFAP (anti mouse, Sigma) fue utilizado a una dilución de 1:250 en PBS-BSA y la incubación se realizó a 4°C durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se realizó cuatro lavados de 5 minutos con PBS tritón 0,1%. Luego se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con el anticuerpo secundario biotinilado (Super Sensitive™ Link Detection System, BioGenex, CA), seguido otros 30 min de incubación con estreptoavidina (Super Sensitive™ Label HRP Detection System, BioGenex, CA). Por último, se revelaron con una solución de 3-3'diaminobenzidina (DAB), y se contratiñó con Hematoxilina.

4 Análisis estadístico

Los datos representan la media \pm el desvío estándar (DS) de al menos cuatro repeticiones. La significación estadística se probó mediante ANOVA y Tukey y el valor de p inferior a 0,05 fue considerado significativo.

RESULTADOS

1. Determinación cuantitativa de los alcaloides piperidínicos

A partir del ET se confirmó la presencia de juliprosina (JPS) $m/z = 626 [M]^+$ como el principal alcaloide detectado y la juliprosopina (JPSP), $m/z = 630 [M + H]^+$. La concentración de JPSP y JPS se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: cantidad relativa de los alcaloides piperidínicos

Extracto	Concentración de alcaloides en extracto ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
	JPS*	JPSP**
<i>P. flexuosa</i>	128	19

*Juliprosina

**Juliprosopina

2. Fraccionamiento del extracto total (ET) en columna flash

A partir de la cromatografía flash del ET, se agruparon 11 fracciones mediante el revelado con yodo (**Tabla 2**) y se confirmó la presencia de alcaloides mediante la prueba de Dragendorff seguida de nitrito de sodio 10% en fracciones polares designadas como F4, F5, F6, F7, F10 y F11 (**Fig. 1**).

Tabla 2. Fracciones obtenidas desde el extracto total de vainas de *P. flexuosa*

Fracción/Tubo	Rendimiento %
F1 (T 1-18)	16.6
F2(T 18-19)	30.6
3(T 20-23)	11.8
4(T 24-26)	1.6
5(T 27-32)	3.8
6(T 33-35)	4.1
7(T 36-38)	6.9
8(T 39-40)	1.1
9(T 41-42)	3.7
10(T 43-50)	5.1
11(T 51-73)	6.5

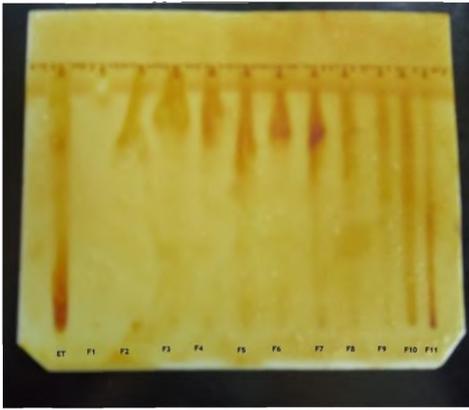
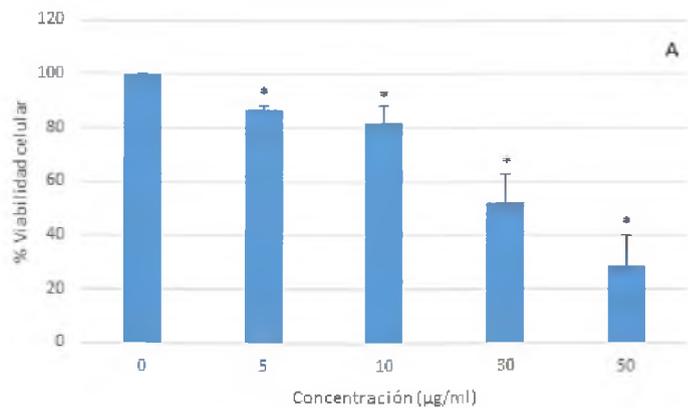


Fig. 1. Extracto total y Fracciones. Fase estacionaria Silica gel, fase móvil cloroformo:metanol 1:1. Reactivo revelador: Dragendorff seguido de nitrito de sodio 10%.

3. Citotoxicidad del extracto total de *P. flexuosa* sobre la línea C6

La toxicidad del ET de *P. flexuosa* se evaluó cuantitativamente mediante el ensayo de captación con el colorante cristal violeta. Luego de 48 h de tratamiento, se observó una muerte celular dependiente de la dosis, siendo significativamente inhibida la viabilidad celular en todas las concentraciones analizadas con respecto al control no tratado ($p < 0,05$) (**Fig.2 A**). Además, se determinó la concentración citotóxica del ET que redujo la viabilidad celular en un 50%, CC_{50} (**Fig. 2 B**), siendo el valor obtenido de 35,68 $\mu\text{g/mL}$.



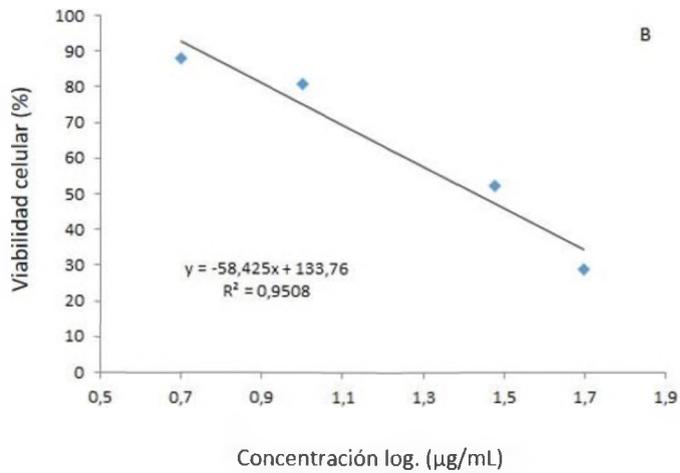


Fig. 2 A. Ensayo de captación con el colorante cristal violeta. Disminución de la viabilidad celular de C6 luego de 48 h de incubación con el Extracto Total de *P. flexuosa* (5-50 µg/mL). La media del grupo control (tratado con medio solo), se tomó como el 100%. Los valores (media ±DS) son representativos de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ **B.** Determinación de la concentración citotóxica 50 (CC50)

3.1 Alteraciones morfológicas por Microscopía de contraste de fase

Para evaluar las alteraciones de la morfología celular luego del tratamiento, se cultivaron en cubreobjetos de vidrio. Las células C6 no tratadas se distribuyeron de forma homogénea en el campo de cultivo; mostrando una forma delgada y alargada (**Fig. 3 A**). Sin embargo, tras la incubación con diferentes concentraciones del extracto total (10-30-50 µg/mL) se observaron distintos grados de desprendimiento celular desde la superficie del well. Por otro lado, con la concentración más alta probada se detectaron células gravemente dañadas, con rotura de la membrana y desechos celulares liberados en el medio (**Fig. 3 B**).

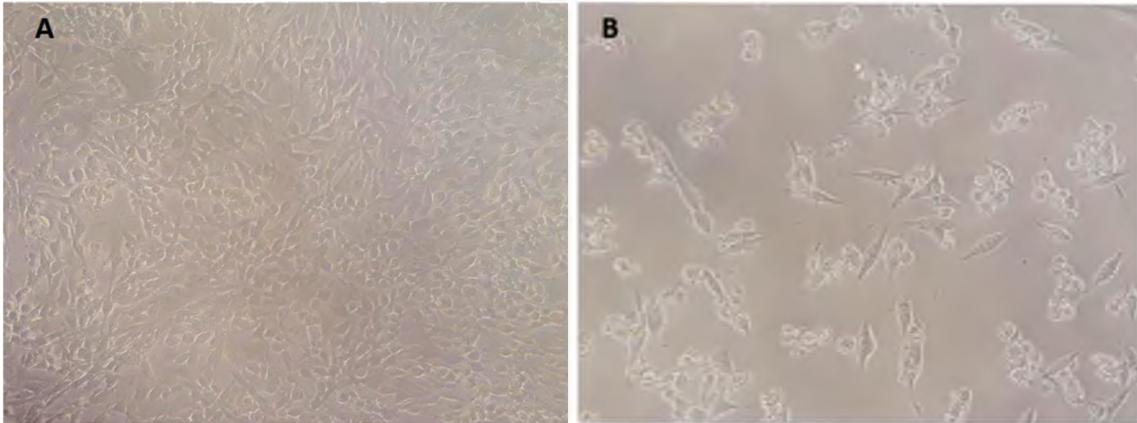


Fig. 3 Caracterización morfológica bajo microscopía de contraste de fase de la muerte celular inducida por el extracto de *P. flexuosa* en células C6. Control (A) 50 µg/ml del ET de *P. flexuosa* (B).

3.2 Alteraciones morfológicas por la tinción de Rosenfeld

Para evaluar las alteraciones de la morfología celular posterior al tratamiento, las células C6 se cultivaron en cubreobjetos y fueron coloreadas con la tinción de Rosenfeld. Las células C6 no tratadas a la microscopía de contraste de fase, fueron homogéneamente distribuidos en el campo de cultivo; exhibieron una forma bipolar con finas y largas prolongaciones (**Fig. 4 A**). Sin embargo, después de la incubación por 48 h con concentraciones de 10 y 15 µg/ml del ET de *P. flexuosa*, se registraron diversas anomalías morfológicas, que incluyeron células con prolongaciones gruesas e irregulares, retracción del cuerpo celular, diversos grados de condensación de la cromatina, vacuolización citoplasmática y algunas células agrupadas en pequeños cúmulos (**Fig. 4 B y C**).



Fig.4 A. control. **B.** 10 µg/ml de ET de *P. flexuosa* se observan células con retracción del cuerpo celular (flecha negra), condensación de la cromatina (flecha corta) y células con prolongaciones más gruesas (flecha). **C.** 15 µg/ml de ET de *P. flexuosa* se observan pequeños acúmulos de células (flechas negras) y células con presencia de vacuolas citoplasmáticas y con condensación de la cromatina (flecha)

3.3. Evaluación morfológica por Inmunocitoquímica

Los niveles de expresión de GFAP fueron menores en las células tratadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ (21,14 \pm 3,7 %) con respecto al control (28,55 \pm 3,1 %), esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Fig. 5). La pérdida de GFAP fue acompañada por alteraciones en la morfología de los astrocitos como la disminución de la extensión de los procesos expresados por el anticuerpo (Fig. 6).

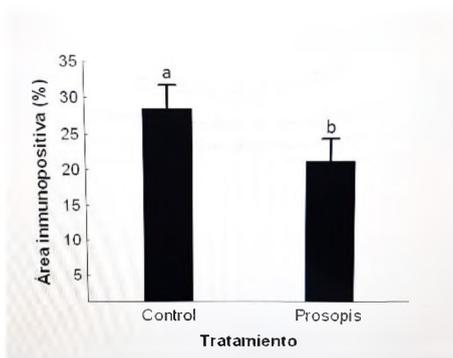


Fig. 5 Área inmunoreactiva (GFAP) medida en porcentaje, en el grupo control y tratado con 20 $\mu\text{g/ml}$. Los valores se expresan en % como media \pm DS. * $p < 0,05$

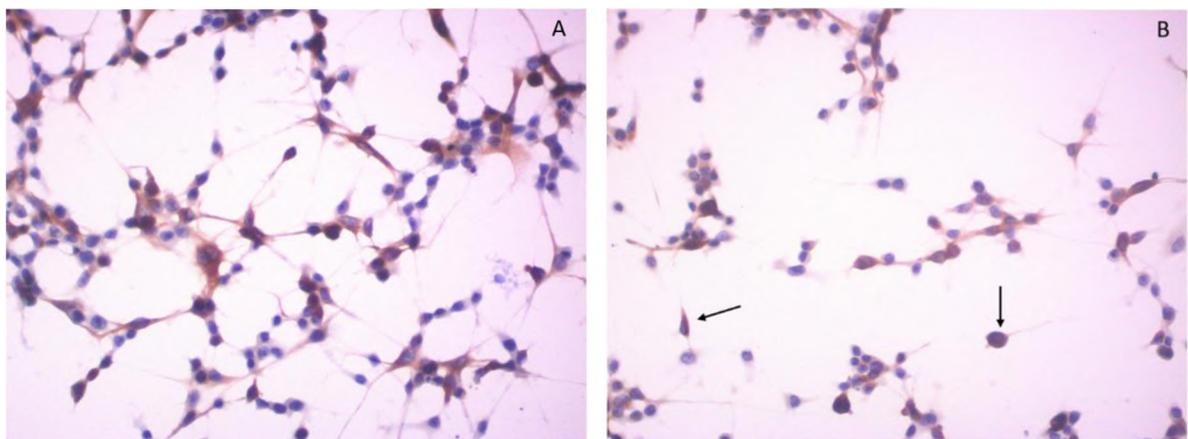


Fig. 6. A. control. B. disminución de los procesos reactivos a GFAP.

DISCUSIÓN

Prosopis sp. representa un importante recurso forestal. Sin embargo, algunas especies pueden ser tóxicas en zonas de vegetación autóctona e inducir una intoxicación espontánea en los animales, especialmente cuando se utiliza como única fuente de alimentación y durante condiciones de sequía extrema según Riet-Correa y colaboradores (2012); Ruiz-Nieto y colaboradores (2020).

En investigaciones fitoquímicas a partir de las vainas de *P. juliflora* se determinó la presencia de una mezcla de dos alcaloides, juliprosopine y juliprosine, como principales componentes tóxicos según lo reportado por Tabosa y colaboradores (2000). Sin embargo, el alcaloide juliprosopine resultó ser el constituyente mayoritario en las hojas de *P. juliflora* según Singh y Verma. (2012); Silva y col. (2013). En el presente estudio la juliprosine resultó ser cuantitativamente mayor en el ET obtenido a partir de vainas de *P. flexuosa*.

Por otro lado, se obtuvieron fracciones ricas en alcaloides a partir del ET de vainas de *P. flexuosa*. Este resultado coincide con el trabajo descripto por Silva y colaboradores (2007), donde reporta que a partir de hojas de *P. juliflora* obtuvo fracciones ricas en alcaloides en los eluidos más polares (metanólicas).

La actividad citotóxica y las alteraciones morfológicas fueron demostradas sobre una línea de células de glioma expuestas al extracto de *P. juliflora* (Hughes y col. 2005, Silva y col. 2007). De manera similar, nuestros resultados evidencian efectos citotóxicos sobre la línea C6 de glioma expuestos al ET de *P. flexuosa*, siendo la CC_{50} de 35,68 $\mu\text{g/mL}$ reportada por primera vez en esta especie.

Silva y col. (2007) evidenció en astrocitos procedentes de cultivo primario tratados con concentraciones bajas (3 $\mu\text{g/ml}$) del extracto de *P. juliflora*, aumento de la expresión del anticuerpo GFAP y a concentraciones elevadas del extracto (30 $\mu\text{g/ml}$) reducción de GFAP. En el presente estudio y en concordancia con Silva y col. (2007) se observó una disminución en los niveles de GFAP a una concentración del ET (20 $\mu\text{g/ml}$) y esta fue acompañada por alteraciones morfológicas, caracterizadas por prolongaciones gruesas e irregulares con retracción del cuerpo celular y diversos grados de la condensación de la cromatina. Estas alteraciones podrían preceder a la muerte celular, observada en el presente trabajo a través de los ensayos de citotoxicidad.

CONCLUSIÓN

A partir de este trabajo se determinó la cantidad de alcaloides previamente identificados en *P. flexuosa*. Además, se demostró que el extracto total presenta fracciones ricas en alcaloides sugiriendo la presencia de juliprosina y juliprosopina, que son hasta el momento, los principales tóxicos responsables de la intoxicación en los animales de producción.

Además, el efecto citotóxico y los cambios morfológicos producidos por el extracto total de *P. flexuosa* sobre la línea celular C6 sugiere un mecanismo de muerte celular por necrosis. Sin embargo, estudios más específicos como la tinción fluorescente con naranja de acridina y bromuro de etidio son necesarios para confirmarlo.

BIBLIOGRAFIA

- Assis, T.S., Medeiros, R.M.T., Riet-Correa, F., Araújo, J.A.S., Dantas, A.F.M., 2009. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no sertão paraibano. *Pesqui. Vet. Bras.* 29, 919–924.
- Cámara, A.C.L., Costa, N.A., Riet-Correa, F., Afonso, J.A.B., Dantas, A.F.M., Mendonça, C.L., Souza, M.I., 2009. Intoxicação espontânea por vagens de *Prosopis juliflora* (Leg. Mimosoideae) em bovinos em Pernambuco. *Pesqui. Vet. Bras.* 29, 233–240.
- Cholich, L., Pistán, M. E., Torres, A. M., Ortega, H. H., Gardner, D., Bustillo, S. 2021. Characterization and cytotoxic activity on glial cells of alkaloid-enriched extracts from pods of the plants *Prosopis flexuosa* and *Prosopis nigra* (Fabaceae). *Revista de Biología Tropical*, 69(1).
- Hughes, J., Sousa, J., Barreto, R., Silva, A., Souza, C., Silva, V. & El-Bachá, R.S. 2005. Cytotoxic effects of an extract containing alkaloids obtained from *Prosopis juliflora* Sw. DC (Algaroba) pods on glioblastoma cells. *Revista Brasileira. Saúde Producao Animal* 6(1), 31-41
- Lima, E., Riet-Correa, F., Amorin, S. L., & Sucupira Júnior, G. 2004. Intoxicação por favas de *Prosopis juliflora* (algaroba) em caprinos no Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 24(sSupl).
- Micheloud, J. F., Caro, L. A. C., Cholich, L. A., Martínez, O. G., Gimeno, E. J. 2019. Suspected poisoning in beef cattle from ingestion of *Prosopis nigra* pods in north-western Argentina. *Toxicon*, 157, 80-83.
- Ott-Longoni, R., Viswanathan, N., amp; Hesse, M. 1980. Die konstitution des Alkaloides Juliprosopin aus *Prosopis juliflora* A. DC. *Helvetica Chimica Acta*, 63(222), 2119-2129.
- Pasicznick, N.M., Felker, P., Harris, P.J.C., Harsh, L.N., Cruz, G., Tewari, J.C., Cadoret, K., Maldonado, L.J., 2001. The *Prosopis juliflora*- *Prosopis pallida* Complex. A. Monograph. HDRA Coventry, UK, pp. 162.
- Riet-Correa, F., Andrade, F.R.M., Carvalho, F.K.L., Tabosa, I.M., Galiza, G.J., Bernardino, N., Simões, S.V.D., Medeiros, R.M.T., 2012. Use of *Prosopis juliflora* pods as food for sheep and goats. *Pesqui. Vet. Bras.* 32, 987–989.
- Ruiz-Nieto, J. E., Hernández-Ruiz, J., Hernández-Marín, J., Mendoza-Carrillo, J., Abraham-Juárez, M., Isiordia-Lachica, P. M., & Mireles-Arriaga, A. I. 2020. Mesquite (*Prosopis* spp.) tree as a feed resource for animal growth. *Agroforestry Systems*, 94(4), 1139-1149.
- Silva, D.S., 1981. Substituição progressiva do farelo de trigo pela vagem da algaroba na alimentação de bovinos em engorda. Universidade Federal da Paraíba, Areia (PB). Silva, A.M., Rodrigues, M.E., De Silva, J.F., 1990. Nutritive value of mesquite beans (*Prosopis juliflora*) in the diet of rabbit. *Vet. Zootec.* 2, 9–16.

-Silva, A. M., Rodriguez M. E. and Da Silva J. F. 1990. Nutritive value of mesquite beans (*Prosopis juliflora*) in the diet of rabbit. *Veterinariae Zootecnica*, 2: 9-16.

- Silva, A.M.M.D., Silva, A.R., Pinheiro, A.M., Freitas, S.R.V.B.D., Silva, V.D.A.D., Souza, C.D.S. & Tardy, M. 2007. Alkaloids from *Prosopis juliflora* leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate NO production. *Toxicon*, 49(5), 601-614.

-Silva, V. D. A., Pitanga, B. P., Nascimento, R. P., Souza, C. S., Coelho, P. L. C., Menezes-Filho, N., Silva, A.M.M., Costa, M.F.D., El-Bachá, R.S., Velozo, E.S. & Costa, S. L. 2013. Juliprosopine and Juliprosine from *Prosopis juliflora* leaves induce mitochondrial damage and cytoplasmic vacuolation on cocultured glial cells and neurons. *Chemical research in toxicology*, 26(12), 1810-1820.

- Singh, S., Verma, S. K. 2012. Study of the distribution profile of piperidine alkaloids in various parts of *Prosopis juliflora* by the application of Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry (DART-MS). *Natural Products and Bioprospecting*, 2(5), 206-209.

- Tabosa, I.M.; Quintans-Júnior, L.J.; Pamplona, F.V.; Almeida, R.N.; Cunha, E.V.L.; Silva, M.S.; Souza, J.C.A.; Barbosa-Filho, J.M. 2000. Isolamento biomonitorado de alcalóides tóxicos de *Prosopis juliflora* (algaroba). *Rev. Bras. Farmacogn.*, 9–10, 11–22.

-Verga, A., López Lauenstein, D., López, C., Navall, M., Joseau, J., Gómez, C., Royo, O., Degano, W., Marcó, M., 2009. Caracterización morfológica de los algarobos (*Prosopis* sp.) en las regiones fitogeográficas Chaqueña y Espinal norte de Argentina. *Quebracho* 17, 31–40.