

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

ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS EM PEQUENOS RUMINANTES PELA INGESTÃO
EXPERIMENTAL DE *Poincianella pyramidalis* E *Amorimia septentrionalis* E
ELIMINAÇÃO DE FITOTOXINAS PELO LEITE

JOSÉ RADMÁCYO GOMES LOPES

PATOS/PB
2018



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

José Radmácyo Gomes Lopes

ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS EM PEQUENOS RUMINANTES PELA INGESTÃO
EXPERIMENTAL DE *Poincianella pyramidalis* E *Amorimia septentrionalis* E
ELIMINAÇÃO DE FITOTOXINAS PELO LEITE

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, da Universidade
Federal de Campina Grande, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em
Medicina Veterinária.

Dra. Rosane Maria Trindade de Medeiros
Orientadora

Patos-PB
2018

L864a

Lopes, José Radmácyo Gomes.

Alterações reprodutivas em pequenos ruminantes pela ingestão experimental de *Poincianella pyramidalis* e *Amorimia septentrionalis* e eliminação de fitotoxinas pelo leite / José Radmácyo Gomes Lopes. - Patos-PB, 2018.

81 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2018.

"Orientação: Profa. Dra. Rosane Maria Trindade de Medeiros".

Referências.

1. Catingueira. 2. Tingui. 3. Aborto. 4. Malformação. 5. Morte Fetal. 6. Fitotoxinas. 7. Eliminação de Toxinas no Leite. I. Medeiros, Rosane Maria Trindade de. II. Título.

CDU 636.3(043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JOSÉ RADMÁCYO GOMES LOPES
Doutorando

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária.

APROVADO EM 20/08/2018

EXAMINADORES:

Dra. Rosane Maria Trindade de Medeiros
Presidente

Dr. Carlos Henrique Penã-Alfaro
Membro Interno

Dra. Tatiana Rodrigues da Silva
Membro Interno

Dra. Sara Vilar Dantas Simões
Membro Externo

Dr. Ricardo Barbosa de Lucena
Membro Externo

RESUMO

Com o objetivo de determinar os efeitos de *Poincianella pyramidalis* sobre a reprodução de ovinos; confirmar a eliminação do monofluoracetato de sódio pelo leite e fazer uma revisão sobre as principais fitotoxinas eliminadas através do leite, esta tese é composta por três capítulos. No primeiro capítulo são descritos os efeitos da ingestão de *Poincianella pyramidalis* por ovelhas prenhes. O consumo desta planta durante a gestação ocasionou efeitos embriotóxico, abortivo e teratogênico para a espécie ovina. No segundo capítulo foi estudada a possibilidade da eliminação do monofluoracetato de sódio através do leite de fêmeas lactantes, sendo comprovado que, quando consumido durante a gestação, esse princípio ativo tóxico causa a morte dos filhotes lactentes ao consumirem o colostro após o nascimento. O terceiro capítulo é uma revisão bibliográfica, na qual são apresentadas as principais fitotoxinas eliminadas através do leite e que causam intoxicação em animais e/ou humanos que o consomem.

PALAVRAS-CHAVE: Catingueira; Tingui; aborto; malformação; morte fetal; fitotoxinas; eliminação de toxinas no leite.

ABSTRACT

Aiming to determine the effects of *Poincianella pyramidalis* on sheep reproduction; confirm the elimination, by milk, of sodium monofluoroacetate and revise about the main phytotoxins eliminated by milk, this thesis is composed of three articles. The ingestion effects of *Poincianella pyramidalis* by pregnant sheep are described in chapter one. The consumption of this plant during gestation resulted in embryotoxic, abortive and teratogenic effects to this animal species. In the second chapter, it was studied the possibility of elimination of sodium monofluoroacetate by the milk of breastfeeding female sheep, proving that, when consumed during gestation, this toxic active principle causes death in pups if they consume the colostrum after birth. The third chapter is a bibliographic review, in which are presented the main phytotoxins eliminated by milk and that cause intoxication in animals and/or humans that consume it.

KEYWORDS: Catingueira; Tingui; abortion; malformation; fetal death; elimination of toxins by milk.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE QUADROS	8
INTRODUÇÃO GERAL	9
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO I - Perdas reprodutivas causadas pela ingestão de <i>Poincianella pyramidalis</i> em ovinos	12
RESUMO	13
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	18
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO II - Mortalidade neonatal associada ao monofluoroacetato de sódio em cabritos alimentados com colostro de cabras ingerindo <i>Amorimia septentrionalis</i>	23
ABSTRACT	24
RESUMO	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO III - Fitotoxinas eliminadas através do leite: uma revisão	35
ABSTRACT	36
RESUMO	37
INTRODUÇÃO	37

Revisão de Literatura.....	39
Alcaloides indolizidínicos.....	39
Alcaloides piperidínicos.....	40
Alcaloides pirrolizidínicos.....	41
Alcaloides quinolizidínicos.....	42
Glucosinolatos.....	43
Tremetol (ou Tremetone).....	44
Monofluoracetato de sódio.....	45
Ptaquilosídeos.....	46
Indol diterpeno.....	47
Outras Fitotoxinas.....	48
Fitotoxinas não identificadas.....	48
<i>Chrysocoma ciliata</i>	48
CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	49
CONCLUSÃO GERAL	56
ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
CAPÍTULO I	
Figura 1: Árvores de <i>Poincianella pyramidalis</i> (A e D) com flores (B) e vagem (C).....	15
Figura 2: A. Feto abortado, apresentando prognatismo e artrogripose das duas articulações do carpo (Grupo 4 - 40% do volumoso foi substituído por <i>P. pyramidalis</i>). B. Foto ampliada da cabeça do cordeiro da Figura A, para melhor visualização do prognatismo.....	17

LISTA DE QUADROS

Páginas

CAPÍTULO II

Quadro 1: Efeito da ingestão de colostro oriundo de cabras que consumiram ou não <i>Amorimia septentrionalis</i> durante a gestação, sobre os filhotes lactentes.....	34
--	----

INTRODUÇÃO GERAL

Muitas plantas tóxicas têm sido identificadas e responsabilizadas por mortalidade do rebanho nas diferentes regiões do Brasil. Na região Nordeste, as plantas tóxicas representam uma parcela considerável no que diz respeito às enfermidades que acometem ruminantes, provocando perdas econômicas significativas. As perdas econômicas ocorrem de forma direta e indireta, associadas a despesas com veterinários, medicamentos, medidas de controle e prevenção, diminuição no ganho de peso do animal, queda na produção de leite, além de problemas reprodutivos como abortos, infertilidade, malformações e morte dos animais (Assis et al., 2010; Pessoa et al., 2013).

Várias intoxicações por plantas são bastante conhecidas pelos produtores e médicos veterinários, mas ainda continuam ocorrendo casos de intoxicações na época de escassez de pastagens. *Mimosa tenuiflora* (jurema preta) é a única planta comprovada como teratogênica no Nordeste brasileiro (Pimentel et al. 2007, Medeiros et al. 2008, Dantas et al. 2012, Santos et al. 2012), mas há regiões em que essa planta não está presente, e outras plantas como *Aspidosperma pyrifolium* (pereiro) e *Poincianella pyramidalis* (catingueira) são mencionadas pelos produtores como causadoras de malformações.

Na região semiárida, *A. pyrifolium* foi testada em caprinos e causou abortos, mortalidade perinatal e perdas embrionárias, o que leva a crer no seu potencial teratogênico (Medeiros et al. 2004). Em relação a *P. pyramidalis*, não há nenhum tipo de estudo sobre seu potencial teratogênico na espécie ovina.

Outra planta importante na região Nordeste, descrita como causa de alterações do funcionamento cardíaco, *Amorimia septentrionalis* (Tokarnia, 2012), recentemente também foi responsabilizada por causar abortos em caprinos, principalmente no início da gestação (Silva et al., 2017). Adicionalmente, casos de intoxicações por essa planta têm sido relatados em animais recém-nascidos pela ingestão do leite, oriundo de fêmeas que estão ingerindo a planta. Entretanto, ainda não há nenhuma comprovação de que a intoxicação realmente ocorra pela ingestão do leite, pois são escassos os estudos sobre a eliminação de fitotoxinas por esta via.

Diante dos problemas relacionados às intoxicações por plantas em pequenos ruminantes, determinar os potenciais embriotóxico, abortivo e teratogênico de *Poincianella pyramidalis*; e comprovar se o princípio ativo de *Amorimia septentrionalis* é eliminado pelo leite, são ações importantes para diminuir as perdas econômicas na pecuária, gerando

conhecimento para a adoção de medidas de controle para essas intoxicações. Numerosas são as plantas que causam intoxicações em pequenos ruminantes, mas pouco se sabe sobre os princípios ativos destas plantas e sobre a eliminação deles pelo leite. Desta forma, estudar, atualizar e difundir as informações a respeito das fitotoxinas eliminadas pelo leite vem também, contribuir para uma melhor qualidade da saúde pública.

Esta Tese é formada por três Capítulos. O Capítulo I é referente a um artigo publicado na revista *Toxicon*, e descreve os efeitos embriotóxico, abortivo e teratogênico de *Poincianella pyramidalis* sobre a reprodução de ovinos, quando ingerida durante a gestação. No Capítulo II é apresentado um artigo científico enviado para publicação na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*, e confirma a eliminação do monofluoracetato de sódio, princípio ativo encontrado em *Amorimia septentrionalis*, através do leite de fêmeas lactantes, causando, assim, intoxicação em sua prole. O Capítulo III é composto por uma revisão de literatura, também submetido à publicação na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*, que objetivou a apresentação de uma revisão atualizada sobre as fitotoxinas que são eliminadas pelo leite, podendo causar intoxicações em quem o ingere.

REFERÊNCIAS

- Assis, T.S., Medeiros, R.M.T., Riet-Correa, F., Galiza, G.J.N., Dantas, A.F.M., Oliveira, D.M. 2010. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(1):13-20.
- Dantas, A.F.M., Riet-Correa, F., Medeiros, R.M.T., Lopes, J.R., Gardner, D.R., Panter, K., Mota, R.A. 2012. Embryonic death in goats caused by the ingestion of *Mimosa tenuiflora*. *Toxicon*. 59(5):555-557.
- Medeiros, R.M.T., Neto, S.A.G., Riet-Correa, F., Schild, A.L., Sousa, N.L. 2004. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyrifolium*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 24:42-43.
- Medeiros, R.M.T., Figueiredo, A.P.M., Benício, T.M.A., Dantas, F.P.M., Riet-Correa F. 2008. Teratogenicity of *Mimosa tenuiflora* seeds to pregnant rats. *Toxicon*. 51:316-319.
- Pessoa, C.R.M., Medeiros, R.M.T., Riet-Correa, F. 2013. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(6):752-758.
- Pimentel, L.A., Riet-Correa, F., Gardner, D., Panter, K.E., Dantas, A.F.M., Medeiros, R.M.T., Mota, R.A., Araújo, J.A.S. 2007. *Mimosa tenuiflora* as a cause of malformations in ruminants in the Northeastern Brazilian semiarid rangelands. *Veterinary Pathology*. 44(6):928-931.
- Santos, J.R., Dantas, A.F.M., Riet-Correa, F. 2012. Malformações, abortos e mortalidade embrionária em ovinos causada pela ingestão de *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(11):1103-1106.
- Silva L.C.A., Pessoa D.A.N., Lopes J.R.G., Santos J.R.S., Olinda R.G. & Riet-Correa F. 2017. Embryonic death and abortions in goats caused by the ingestion of *Amorimia septentrionalis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 37(12):1401-1404.
- Tokarnia, C.H., Brito, M.F., Barbosa, J.D., Peixoto, P.V., Dobereiner, J. 2012. Plantas tóxicas do Brasil. 2ª ed. Rio de Janeiro: Helianthus.

CAPÍTULO I

Perdas reprodutivas causadas pela ingestão de *Poincianella pyramidalis* em ovinos

Artigo publicado na revista Toxicon (Qualis – A2)

Perdas reprodutivas causadas pela ingestão de *Poincianella pyramidalis* em ovinos

José Radmácyo G. Lopes^a, José Rômulo S. Santos^a, Márcia A. Medeiros^a, Édipo Moreira Campos^a, Franklin Riet-Correa^{a,b,*}, Rosane Maria T. Medeiros^a

^aHospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, CEP 58700-000, Brasil

^bInstituto Nacional de Investigação Agropecuária (INIA) La Estanzuela, Colonia, CP 70.000, Uruguai

*Autor para correspondência. E-mail: franklinrietcorrea@gmail.com (F. Riet-Correa).

RESUMO: Malformações têm sido observadas em ovinos e caprinos no semiárido brasileiro em áreas onde *Poincianella pyramidalis* é dominante. O objetivo deste estudo foi determinar se *Poincianella pyramidalis* causa alterações reprodutivas em ovelhas prenhes. Dezesesseis ovelhas não prenhes foram colocadas para acasalar com dois carneiros. Após confirmação da gestação, por meio de ultrassonografia, no 18º dia após o acasalamento, as ovelhas prenhes foram divididas aleatoriamente em quatro grupos (1, 2, 3 e 4), com quatro animais cada. As ovelhas receberam volumoso em quantidade equivalente a 2% do peso corporal, misturado com 0%, 10%, 20% e 40% de folhas secas de *P. pyramidalis* para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Nos Grupos 1 e 2, todos os animais pariram normalmente. No Grupo 3 (20% de *P. pyramidalis* no volumoso), um cordeiro nasceu com artrogripose e três ovelhas pariram cordeiros prematuros e fracos aos 128, 132 e 133 dias de gestação. No Grupo 4 (40% de *P. pyramidalis* no volumoso), uma ovelha pariu um cordeiro normal; outra teve mortalidade embrionária após sete dias de consumo da planta e duas abortaram nos dias 103 e 144 da gestação. Um dos fetos abortados era normal e o outro apresentava artrogripose e prognatismo. Estes resultados sugerem que *P. pyramidalis* causa mortes embrionárias, abortos e malformações embrionárias em ovelhas. O pastejo por ovelhas prenhes em áreas onde esta planta é dominante deve ser evitado e o volumoso fornecido para fêmeas prenhes confinadas não deve conter mais de 10% de *P. pyramidalis*.

Palavras-chave: Catingueira, morte embrionária, aborto, malformação.

ABSTRACT: Malformations have been observed in sheep and goats in the Brazilian semiarid region in areas where *Poincianella pyramidalis* is dominant. The objective of this trial was to determine whether *Poincianella pyramidalis* causes reproductive changes in pregnant sheep. Sixteen non-pregnant sheep were mated with two rams. After confirmation of the pregnancy by ultrasonography on the 18th day after mating, pregnant sheep were randomly

divided into four groups (# 1, 2, 3, and 4), with four animals each. Sheep received roughage in an amount equivalent to 2% of their body weight, mixed with 0%, 10%, 20% and 40% of dried leaves of *P. pyramidalis* for groups 1, 2, 3 and 4, respectively. In Groups 1 and 2, all animals lambed normally. In Group 3 (20% of *P. pyramidalis* in the roughage), one lamb was born with arthrogyrosis and three sheep gave birth to premature weak lambs within 128, 132, and 133 days of gestation. In Group 4 (40% of *P. pyramidalis* in the roughage), one sheep lambed a normal lamb; another ewe had embryonic mortality after seven days of plant consumption, and two aborted on days 103 and 144 of pregnancy. One of the aborted fetuses was normal and the other showed arthrogyrosis and prognathism. These results suggest that *P. pyramidalis* causes embryonic deaths, abortions, and malformations in sheep. Grazing pregnant sheep in areas where this plant is dominant should be avoided and roughage for confined pregnant females should not contain more than 10% of *P. pyramidalis*.

Keywords: Catingueira, embryonic death, abortion, malformation.

INTRODUÇÃO

Poincianella pyramidalis (Tul.) L.P. Queiroz var. *pyramidalis* (Fig. 1), popularmente conhecida como catingueira, pertence a família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae, composta por cerca de 171 gêneros e aproximadamente 2.250 espécies tropicais e subtropicais (Lewis et al., 2005). Atingindo aproximadamente 10 metros de altura, a catingueira cresce em ambientes de Caatinga, em várias associações vegetais, em áreas que abrangem do Maranhão e Ceará até a Bahia (Aguiar et al., 2003; Giulietti et al., 2004; Lewis et al., 2005; Queiroz, 2009; Silva et al., 2009). A Caatinga é um bioma encontrado exclusivamente no Brasil; corresponde a aproximadamente 10% no território brasileiro e é caracterizado por uma vegetação xerófila, com presença de um considerável número de plantas espinhosas. O clima é semiárido, com temperatura média de 26 °C, precipitação de 350-800 mm³ por ano e uma longa estação seca, de maio ou junho até fevereiro ou março do ano seguinte (Moura et al., 2007).

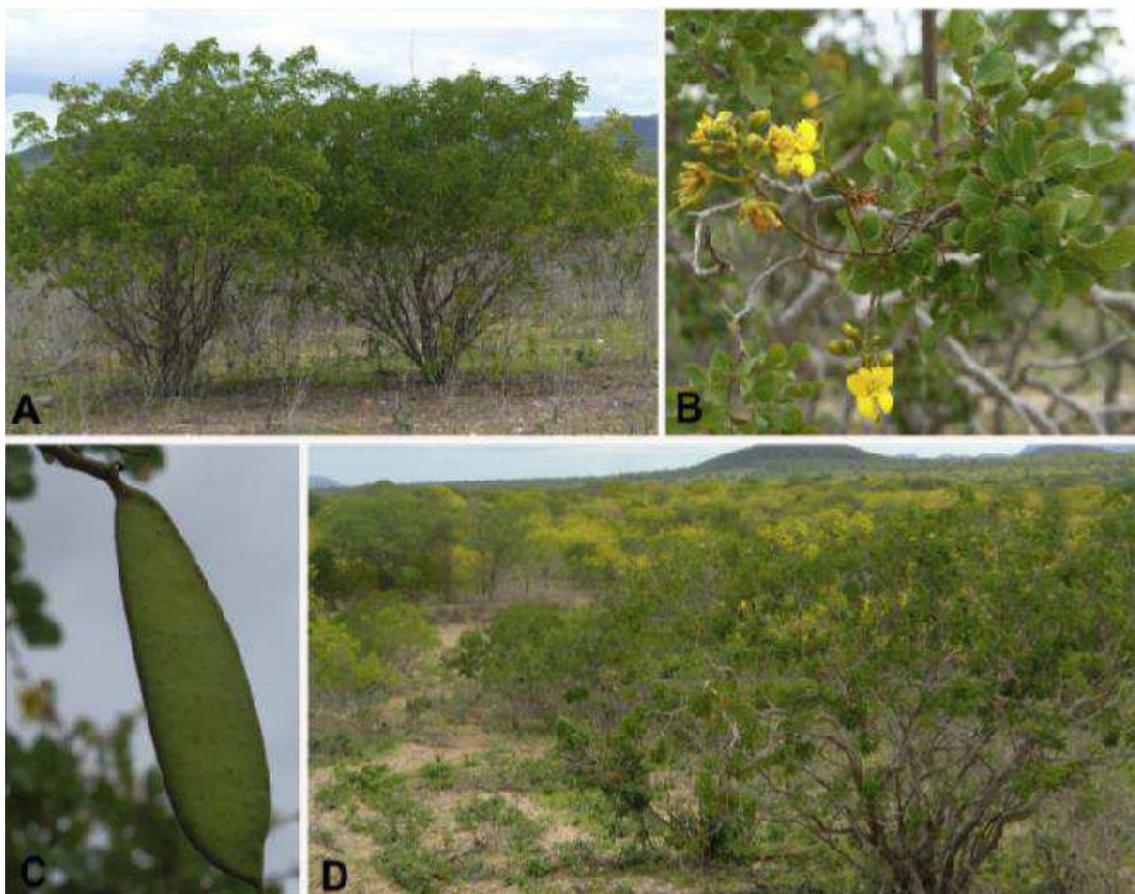


Fig. 1. Árvores de *Poincianella pyramidalis* (A e D) com flores (B) e vagem (C).

Na medicina popular, as folhas da catingueira são utilizadas no tratamento de problemas estomacais, como antipirético e diurético (Bahia, 1979). As flores, folhas e cascas são amplamente utilizados no tratamento de infecções catarrais, diarreia e disenteria (Nishizawa et al., 1995). Santos et al. (2011) constataram, em ensaio realizado com roedores, que a casca de *P. pyramidalis* apresenta atividades analgésica e anti-inflamatória, recomendando o uso desta planta para tratar várias doenças inflamatórias para as quais ela tem sido tradicionalmente utilizada. *P. pyramidalis* apresenta, ainda, potencial madeireiro (Maia, 2004; Paula & Alves, 2007) e como forragem para a alimentação animal (Queiroz, 2009).

Como forragem, *P. pyramidalis* é pouco consumida no início da sua fase vegetativa, devido ao alto teor de taninos, que influenciam sua palatabilidade, mas as folhas são bastante consumidas logo após a fase reprodutiva, quando secam e caem (Araújo Filho & Carvalho, 1998). Seu teor de proteína bruta é de, aproximadamente, 26%; maior que o de outras espécies de Caatinga (Souza et al., 2013). Santos et al. (2008) demonstraram que a participação dessa espécie na dieta de ovinos em pastejo durante a fase de senescência foi de

6,5%. Além disso, Araújo et al. (2010) relataram que no período seco da região semiárida, onde há pouca forragem disponível, as cabras ingerem a casca de *P. pyramidalis*.

No município de Belém do São Francisco, em outubro de 2013, um agricultor da região semiárida do estado de Pernambuco relatou redução na porcentagem de partos, retorno ao cio e secreção vulvar sanguinolenta em um rebanho de 350 ovelhas que permaneceram por 70 dias em uma área onde *P. pyramidalis* predominava. A área continha poucos exemplares das duas plantas conhecidas por causar perdas reprodutivas no Nordeste do Brasil: *Mimosa tenuiflora* (Dantas et al., 2012; Pimentel et al., 2007; Santos et al., 2012) e *Aspidosperma pyrifolium* (Medeiros et al., 2004). Em uma visita, em dezembro do mesmo ano, apenas 20 ovelhas tinham parido e sete cordeiros nasceram com malformações na mandíbula e/ou membros, incluindo artrogripose e micrognatia.

Experimentalmente, a ingestão de *P. pyramidalis* durante a gestação causou lesões fetais e placentárias em ratas (Câmara et al., 2017) e morte embrionária, aborto e malformação em caprinos (Santos dos Reis et al., 2016). No entanto, não há nenhum estudo sobre alterações reprodutivas em ovinos. Esta investigação teve como objetivo estudar os efeitos embriotóxico, abortivo e teratogênico de *P. pyramidalis* em ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal desta instituição (processo CEP 69-2013). Após o diagnóstico ultrassonográfico negativo de gestação, 16 ovelhas foram mantidas com dois machos, para acasalarem. Cada macho foi marcado diariamente com tinta vermelha na região abdominal ventral. Quando manchas de tinta eram observadas na região lombar das ovelhas, indicando uma possível cobertura, essa data era anotada; e, após 18 dias, um novo exame ultrassonográfico foi realizado para confirmar a penhez, visualizando o batimento cardíaco fetal. Após a confirmação da gestação, as fêmeas foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (1, 2, 3 e 4), com quatro ovelhas cada. Cada ovelha recebeu alimentação equivalente a 3% de seu peso vivo, sendo 1% de alimento concentrado e 2% de volumoso (*Cynodon dactylon* - Tifton). Para o Grupo 1 (Grupo Controle), o alimento volumoso continha apenas *Cynodon dactylon*. Nos Grupos 2, 3 e 4, dos 2% de alimento volumoso que cada animal recebeu, 10%, 20% e 40%, respectivamente, foram substituídos por folhas secas e moídas de *P. pyramidalis*. Em todos os grupos experimentais, a ingestão da planta começou imediatamente após a confirmação da prenhez

no 18º dia de gestação. Um exame ultrassonográfico semanal foi realizado nas ovelhas prenhes para monitorar a viabilidade das gestações.

As folhas de *P. pyramidalis* foram coletadas no município de São José do Bonfim, no estado da Paraíba, Brasil. Um exemplar da planta foi prensado, seco, autenticado e depositado no herbário da Universidade Federal de Campina Grande, no Campus de Patos, estado da Paraíba, Brasil (comprovante 6746). Após a coleta, as folhas foram colocadas para secar à sombra por 10 dias e, posteriormente, moídas e armazenadas em baldes plásticos à temperatura ambiente. Todos os dias, a planta era pesada e misturada com a alimentação concentrada e fornecida aos animais no cocho de alimentação.

RESULTADOS

Nos Grupos 1 (Controle) e 2 (10% *P. pyramidalis* no alimento volumoso) todas as ovelhas pariram cordeiros normais. No grupo 3 (20% *P. pyramidalis* no alimento volumoso), um cordeiro apresentou artrogripose medial bilateral leve em ambos os membros anteriores e três ovelhas pariram prematuramente aos 128, 132 e 133 dias de gestação, após consumirem a planta por 110, 114 e 115 dias, respectivamente. Esses cordeiros nasceram fracos e dois deles morreram dois a três dias após o nascimento. Nenhuma malformação foi observada nesses cordeiros durante as necropsias. No Grupo 4 (40% de *P. pyramidalis* no alimento volumoso), uma ovelha pariu normalmente um cordeiro saudável; outra ovelha apresentou mortalidade embrionária no 25º dia de gestação, após sete dias de consumo da planta. Outra ovelha abortou um feto com artrogripose e prognatismo no 144º dia de gestação (Fig. 2), após 126 dias de consumo da planta, e outra abortou um feto normal no 103º dia de gestação, após 85 dias de consumo de *P. pyramidalis*. Nos 4 grupos, todas as ovelhas consumiram toda a planta oferecida diariamente.



Fig. 2. A. Feto abortado, apresentando prognatismo e artrogripose das duas articulações do carpo (Grupo 4 - 40% do volumoso foi substituído por *P. pyramidalis*). B. Foto ampliada da cabeça do cordeiro da Figura A, para melhor visualização do prognatismo.

DISCUSSÃO

A morte embrionária, abortos, malformações e nascimentos prematuros de cordeiros fracos não-viáveis observados neste estudo confirmam as propriedades embriotóxica, abortiva e teratogênica de *P. pyramidalis* em ovinos. Em um experimento semelhante, *P. pyramidalis* causou aborto em 50% de um grupo de cabras alimentadas com volumoso composto por 80% de folhas secas da planta; no entanto, cabras prenhes ingerindo volumoso contendo 20% de folhas secas de *P. pyramidalis*, pariram normalmente (Santos et al., 2014). No presente experimento, *P. pyramidalis* foi coletado no mesmo local, e a planta seca causou alterações reprodutivas nas concentrações de 20% e 40% do volumoso. Isto sugere que *P. pyramidalis* é mais tóxico para ovelhas do que para cabras.

Aborto, morte embrionária e malformações semelhantes às observadas neste experimento são relatadas em caprinos alimentados com folhas frescas de *P. pyramidalis* como alimento exclusivo (Santos dos Reis et al., 2016). Similarmente, em ratos, folhas secas de *P. pyramidalis* causaram uma redução no número e tamanho dos fetos e levaram a lesões placentárias nas ratas (Câmara et al., 2017).

Em ovinos, a mortalidade embrionária tardia com alterações no ciclo estral ocorre entre a fase de implantação e o final da organogênese, no 35º dia da gestação (Gardner et al., 1998). Após este dia de gestação, as perdas fetais são definidas como aborto. Neste experimento, ovinos do Grupo 4, que ingeriram as doses mais altas (40% *P. pyramidalis* no alimento volumoso), apresentaram mortalidade embrionária e abortamento precoce aos 103 e 104 dias de gestação. Um dos cordeiros abortados mostrou também artrogripose e prognatismo, provavelmente induzidos nos primeiros 60 dias de gestação (Pimentel et al., 2007). No grupo 3, que ingeriu uma menor dose da planta (20% *P. pyramidalis* no alimento volumoso), um cordeiro apresentou artrogripose e três ovelhas pariram prematuramente aos 128, 132 e 133 dias de gestação. Esses resultados sugerem que *P. pyramidalis* pode induzir diferentes perdas reprodutivas dependendo da dose e do estágio da gestação em que é ingerida. Altas doses podem causar mortalidade embrionária se ingeridas antes de 35 dias ou abortos se ingeridas após 35 dias. Doses menores podem causar malformações se ingeridas nos primeiros 60 dias de gestação (Pimentel et al., 2007) ou nascimento de cordeiros fracos se ingeridas por períodos mais longos após 60 dias de gestação.

As alterações reprodutivas induzidas por *P. pyramidalis* são semelhantes as causadas por outras plantas encontradas na região semiárida do Nordeste brasileiro. *Mimosa tenuiflora* foi determinada como causa de mortes embrionárias (Dantas et al., 2012; Santos et al., 2012),

abortos (Santos et al., 2012) e malformações ósseas da cabeça e dos membros inferiores (Dantas e tal., 2010 Medeiros et al., 2008; Pimentel et al., 2007; Santos et al., 2012). A toxicidade de *M. tenuiflora* tem sido associada à presença dos alcaloides da triptamina N-metil e N, N-dimetiltriptamina nesta planta (Gardner et al., 2014). A semelhança entre as malformações e outras perdas reprodutivas causadas por *M. tenuiflora* e aquelas causadas por *P. pyramidalis* sugere a necessidade de investigar a presença de alcaloides de triptamina nesta última.

Aspidosperma pyriformium tem sido relatado como causa de mortes embrionárias e abortos em caprinos no nordeste do Brasil (Medeiros et al., 2004) e a intoxicação por essa planta deve ser considerada no diagnóstico diferencial de perdas reprodutivas em pequenos ruminantes nesta região. Adicionalmente, *Amorimia septentrionalis*, além de seu efeito cardiotoxíco, pode causar morte embrionária e aborto em cabras gestantes, principalmente quando ingerida nos estágios iniciais da gestação (Silva et al., 2017). No entanto, a toxicidade de *A. pyriformium* e *A. septentrionalis* não foi demonstrada em ovinos. Outras causas de perdas reprodutivas e malformações em ovinos, como o vírus Cache Valley, a febre catarral ovina, o vírus Schmallenberg e o vírus Akabane, não foram diagnosticados no Nordeste do Brasil.

CONCLUSÃO

Poincianella pyramidalis causa mortes embrionárias, abortos e malformações em ovinos. Para a profilaxia desta intoxicação, é necessário manter as ovelhas prenhes e em época de reprodução fora das áreas onde há *P. pyramidalis*, principalmente na estação seca, quando há escassez de alimentos. Para ovelhas prenhes confinadas, esta planta pode ser fornecida, porém em uma quantidade que não exceda 10% do alimento volumoso. Como as alterações reprodutivas e malformações causadas por *P. pyramidalis* e *M. tenuiflora* são semelhantes, o diagnóstico diferencial entre as duas intoxicações por plantas deve ser baseado na presença da planta nos piquetes.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia (INCT) para o estudo do Controle de Intoxicações por Plantas, processo CNPq 573534/2008-0.

Transparência de Documento

A transparência de documento relacionada ao artigo publicado pode ser encontrada on-line em <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.08.020>.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, C.M.L., Zanella, F.C.V., Martins, C.F., Carvalho, C.A.L. 2003. Plantas visitadas por *Centris* spp. (Hymenoptera: Apidae) na Caatinga para obtenção de recursos florais. *Neotrop. Entomol.* 32:247-259. doi: 10.1590/S1519-566X2003000200009.
- Araújo, Filho, J.A., Carvalho, F.C. 1998. Fenologia e valor nutritivo de espécies lenhosas caducifólias da caatinga. Embrapa Caprinos – Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos (Comunicado Técnico, 39), Sobral.
- Araújo, K.D., Dantas, R.T., Amdrade, A.P., Parente, H.N., Éder-Silva, E. 2010. Uso de espécies da caatinga na alimentação de rebanhos no município de São João do Cariri-PB. *RA'E GA.* 20:157-171. doi: 10.5380/raega.v20i0.20619.
- Bahia, M.V., 1979. Inventário de Plantas Mediciniais do Estado da Bahia. SEPLANTEC/CADCT, Salvador.
- Câmara, A.C.L., Gadelha, I.C.N., Castro, M.B., Medeiros, R.M.T., Riet-Correa, F., Soto-Blanco, B. 2017. Embryotoxic effects of *Poincianella (Caesalpinia) pyramidalis* leaves on pregnant rats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29(2):137-142. doi: 10.1177/1040638716682564.
- Dantas, A.M.F., Riet-Correa, F., Medeiros, R.M.T., Galiza, G.J.N., Pimentel, L.A., Anjos, B.I., Mota, R.A. 2010. Malformações congênitas em ruminantes no semiárido no Nordeste Brasileiro. *Pesqui. Vet. Bras.* 30(10):807-815. doi:10.1590/S0100-736X2010001000002.
- Dantas, A.M.F., Riet-Correa, F., Medeiros, R.M.T., Lopes, J.R., Gardner, D.R., Panter, K., Mota, R.A. 2012. Embryonic death in goats caused by the ingestion of *Mimosa tenuiflora*. *Toxicon.* 59(5):555-557. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.11.020.
- Gardner, D.R., Panter, K.E., Stegelmeier, B.L., James, L.F., Ralphs, M.H., Pfister, J.A., Schoch, T.K. 1998. Livestock poisoning by teratogenic and hepatotoxic range plants. In: Garland, T., e Barros, A.C. (Eds.), *Toxic Plants and Other Natural Toxicants*. CAB International, New York. EUA, pp. 303-306.
- Gardner, D., Riet-Correa, F., Lemos, D., Welch, K., Pfister, J., Panter, K. 2014. Teratogenic effects of *Mimosa tenuiflora* in a rat model and possible role of N-methyl and N, N-

- dimethyltryptamine. J. Agricul. Food Chem. 62:7398-7401.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf5005176>.
- Giulietti, A.M., Du Bocage Neta, A.L., Castro, A.A.J.F., Gamarra-Rojas, C.F.L., Sampaio, E.V.S.B., Virgínio, J.F., Queiroz, L.P., Figueiredo, M.A., Rodal, M.J.N., Barbosa, M.R.V., Harley, R.M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: Silva, J.M.C., Tabarelli, M., Fonseca, M.T., Lins, L.V., 2004. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. (Orgs.). MMA, UFPE, Conservation International do Brasil, Fundação Biodiversitas, Embrapa Semiárido, Brasília. 48-90.
- Lewis, G.P., Schrire, B.D., Mackinder, B.A., Lock, J.M. 2005. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, 63(3):195-199. doi: 10.1017/S0960428606190198.
- Maia, G. N. 2004. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. D&Z Computação, São Paulo. p.413.
- Medeiros, R.M.T., Neto, S.A., Riet-Correa, F., Schild, A.L., Sousa, N.I. 2004. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyrifolium*. Pesqui. Vet. Bras. 24:42-43.
- Medeiros, R.M.T., Figueiredo, A.P.M., Benício, T.M.A., Dantas, F.P.M., Riet-Correa, F. 2008. Teratogenicity of *Mimosa tenuiflora* seeds to pregnant rats. Toxicon. 51:316-319. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.06.012.
- Moura, M.S.B., Moura, M.S., Galvincio, J.D., Brito, L.T.L., Souza, L.S.B., Sá, I.I.S., Silva, T.G.F. 2007. Clima e água de chuva no semiárido. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/36534/1/OPB1515.pdf>.
- Nishizawa, T., Tsuchiya, A., Pinto, M.M.V. 1995. Characteristics and utilization of tree species in the semi-arid woodland of north-east Brazil. The Fragile Tropics of Latin America. Sustain. Manag. Changing Environ (UNU), p.335.
- Paula, J.E.; Alves, J.L.H. 2007. 897 Madeiras nativas do Brasil: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção, uso. Cinco Continentes, Porto Alegre, p. 438.
- Pimentel, L.A., Riet-Correa, F., Gardner, D., Panter, K.E., Dantas, A.F.M., Medeiros, R.M.T., Mota, R.A., Araújo, J.A.S. 2007. *Mimosa tenuiflora* as a cause of malformations in ruminants in the northeastern Brazilian semiarid rangelands. Vet. Pathol. 44:928-931. doi: 10.1354/vp.44-6-928.
- Queiroz, L.P. 2009. Leguminosas da Caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, p. 467.
- Santos, C.A., Passos, A.M.P.R., Andrade, F.C., Camargo, E.A., Estevam, C.S., Santos,

- M.R.V., Thomazzi, S.M. 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. Rev. Bras. Farmacogn. 21(6):1077-1083. doi: 10.1590/S0102-695X2011005000179.
- Santos, G.R.A., Batista, A.M.V., Guim, A., Santos, M.V.F., Silva, M.J.A., Pereira, V.L.A. 2008. Determinação da composição botânica da dieta de ovinos em pastejo na Caatinga. Rev. Bras. Zootec. 37(10):1876-1883. doi: 10.1590/S1516-35982008001000023.
- Santos, J.R.S., Medeiros, A.F.M., Riet-Correa, F. 2012. Malformações, abortos e mortalidade embrionária em ovinos causada pela ingestão de *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae). Pesqui. Vet. Bras. 32:1103-1106. doi: 10.1590/S0100-736X2012001100005
- Santos, J.R.S., Lopes, J.R.G., Medeiros, M.A., Campos, E.M., Feitosa, T.F., Medeiros, R.M.T., Riet-Correa, F. 2014. Mortalidade embrionária e abortos em cabras causada pela ingestão de *Caesalpinia pyramidalis*. In: VIII Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário e II Encontro Nacional de Sanidade de Animais de Produção, 2014, Cuiabá. Universidade Federal do Mato Grosso, MT. Cuiabá.
- Santos dos Reis, S.D., Oliveira, R.S., Marcelino, S.A.C., Macêdo, J.T.S.A., Riet-Correa, F., Pimentel, L.A., Pedroso, P.M.O. 2016. Congenital malformations and other reproductive losses in goats due to poisoning by *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (= *Caesalpinia pyramidalis* Tul.). Toxicon. 118:91-94. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.04.043
- Silva, L.B., Santos, F.A.R., Gasson, P., Cutler, D. 2009. Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), espécie endêmica da Caatinga do nordeste do Brasil. Acta. Bot. Bras. 23(2):436-445. doi: 10.1590/S0102-33062009000200015.
- Silva, L.C.A., Pessoa, D.A.N., Lopes, R.G., Santos, J.R.S., Olinda, R.G., Riet-Correa, F. 2017. Embryonic death and abortions in goats caused by the ingestion of *Amorimia septentrionalis*. Pesqui. Vet. Bras. 37(12):1401-1404.
- Souza, L.V.S., Azevedo, D.O., Carvalho, A.J.A., Simões, W.L., Voltolini, T.V. 2013. Qualidade nutricional de plantas forrageiras de ocorrência natural na caatinga. Enciclopédia Biosf. 9(6):178-185.

CAPÍTULO II

Mortalidade neonatal associada ao monofluoroacetato de sódio em cabritos alimentados com colostro de cabras ingerindo *Amorimia septentrionalis*

Artigo aceito para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira (Qualis – A2)

Mortalidade neonatal associada ao monofluoroacetato de sódio em cabritos alimentados com colostro de cabras ingerindo *Amorimia septentrionalis*¹

José R.G. Lopes^{1,2}, José A.S. Araújo³, Danielle A.N. Pessoa¹, Stephen Lee⁴, Daniel Cook⁴, Franklin Riet-Correa^{1,5}, Rosane M.T. Medeiros¹

ABSTRACT.- Lopes J.R.G., Araújo J.A., Pessoa D.A.N., Lee S., Riet-Correa F., Medeiros R.M.T. 2018. [Neonatal mortality associated with sodium monofluoride by colostrum in kids that fed colostrum from goats ingesting *Amorimia septentrionalis*.] Mortalidade neonatal associada ao monofluoroacetato de sódio em cabritos alimentados com colostro de cabras ingerindo *Amorimia septentrionalis*. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Avenida Universitária S/N, Bairro Santa Cecília, Patos-PB 58780-110, Brasil. E-mail: macyo_mv@hotmail.com.

Sudden deaths after colostrum ingestion in kids and lambs born of mothers grazing in areas with *Amorimoa septentrionalis* are reported in Paraíba's semiarid. The aim of this work was to determine if the sodium monofluoroacetate (MF) contained in *A. septentrionalis* is eliminated by milk, causing the death of the kids. After confirming the gestation on the 25th day after the mating, 26 goats were randomly distributed into three groups. In Group 1, eight goats have received fresh leaves of *A. septentrionalis* at daily doses of 1g/kg body weight, administered at three different periods during gestation: between days 91 to 100, 116 to 125 and from day 140 to delivery day. In Group 2, consisting of 10 females, eight goats have received 1g/kg live weight of *A. septentrionalis* dried and milled leaves, fed daily from the 140th day of gestation until delivery. The other two goats of this group did not ingest the plant during gestation and, when they gave birth, the colostrum supplied to their kids was replaced by colostrum of goats, from that same group, who ingested the plant. Eight goats from Group

*Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

¹Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Avenida Universitária S/N, Bairro Santa Cecília, Patos-PB 58780-110, Brasil. ²Autor para correspondência: macyo_mv@hotmail.com.

³Escola Superior Batista do Amazonas (ESBAM), Rua Leonor Teles 153, Adrianópolis, Manaus-AM. 69057-510.

⁴Poisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Logan, USA.

⁵Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Colonia Uruguay.

3 (control) did not ingest *A. septentrionalis*. Seven goats from Group 1 showed signs of intoxication between the 2nd and 8th days of plant administration, in all periods, and recovered between 7 to 12 days. Another one had severe clinical signs and was subjected to euthanasia *in extremis*. Two goats aborted. Four kids, from two goats, received colostrum and, after 15 minutes, presented depression, breathing wheezing, lateral recumbence, bleats and death. Two goats gave birth at night; the two kids were found dead and, at necropsy, it was verified that they were born alive. The last goat in this group gave birth to two kids who showed no signs of intoxication after colostrum ingestion. In Group 2, the eight goats that ingested the dry plant presented tachycardia and engorgement of the jugular veins; six aborted, and the kids of the other two goats died immediately after delivery without ingesting colostrum. The three kids of the two goats that did not ingest the plant during gestation did not show signs of intoxication after ingesting colostrum from the goats that had ingested the plant. In Group 3, all females kidded normally and the kids showed no signs of intoxication. Ten leaf samples of *A. septentrionalis* contained $0.00074\% \pm 0.00018$ MF. These results demonstrate that the MF of *A. septentrionalis* is eliminated by colostrum and may cause the death of the kids. Like in previous report the plant also caused abortion.

INDEX TERMS: *Amorimia septentrionalis*, sodium monofluoracetate, toxins in milk, abortion.

RESUMO.- Mortes súbitas, após a ingestão do colostro, em cabritos e cordeiros nascidos de mães que pastejam em áreas com *Amorimia septentrionalis* são relatadas no semiárido da Paraíba. O objetivo deste trabalho foi determinar se o monofluoracetato de sódio (MF) contido em *Amorimia septentrionalis* é eliminado pelo leite, causando a morte dos cabritos. Após a confirmação da gestação no 25º dia após a cobertura, 26 cabras foram aleatoriamente distribuídas em três grupos. No Grupo 1, oito cabras receberam folhas frescas de *A. septentrionalis* em doses diárias de 1g/kg de peso vivo, administradas em três períodos diferentes durante a gestação: entre os dias 91 a 100, 116 a 125 e do 140º dia até o parto. No Grupo 2, composto por 10 fêmeas, oito cabras receberam 1g/kg de peso vivo de folhas secas e trituradas de *A. septentrionalis*, fornecida diariamente do 140º dia de gestação até o parto. As outras duas cabras desse grupo não ingeriram a planta durante a gestação e, ao parirem, o colostro fornecido aos seus cabritos foi substituído pelo colostro de cabras, desse mesmo grupo, que ingeriram a planta. Oito cabras do Grupo 3 (controle) não ingeriram *A.*

septentrionalis. Sete cabras do Grupo 1 apresentaram sinais de intoxicação entre o 2º e 8º dia de administração da planta, em todos os períodos, e se recuperavam em 7 a 12 dias. Outra apresentou sinais clínicos graves e foi eutanasiada *in extremis*. Duas cabras abortaram. Quatro cabritos, oriundos de duas cabras, receberam colostro e, após 15 minutos, apresentaram depressão, respiração ofegante, decúbito lateral, berros e morte. Dois cabritos, nascidos de duas cabras que pariram durante à noite, foram encontrados mortos e os achados de necropsia permitem afirmar que nasceram vivos. A outra cabra desse grupo pariu dois cabritos que, mesmo mamando o colostro, não apresentaram sinais de intoxicação. No Grupo 2, as oito cabras que ingeriram a planta seca apresentaram taquicardia e ingurgitamento das veias jugulares; seis abortaram e os cabritos das outras duas morreram imediatamente após o parto, sem ingerir colostro. Os três filhotes das duas cabras que não ingeriram a planta durante a gestação não apresentaram sinais de intoxicação após ter ingerido colostro das cabras que tinham ingerido a planta. No Grupo 3, todas as fêmeas pariram normalmente e os filhotes não apresentaram sinais de intoxicação. Dez amostras de folhas de *A. septentrionalis* continham 0,00074 % ± 0,00018 de MF. Estes resultados demonstram que o MF de *A. septentrionalis*, além de causar abortos, é eliminado pelo colostro podendo causar a morte dos cabritos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Amorimia septentrionalis*, monofluoracetato de sódio, toxinas no leite, aborto.

INTRODUÇÃO

O monofluoracetato de sódio (MF) foi identificado como agente tóxico em várias plantas tóxicas que causam a síndrome da morte súbita associada ao exercício (Tokarnia et al. 2012). No Brasil, são conhecidas 12 espécies, pertencentes às famílias Rubiaceae, Bignoniaceae e Malpighiaceae, que causam esta síndrome (Carvalho et al. 2009). Devido à sua toxicidade aguda, boa palatabilidade e ampla distribuição geográfica, estão entre as mais importantes plantas tóxicas para ruminantes no país (Tokarnia et al. 2012).

No semiárido nordestino, principalmente nos estados do Ceará, Paraíba e Pernambuco (Albuquerque et al. 2014), a intoxicação por *Amorimia septentrionalis* é a mais conhecida, difundida e importante causa de morte súbita em ruminantes (Duarte et al. 2013). Há relatos de surtos de intoxicação por essa planta em ovinos e caprinos no estado da Paraíba e as intoxicações ocorrem principalmente no início do período chuvoso, quando essas plantas

brotam antes de outras forrageiras ou após o final desse período, quando algumas forrageiras secam (Vasconcelos et al. 2008).

Os sinais clínicos observados em caprinos experimentalmente intoxicados são dispneia, taquicardia e decúbito esternal evoluindo para decúbito lateral com movimentos de pedalagem, seguida de morte. Alguns animais menos afetados se recuperam. Na necropsia de animais intoxicados não é descrita nenhuma lesão significativa (Paraguassu 1983), embora, histologicamente, degeneração hidrópico-vacuolar das células do epitélio dos túbulos renais foram observadas em alguns ruminantes intoxicados (Tokarnia et al. 2012); e, em doses menores, ingeridas por períodos prolongados, as plantas que contêm MF podem causar fibrose cardíaca (Soares et al. 2011).

Além de causar a síndrome da morte súbita, a ingestão de *A. septentrionalis* provoca mortalidade embrionária e abortos em caprinos (Silva et al. 2017). Produtores de caprinos e ovinos no semiárido da Paraíba mencionam que cabritos e cordeiros, nascidos de mães que pastejaram em áreas com plantas do gênero *Amorimia* durante a gestação, morrem subitamente após a ingestão do colostro, sugerindo que o MF pode ser excretado pelo leite, causando a morte dos filhotes. Essa via de eliminação do princípio ativo constitui um risco a saúde pública, quando há a possibilidade de ingestão, por seres humanos, do leite oriundo de animais que ingerirem *A. septentrionalis*.

Para investigar, experimentalmente, a eliminação de MF através do leite, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de intoxicação de cabritos após a ingestão de colostro proveniente de cabras que ingeriram *Amorimia septentrionalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande. Foram utilizadas 26 cabras e dois bodes, todos em idade reprodutiva e sem raça definida. Inicialmente, as fêmeas foram submetidas a exame ultrassonográfico para diagnóstico negativo de gestação e, posteriormente, colocadas com os bodes para serem cobertas. Cada reprodutor foi marcado diariamente, com tinta vermelha, na região abdominal ventral. Quando se observavam manchas vermelhas na região lombar das cabras, indicando uma possível cobertura, foi realizado exame ultrassonográfico 25 dias após essa observação, para confirmar a prenhez pela visualização de batimentos cardíacos do feto. Após o diagnóstico positivo de gestação, as cabras prenhes foram distribuídas aleatoriamente em três grupos (Grupos 1, 2 e 3).

Amorimia septentrionalis fornecida aos animais foi coletada semanalmente no município de Teixeira (07°12'24''S 37°15'11''W), na Paraíba. Um espécime da planta foi prensado, seco, e depositado no Herbário da Universidade Federal de Campina Grande, no Campus de Patos, estado da Paraíba, Brasil (comprovante nº 6702). Dez amostras de folhas de *A. septentrionalis* foram enviadas ao Poisonous Plant Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Logan, USA, para a detecção e quantificação de MF em sua composição, através do método de cromatografia gasosa descrito por Santos-Barbosa et al. (2017).

No Grupo 1, composto por oito fêmeas, as cabras receberam folhas frescas de *A. septentrionalis* em doses diárias de 1g/kg de peso vivo, administradas em três períodos diferentes durante a gestação: entre os dias 91 a 100, 116 a 125 e do 140º dia até o parto. O intervalo de 15 dias entre cada período de administração foi com o objetivo de que ocorresse a desintoxicação do MF, diminuindo o risco de morte das fêmeas, e para induzir um aumento da resistência das mesmas à intoxicação, como descrito por Duarte et al. (2014). A planta foi armazenada sob refrigeração por até uma semana, e fornecida diariamente, sendo administrada aos caprinos colocando pequenos volumes diretamente na boca dos animais.

No Grupo 2, composto por 10 fêmeas, oito cabras também receberam 1g/kg de peso vivo de *A. septentrionalis*, porém as folhas haviam sido previamente colocadas para secar à sombra por 10 dias, e posteriormente trituradas. O percentual de matéria seca foi de 34,5%. A planta seca foi fornecida do 140º dia de gestação até o parto. As outras duas cabras desse grupo não ingeriram a planta durante a gestação e, ao parirem, o colostro fornecido aos seus filhotes foi substituído pelo colostro de cabras deste mesmo grupo, que ingeriram a planta seca no final da gestação. A planta seca e triturada foi armazenada em baldes plásticos, em temperatura ambiente e foi fornecida aos animais misturada à ração concentrada, para facilitar a ingestão da planta.

O Grupo 3, composto por oito cabras, serviu como grupo controle e não ingeriu *A. septentrionalis*.

Durante o experimento, cada animal recebeu, diariamente, alimento em quantidade equivalente a 3% do seu peso vivo, sendo 1% de alimentação concentrada e 2% de alimento volumoso (feno de Tifton - *Cynodon dactylon*) e água *ad libitum*.

Em todas as fêmeas prenhes, exames ultrassonográficos foram realizados a cada 15 dias para monitorar a viabilidade da gestação. Antes do fornecimento da planta, todos os animais foram pesados e aferidos os batimentos cardíacos, movimentos respiratórios e

movimentos ruminais. As cabras foram acompanhadas diariamente para observação de parto ou aborto. Após o parto, em todas as cabras, exceto nas duas cabras do Grupo 2 que não ingeriram a planta, o colostro foi coletado e fornecido aos respectivos cabritos, que foram observados por um período de seis horas após o consumo do colostro.

O colostro não fornecido (em caso de aborto) ou excedente foi congelado em freezer, para, posteriormente, ser administrado aos cabritos das cabras que não ingeriram a planta durante a gestação.

Em caso de morte ou aborto, os animais foram necropsiados, realizada a coleta de amostra de órgãos das cavidades torácica e abdominal, e sistema nervoso central, foram fixados em formalina a 10%, incluídas em parafina, cortadas a 4-6 μm e coradas com Hematoxilina-eosina para exame histopatológico.

RESULTADOS

Todas as cabras do Grupo 1 apresentaram sinais de intoxicação, que incluíam: depressão, taquicardia, ingurgitamento das veias jugulares e relutância em caminhar, permanecendo a maior parte do tempo em decúbito esternal. Esses sinais clínicos tiveram início entre o 2º e 8º dia de cada um dos três períodos de administração da planta. A recuperação dos animais se dava em 7 a 12 dias após o fim do período de administração da planta, exceto em uma das cabras que apresentou agravo no quadro de intoxicação e, além dos sinais clínicos já descritos, demonstrou movimentos de pedalagem em decúbito lateral, nistagmo e opistótono, realizando-se a eutanásia *in extremis* no segundo dia do terceiro período de administração da planta. Na necropsia foi observada congestão dos vasos do cérebro e bexiga distendida. Não foi observada nenhuma lesão histopatológica significativa. Duas cabras apresentaram corrimento vaginal mucossanguinolento após 8 e 28 dias de consumo da planta, respectivamente, e aborto de um feto cada uma. Quatro cabritos, oriundos de duas cabras, receberam colostro e, após 15 minutos, aproximadamente, apresentaram depressão, respiração ofegante, decúbito lateral, berros e morte. Nas necropsias foram encontrados edema pulmonar e hidropericárdio. Dois cabritos, nascidos de duas cabras que pariram durante a noite, foram encontrados mortos e, na necropsia, foram observados sinais de que nasceram vivos: presença de colostro no abomaso e aeração pulmonar. Nos estudos histopatológicos, não foram observadas lesões significativas. Uma das cabras do Grupo 1 pariu dois cabritos que, mesmo mamando o colostro, não apresentaram sinais de intoxicação (Quadro 1).

No Grupo 2, as oito cabras que ingeriram a planta seca a partir do 140º dia de gestação apresentaram taquicardia e ingurgitamento das veias jugulares, parindo 14 cabritos entre 2 a 5 dias após o início do consumo da planta. Cinco partos foram acompanhados, resultando em nove filhotes que já nasceram mortos. O parto de três cabras ocorreu durante a noite e, os cinco filhotes resultantes, só foram encontrados pela manhã, todos já sem vida; na necropsia, foi observado que três desses animais, nascidos de duas cabras, apresentavam ar nos pulmões, indicando que nasceram vivos. Os outros dois animais não apresentavam aeração pulmonar. Em nenhum dos cinco cabritos encontrados mortos foi observado colostro no abomaso e não foram observadas alterações significantes durante as necropsias ou na histopatologia. Os três filhotes das duas cabras que não ingeriram a planta durante a gestação receberam, logo após o nascimento, o colostro de outras três cabras que haviam ingerido a planta no final da gestação. Os filhotes foram observados por seis horas e não apresentaram sinais de intoxicação (Quadro 1).

No Grupo 3 (controle), todas as fêmeas pariram normalmente. Os filhotes ingeriram o colostro e não apresentaram nenhum sinal de intoxicação (Quadro 1).

A média da quantidade de MF contida nas amostras de folhas de *A. septentrionalis* foi de 0,00074 % ± 0,00018.

DISCUSSÃO

A morte hiperaguda dos cabritos, com sinais clínicos característicos da intoxicação por MF, após o consumo do colostro produzido por cabras que ingeriram *Amorimia septentrionalis* confirmam a hipótese da eliminação do MF através do leite como causa de intoxicação. Por outro lado, no Grupo 2, a administração da planta em doses maiores causou morte neonatal, não sendo possível demonstrar a eliminação de MF pelo leite.

Em um experimento semelhante, Vasconcelos et al. (2008), forneceram *A. septentrionalis*, na dose de 2 g de planta fresca por kg de peso vivo, para duas cabras e cinco ovelhas, nos últimos 15 dias de gestação. Um cabrito de uma das cabras morreu cinco minutos após ter ingerido o colostro e a outra cabra pariu um cabrito que morreu logo após o parto, sem mamar o colostro. Assim como em nosso estudo, também observaram aborto, que ocorreu em uma ovelha que consumiu a planta por 10 dias.

Os sinais clínicos observados nos cabritos do Grupo 1 que ingeriram o colostro e posteriormente vieram a óbito, são semelhantes aos sinais descritos por Vasconcelos et al. (2008) em intoxicações naturais por *A. septentrionalis* em caprinos, ocorridas no município de

Cabaceiras, Paraíba, sendo mencionados relutância em caminhar, queda, permanência em decúbito lateral, movimentos de pedalagem, taquipneia, berros e morte. A ausência de achados histopatológicos significativos nos cabritos intoxicados também foi observada por Paraguassu (1983), em uma série de experimentos realizados com caprinos. Os sinais clínicos e a ausência de achados histopatológicos observados nos cabritos que ingeriram o colostro e posteriormente vieram a óbitos, são consistentes com a intoxicação por *A. septentrionalis*, tendo o leite materno como a única via de intoxicação, já que foi a única fonte de alimento ingerida pelos cabritos.

Já foi demonstrado que outras plantas da região semiárida também eliminam fitotoxinas através do leite, causando a intoxicação de filhotes que o ingerem. Utilizando camundongos como modelo experimental, Lopes et al. (2014) comprovaram que a toxina tremorgênica presente em *Ipomoea asarifolia* ou seu metabólito é eliminado pelo leite de fêmeas que consomem ração contendo a planta, causando tremores e até a morte dos filhotes. Posteriormente, Lucena et al. (2014), também confirmaram a ocorrência da intoxicação em filhotes ovinos que tinham o leite de fêmeas que se alimentaram de *I. asarifolia*, como alimento exclusivo.

Crotalaria spectabilis também afeta a prole em camundongos, seja quando as sementes dessa planta são fornecidas junto a ração das fêmeas em lactação, ou quando a monocrotalina (princípio tóxico da planta) é adicionado na ração, causando efeitos tóxicos como debilidade, ascite e anasarca, tanto nas mães quanto nos filhotes (Medeiros 1994).

Alguns princípios ativos de plantas também têm sido constatados em subprodutos lácteos. Alvarenga (2015) forneceu a ratos, ração contendo queijo produzido a partir do leite de vacas que receberam *Pteridium aquilinum*, que contém ptaquilosídeo, conhecido carcinogênico. Na necropsia, as vacas não apresentavam quaisquer alterações referentes à intoxicação, porém, nos ratos, foi observado o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no estômago, intestinos e bexiga.

Quanto a ocorrência de aborto pela ingestão de *A. septentrionalis*, Silva et al. (2017) forneceram 5 g/kg de *A. septentrionalis* fresca, no início da fase fetal (36 dias de gestação) e no terço médio (93 dias de gestação) dessa mesma fase, para quatro cabras prenhes em cada um desses períodos. Dos animais que ingeriram a planta no início da fase fetal, 75% abortaram; já os animais que receberam a planta no terço médio da fase fetal, apresentaram 50% de aborto e os pesquisadores sugeriram que os efeitos tóxicos sobre o feto, diminuem à medida que a gestação progride. No entanto, em nosso experimento, a planta foi ingerida por

um período mais curto, em menor quantidade e no final da gestação, provocando aborto em 75% das cabras do Grupo 2, o que sugere que o efeito da planta sobre a reprodução esteja relacionado com a concentração de MF presente na planta, e não com a idade gestacional. O MF não foi quantificado em amostras da planta utilizadas no experimento desenvolvido por Silva et al. (2017). Nesse experimento, a quantidade de MF nas amostras de *A. septentrionalis* foi de 0,00074 % ± 0,00018 e, embora em concentração menor do que a quantidade observada por Lee et al. (2012) e Albuquerque et al. (2014), que foi de 0,002% de MF nas folhas da planta, foi capaz de causar intoxicação, muito provavelmente pela ingestão repetida de pequenas doses.

CONCLUSÃO

Amorimia septentrionalis causa aborto e o seu princípio ativo tóxico, o monofluoracetato de sódio, é eliminado pelo leite podendo causar morte dos neonatos.

COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFCG, protocolo CEP n.69-2013.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque S.S.C., Rocha B.P., Almeida V.M., Oliveira J.S., Riet-Correa F., Lee S.T., Neto J.E. & Mendonça F.S. 2014. Fibrose cardíaca associada à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(5):433-437.
- Alvarenga T.M.P. 2015. Avaliação clinicopatológica de ratos alimentados com queijo de leite de vacas que consumiam *Pteridium aquilinum*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 88p.
- Carvalho G.D., Nunes L.C., Bragança H.B.N. & Porfírio L.C. 2009. Principais plantas tóxicas causadoras de morte súbitas em bovinos no estado do Espírito Santo - Brasil. *Arch. Zootec.* 58:87-98.
- Duarte A.L., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. 2013. Intoxicação por *Amorimia* spp. em ruminantes. *Cienc. Rural.* 43(7):1294-1301.
- Duarte A. L. L., Medeiros R.M.T., Carvalho F.K.L., Lee S.T., Cook D., Pfister J.A., Costa V.M.M. & Riet-Correa F. 2014. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septentrionalis* in goats. *J. Appl. Toxicol.* 34(2):220-223.

- Lee S.T., Cook D., Riet-Correa F., Pfister J.A., Anderson W.R., Lima F.G. & Gardner D.R. 2012. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon*. 60(5):791-796.
- Lopes J.R.G., Riet-Correa F., Cook D., Pfister J.A. & Medeiros R. M.T. 2014. Elimination of the tremorogenic toxin of *Ipomoea asarifolia* by milk. *Pesq. Vet. Bras.* 34(11):1085-1088.
- Lucena K.F.C., Rodrigues J.M.N., Campos E.M., Dantas A.F.M., Pfister J.A., Cook D., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. 2014. Poisoning by *Ipomoea asarifolia* in lambs by the ingestion of milk from ewes that ingest the plant. *Toxicon*. 92:129-132.
- Medeiros R.M.T.M. 1994. Veiculação do princípio tóxico de *Crotalaria spectabilis* (Roth) em leite de cabra e rata: uma avaliação toxicológica. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 143p.
- Paraguassu A.A. 1983. Intoxicação experimental por *Mascagnia rigida* Grisebach (Malpighiaceae) em caprinos no Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal. Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí. 65p.
- Santos-Barbosa J.M., Lee S.T., Cook D., Gardner D.R., Viana L.H. & Ré N. 2017. A gas chromatography-mass spectrometry method for the detection and quantitation of monofluoroacetate in plants toxic to livestock. *J. Agric. Food. Chem.* 65(7):1428-1433.
- Silva, L.C.A., Pessoa, D.A.N., Lopes, R.G., Santos, J.R.S., Olinda, R.G. & Riet-Correa, F. 2017. Embryonic death and abortions in goats caused by the ingestion of *Amorimia septentrionalis*. *Pesq. Vet. Bras.* 37(12):1401-1404.
- Soares M.P., Pavarini S.P., Adrien M.L., Quevedo P.S., Schild A.L., Peixoto P.V., Farias da Cruz C.S. & Driemeier D. 2011. *Amorimia exotropa* poisoning as a presumptive cause of myocardial fibrosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(6):1223-1229
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p. 27-71.
- Vasconcelos J.S., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Medeiros R.M.T., Galiza G.J.N., Oliveira D.M. & Pessoa A.F.A. 2008. Intoxicação por *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos e caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10):521-526.

Quadro 1: Efeito da ingestão de colostro oriundo de cabras que consumiram ou não *Amorimia septentrionalis* durante a gestação, sobre os filhotes lactentes

Grupo	Cabra	Consumo da planta (dias)	Feto abortado	Natimorto	Nasceu vivo, morrendo em seguida	Morte após consumo de colostro	Vivo, mesmo após o consumo de colostro
Grupo 1 (1g/kg de folhas frescas)	1	22 ^a					
	2	8	1				
	3	28	1				
	4	30				2	
	5	29				2	
	6	28				1 ^b	
	7	28				1 ^b	
	8	32					2
Grupo 2 (1g/kg de folhas secas)	1	4		2			
	2	2		2			
	3	5		2			
	4	4		1			
	5	5		2			
	6	4		2			
	7	5			2 ^c		
	8	5			1 ^c		
	9	0					2
	10	0					1
Grupo 3 (Controle)	1	0					2
	2	0					1
	3	0					2
	4	0					2
	5	0					2
	6	0					2
	7	0					1
	8	0					1

^a Apresentou sinais clínicos de intoxicação e foi submetida à eutanásia *in extremis*.

^b cabritos que nasceram durante à noite e foram encontrados mortos no dia seguinte. Observado colostro no abomaso e aeração pulmonar durante a necropsia.

^c Cabritos encontrados mortos e, na necropsia, foi observado ar nos pulmões, indicando que nasceram vivos.

CAPÍTULO III

Fitotoxinas eliminadas através do leite: uma revisão

Artigo aceito para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira (Qualis – A2)

Fitotoxinas eliminadas através do leite: uma revisão¹

José Radmácyo G. Lopes^{2*}, Franklin Riet-Correa³ e Rosane M.T. Medeiros²

ABSTRACT.- Lopes J.R.G., Riet-Correa F. & Medeiros R.M.T. 2018. [**Phytotoxins eliminated by milk: a review.**] Fitotoxinas eliminadas através do leite: uma revisão. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Avenida Universitária S/N, Bairro Santa Cecília, Patos-PB 58780-110, Brasil. E-mail: macyo_mv@hotmail.com

Milk is a complex mixture of lipids suspended in aqueous protein solution that can be a carrier of various contaminants, but generally it is not an important route of toxic excretion. The main problem is the repeated exposure, as occurs with ingestion of toxic plants, and their potential danger to animals that consume the milk. The phytotoxins already reported as being eliminated by milk, causing damage to the health include: indolizidine alkaloids, causing storage of oligosaccharides disease; piperidine alkaloids, causing acute poisoning or malformations; pyrrolizidine alkaloids, which cause hepatic lesions; quinolizidine alkaloids, as a cause of skeletal defects; glucosinolates, which cause changes in the thyroid; tremetol (or tremetone), which causes, in animals, a disease characterized by tremors, and, in humans, milk sickness; sodium monofluoroacetate, which causes the death of kids after the ingestion of colostrum from goats that ingested *Amorimia septentrionalis* during gestation; ptaquiloside, which induces carcinogenesis in animals that ingest milk or derivatives, produced by animals that ingested *Pteridium* spp. *Ipomoea asarifolia*, which contains indole diterpenes cause tremors in breastfeeding pups. *Chrysocoma ciliata* cause alopecia in lactating pups, however its toxic compound is still unknown. Knowledge about of the risk of exposure to these substances by milk is important for animal and human health.

INDEX TERMS: Toxic plants, phytotoxins, elimination by milk.

¹Recebido em

Aceito para publicação em

²Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Avenida Universitária S/N, Bairro Santa Cecília, Patos-PB 58780-110, Brasil. *Autor para correspondência: macyo_mv@hotmail.com.

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Colonia Uruguay.

RESUMO.- O leite é uma mistura complexa de lipídeos suspensos em solução aquosa de proteínas e pode ser veículo de diversos contaminantes, mas, geralmente, não é uma importante via de excreção de tóxicos. O principal problema é a exposição repetida, como ocorre com a ingestão de plantas tóxicas, e seu potencial perigo para os animais que consomem o leite. As Fitotoxinas já descritas, que são eliminadas através do leite e podem causar danos à saúde incluem: alcaloides indolizidínicos, causam a doença do armazenamento de oligossacarídeos; alcaloides piperidínicos, que causam intoxicação aguda, pela sua capacidade de dessensibilizar os receptores nicotínicos da acetilcolina, ou malformações; alcaloides pirrolizidínicos, que provocam alterações hepáticas; alcaloides quinolizidínicos, que causam defeitos esqueléticos; glucosinolatos, que provocam alterações na tireóide; tremetol (ou tremetone), que provoca, em animais, uma doença caracterizada por tremores, e em humanos, a doença conhecida como doença do leite; monofluoracetato de sódio, que causa a morte de filhotes após a ingestão do colostro de fêmeas que ingeriram *Amorimia septentrionalis* durante a gestação; ptaquilosídeo, que induz a carcinogênese em animais que ingerem leite ou derivados, produzidos por animais que ingeriram *Pteridium* spp. *Ipomoea asarifolia* contem indol diterpenos que causam tremores em filhotes lactentes. *Chrysocoma ciliata* causa alopecia em filhotes lactentes, porém seu princípio ativo tóxico ainda é desconhecido. O conhecimento e a divulgação sobre o risco da exposição a essas substâncias eliminadas através do leite são importantes tanto para a saúde animal quanto para a saúde humana.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, fitotoxinas, eliminação através do leite.

INTRODUÇÃO

Por definição, o leite é o produto integral da ordenha total ou ininterrupta de uma fêmea leiteira sadia, bem nutrida e não fatigada; sendo, em média, formado por 1/8 de substância sólida (gordura, lactose, proteínas e sais minerais) e 7/8 de água (Valsechi 2001).

O leite pode ser veículo de diversos contaminantes, como microrganismos, toxinas, resíduos de antibióticos, antiparasitários e pesticidas organoclorados (Heck et al. 2007). A contaminação do leite pode ocorrer antes da ordenha (forma indireta), seja por algum patógeno que infecta o animal, fármaco utilizado ou substâncias presentes na alimentação (Fink-Gremmels 2008); ou durante ou após a ordenha (forma direta),

podendo ocorrer desde a contaminação pelas mãos do ordenhador ou maquinário utilizado na ordenha até o processo final de industrialização (Pereira 2011).

Sendo uma mistura complexa de lipídeos suspensos em solução aquosa de proteínas, o leite não é uma importante via de excreção de tóxicos. Entretanto, dependendo da concentração de toxina no sangue, da capacidade de um xenobiótico difundir-se através da membrana celular, de sua afinidade por certos constituintes do leite, da eficiência das principais rotas de desintoxicação e excreção (fígado, urina, fezes, etc.) e especificamente da lipofilicidade e basicidade do tóxico, do tipo de toxina vegetal e seus metabólitos, as toxinas podem ser irreversivelmente excretados pelo leite (Panter et al. 1988).

O leite pode conter xenobióticos que variam de compostos polares a compostos lipofílicos; no entanto, a eliminação de uma toxina depende da sua meia-vida na água do corpo. As meias-vidas da maioria das substâncias polares e dos compostos lipofílicos rapidamente metabolizados no leite geralmente são curtas porque essas toxinas são excretadas rapidamente pelas principais rotas de excreção. Assim, a percentagem da quantidade total de tais compostos que é eliminada no leite é bastante pequena. O principal problema é a exposição repetida, como ocorre com a ingestão de plantas tóxicas e seu potencial perigo para os animais que consomem o leite. Alguns princípios tóxicos são excretados prontamente no leite; estes incluem aqueles de alta solubilidade em gordura, que estão concentrados na porção lipídica do leite. Esses xenobióticos lipofílicos têm meias-vidas biológicas longas e frequentemente são detectados no leite nas concentrações mais altas e por períodos de tempo mais longos (Mathews 1980).

A eliminação de substâncias tóxicas de plantas através do leite é benéfica para animais em lactação que ingerem toxinas; no entanto, o consumo de leite proveniente de animais intoxicados pode induzir intoxicação em seres humanos ou animais em amamentação. A intoxicação pode ser mais grave em animais lactentes do que nos animais em lactação, porque a toxina pode ser concentrada no leite e o neonato possui pouca capacidade para eliminar ou desintoxicar xenobióticos (Panter & James 1990).

Devido à importância do leite em saúde pública e segurança alimentar, é importante a necessidade de determinar os xenobióticos e, em particular, das fitotoxinas naturais eliminadas através do leite e seus derivados. Portanto, o presente trabalho é uma revisão sobre as principais fitotoxinas eliminadas pelo leite e seu perigo potencial para os seres humanos e para os animais em amamentação.

REVISÃO DE LITERATURA

Fitotoxinas eliminadas pelo leite

Alcaloides Indolizidínicos

A principal toxina desse grupo, denominada swainsonina, foi identificada pela primeira vez em *Swainsona canescens* (Colegate et al. 1979) e mais tarde em *Oxytropis serecia* e *Astragalus lentiginosus* (Molyneux & James 1982). No Brasil, é encontrada principalmente em *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Oliveira et al. 2009), *Ipomoea riedelii*, *Ipomoea sericophyla* (Barbosa et al. 2006), *Ipomoea marcellia* (*Ipomoea verbascoidea*) (Mendonça et al. 2012), *Turbina cordata* (Dantas et al. 2007) e *Sida carpinifolia* (Driemeier et al. 2000).

A swainsonina inibe a atividade das enzimas α -manosidase lisossomal e α -manosidase II do aparelho de Golgi (Dantas et al. 2007) resultando no acúmulo lisossomal de oligossacarídeos incompletamente processados e perda da função celular seguida de morte da célula (Riet-Correa et al. 2009) causando doença do armazenamento de oligossacarídeos (Mendonça et al. 2012).

Independente da palatabilidade, animais que começam a ingerir essas plantas desenvolvem o hábito de ingeri-las compulsivamente e, por um mecanismo de facilitação social, induzem outros animais da mesma espécie a ingeri-las. Em animais intoxicados, os principais sinais clínicos são nervosos e incluem ataxia, hipermetria, marcha lateral, paresia espástica, tremores de intenção e posição com base ampla; podem apresentar também sonolência, depressão, anorexia, emagrecimento progressivo e pelos arrepiados (Dantas et al. 2007; Riet-Correa et al. 2009). A intoxicação tem curso crônico e os animais podem sobreviver por vários meses após o início dos sinais clínicos. Se os animais deixam de ingerir essas plantas no início dos sinais nervosos ou mesmo 15-30 dias após, os sinais são reversíveis (Riet-Correa et al. 2009). Histologicamente caracteriza-se por distensão e vacuolização no pericário de neurônios, principalmente das células de Purkinje do cerebelo (Oliveira et al. 2009).

Através de uma série de experimentos após uma única exposição oral à swainsonina (*Oxytropis serecia*) para vacas e ovelhas lactantes (0,8 e 2,0 mg de swainsonina por kg de peso corporal, respectivamente), a toxina foi observada no leite de ambas as espécies e confirmada por quantificação (Taylor & Strickland 2002). James & Hartley (1977) alimentaram bezerros, cordeiros e gatos filhotes com leite de vacas que ingeriram *A. lentiginosus*. Posteriormente, esses filhotes apresentaram lesões microscópicas características da intoxicação provocada por essa planta, marcada por vacuolização

espumosa citoplasmática neurovisceral; a quantidade de aspartato aminotransferase sérica também encontravam-se aumentadas.

Alcaloides Piperidínicos

As toxinas mais comuns desse grupo são encontradas em *Conium maculatum* que causam alterações esqueléticas em bezerros, leitões e cordeiros nascidos de fêmeas que ingeriram essas toxinas em determinados estágios da gestação (Panter et al. 1988). Talvez o primeiro exemplo notável de intoxicação por um membro desse grupo tenha sido a morte de Sócrates em 399 a.C. De acordo com o famoso relato de Platão em *Phaedo*, o filósofo ingeriu *C. maculatum*, planta que contém altas concentrações de coniina e γ -coniceína (Raynolds 2005).

Em humanos, a nicotina contida no Tabaco doméstico (*Nicotiana tabacum*) tem sido responsabilizada pela ocorrência de intoxicações agudas, cujas intensidades variam de leves a graves (Schep et al. 2009). Muitas outras plantas dos gêneros *Nicotiana*, *Lobelia*, *Pinus*, *Duboisia*, *Sedum*, *Withania*, *Carica*, *Hydrangea*, *Dichroa*, *Cassia*, *Prosopis*, *Genista*, *Ammodendron*, *Lupinus*, *Liparia* e *Collidium* também contêm alcaloides piperidínicos (Keeler & Crowe 1985).

O consumo de plantas com altas concentrações de alcaloides piperidínicos pode produzir intoxicação aguda (Panter et al. 1999), caracterizada por micção e defecação frequente, taquicardia, fraqueza muscular, fasciculações musculares, ataxia, colapso e, finalmente, morte devido a falha respiratórias (Panter et al. 1998).

As intoxicações agudas produzidas pelos alcaloides piperidínicos são atribuídas a sua capacidade de dessensibilizar os receptores nicotínicos da acetilcolina (Green et al. 2010) e à inibição da condução de cátions (Na^+ , Ca^{2+} e K^+). Através de suas ações na junção neuromuscular, por exemplo, os alcaloides provocam fasciculações transitórias na musculatura esquelética, que são rapidamente seguidos por paralisia, progredindo para insuficiência respiratória (Arias 2000).

Muitas plantas desses gêneros são consumidas direta ou indiretamente por seres humanos e animais e algumas são usadas na medicina humana. Os alcaloides piperidínicos podem ser eliminados no leite, colocando em risco de toxicidade os jovens lactentes e também em risco teratogênico as mulheres grávidas que consomem este leite. Poucos casos foram relatados de transferência de alcaloide piperidínicos no leite, mas talvez isso se deva à falta de investigação (Panter & James 1990).

Em 1980, foi relatado um incidente em que vacas leiteiras foram alimentadas com feno contendo aproximadamente 60% de *C. maculatum*, intoxicando 160 vacas em lactação e 66 novilhas. Posteriormente, 10 vacas e 14 novilhas morreram, e outras 14 vacas e 12 novilhas foram abatidas (Kubic et al. 1980). Os alcaloides piperidínicos foram detectados usando cromatografia em camada delgada e o odor típico de *C. macularum* foi detectado no leite e na urina das vacas. Para evitar perigo para os seres humanos, o leite obtido por um período de vários dias foi descartado. (Panter & James 1990).

Alcaloides Pirrolizidínicos

Alcaloides pirrolizidínicos são fitoquímicos de ocorrência natural em cerca de 6.000 espécies de plantas de diversos gêneros e famílias (Smith & Bababunmi 1980).

São hepatotoxinas que causam danos irreversíveis ao fígado e muitas podem ter ação carcinogênica. A maioria das plantas que contêm alcaloides pirrolizidínicos ocorre em três famílias: Boraginaceae, Compositae e Leguminosae. *Senecio brasiliensis* (Compositae) e *Crotalaria* spp. (Leguminosae) são as principais plantas relacionadas à intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos no Brasil (Cheeke 1998).

Em animais domésticos, a intoxicação por plantas que contenham alcaloides pirrolizidínicos deve-se principalmente a ingestão dessas quando há escassez de pastagens ou através do consumo prolongado de feno ou grãos contaminados com essas plantas, pois esses compostos têm ação acumulativa (McLean 1970), podendo causar uma variedade de sintomas, incluindo hepatotoxicidade, carcinogenicidade, genotoxicidade e pneumotoxicidade (Boppré 2011).

Esses alcaloides por si só não apresentam toxicidade, porém se tornam tóxicos quando biotransformados pela enzima monooxigenase hepática a uma forma altamente reativa, conhecida como pirrol (Prakash et al. 1999). A toxicidade dos pirrois está relacionada com sua alta reatividade, agindo como agentes alquilantes e ligando-se facilmente às moléculas de DNA. Além disso, os pirrois atuam inibindo a mitose nos hepatócitos, levando a megalocitose, necrose e, conseqüentemente, redução do número de hepatócitos, os quais são substituídos por tecido conjuntivo fibroso, dando início ao quadro clínico e a morte, devido à disfunção hepática (Santos et al. 2008). Parte dos pirrois pode escapar para a circulação geral, causando lesões em outros tecidos, como, por exemplo, renal e pulmonar (Radostits et al. 2002).

A intoxicação natural pode ocorrer de forma aguda ou crônica e é caracterizada principalmente por apatia, anorexia, ascite, icterícia, fotossensibilização, incoordenação, agressividade e pressão da cabeça contra objetos (Lucena et al. 2010).

Para determinar a transferência de alcaloides pirrolizidínicos através do leite, Medeiros et al. (1999) alimentaram uma cabra com sementes de *Crotalaria spectabilis*, que contém o alcaloide pirrolizidínico monocrotalina, e o seu leite foi incorporado, durante 60 dias, à dieta de ratos jovens que, ao final do experimento, demonstraram um menor ganho de peso e lesões pulmonares e hepáticas, quando comparados com o grupo controle. Goeger et al. (1982) alimentaram cabras em lactação com *Senecio jacobaea* e utilizaram, por um período prolongado, seu leite na alimentação de ratos, observando, ao final do experimento, leves patologias hepáticas nos ratos.

Alcaloides Quinolizidínicos

Amplamente distribuídos entre as leguminosas, que os utilizam como defesa contra predadores, pois concentrações elevadas desses alcaloides produzem um sabor amargo, limitando o seu consumo. O gênero *Lupinus* é o mais rico nesse tipo de alcaloide. De maneira geral, as espécies de *Lupinus* têm sido utilizadas como forragem, adubo verde e alimento; na medicina popular, são utilizadas como agentes antitumoral, antidiabético, antioxidante e antifúngico (Galasso et al. 2006).

A Cistisina é um alcaloide quinolizidínico encontrado em uma árvore ornamental conhecida como Fio-de-ouro (*Laburnum anagyroides*) e em plantas do gênero *Cytisus* (Cheeke & Shull 1985) e suas sementes já causaram, em humanos e equinos, intoxicações caracterizadas por excitação, incoordenação, convulsões, coma e morte por asfixia (Kingsbury 1964).

Lupinus contém o alcaloide quinolizidínico anagirina, que é conhecido por causar defeitos esqueléticos e fenda palatina em bezerros quando suas mães ingeriram *Lupinus* sp., entre os dias 40 a 70 da gestação, mostrando-se como um alcaloide teratogênico (Keeler 1978).

Um estudo de caso de anormalidades esqueléticas em uma criança na Califórnia revelou que a principal fonte de leite consumida pela mãe durante a gravidez foi de cabras que haviam pastado em áreas com *Lupinus* abundantes (Ortega & Lazerson 1987). Entre o rebanho de cabras, várias tinham abortado espontaneamente e os fetos apresentavam defeitos esqueléticos semelhantes aos da doença do bezerro relatada por Keeler (1978). A mãe do bebê com malformação lembrou estar clinicamente doente em

várias ocasiões após a ingestão do leite de cabra. Outras evidências que implicam o leite das cabras que ingeriram *Lupinus* foram sugeridas depois que vários filhotes nascidos de uma cadela alimentada, durante a gestação, com o mesmo leite de cabra, apresentaram malformações semelhantes (Ortega & Lazerson 1987).

Glucosinolatos

Os glucosinolatos são glicosídeos de β -D-tioglicose que, após hidrólise pela enzima tioglicosidase, produzem isotiocianato, nitrito, tiocianato ou químicos semelhantes. Eles ocorrem na família Cruciferae, cuja maioria das espécies que contêm glucosinolatos e que são importantes na alimentação humana ou animal estão no gênero *Brassica*, que inclui repolho, brócolis, couve, mostarda, nabos e outros. Esses compostos são responsáveis pelo gosto desejável em condimentos, como molhos de mostarda e de rábano (Panter & James 1990).

A goitrina, glucosinolato presente em algumas espécies de plantas, inibe a função da tireoide e causa hiperplasia e hipertrofia da tireoide, inibindo a incorporação de iodo aos precursores de tiroxina, interferindo na secreção desse hormônio tireoidal; e seu efeito antitireoidiano não é corrigido pela adição de iodo à dieta. Os tiocianatos e isotiocianatos inibem a absorção de iodo pela tireoide, porém, esta condição pode ser tratada com níveis aumentados de iodo (Panter & James 1990). Os nitritos formados a partir de glucosinolatos são tóxicos, causando baixo crescimento, lesões no fígado e nos rins, hiperplasia dos ductos biliares e necrose hepática (Paik et al. 1980).

Os glucosinolatos e seus derivados podem ser transferidos para o leite de animais em lactação, causando aumento da tireoide em animais jovens ou em humanos que ingerem o leite; a transferência placentária destes compostos também pode ocorrer. Throckmorton et al. (1981) observaram bócio e hormônios da tireoide séricos alterados em cordeiros recém-nascidos de ovelhas alimentadas com *Limnanthes alba*. Em outro experimento, White & Cheeke (1983) alimentaram cabras com *L. alba* 12 a 13 semanas antes do parto. Ao nascerem, os cabritos apresentaram níveis séricos de hormônios tireoidianos semelhantes aos cabritos do grupo controle, porém, ao desmame, apresentaram níveis séricos de hormônios tireoidianos mais baixos e crescimento corporal significativamente menor quando comparados aos animais do grupo controle. Nesse mesmo experimento, o leite das cabras que receberam a planta foi utilizado como alimento para coelhos em crescimento, e estes apresentaram tireóides mais pesadas e

maior mortalidade do que os coelhos que receberam o leite das cabras do grupo controle.

Tremetol (ou Tremetone)

Esta toxina é encontrada na planta white snekeroot (*Eupatorium rugosum*) (Panter & James 1990), herbácea perene que cresce geralmente em áreas baixas e úmidas, próximas a córregos e em florestas abertas. Durante o período seco, quando outras forragens se tornam escassas, é provável que os animais se movam para áreas arborizadas e consumam a planta. Muitas vezes esta planta fica verde e suculenta no final do outono, porque é protegido da geada em seu habitat florestal (Cheeke 1998).

Depois de consumir *E. rugosum* por vários dias, o gado fica deprimido e desenvolve uma condição conhecida como Tremor, na qual há tremores musculares ao redor do pescoço, ombros e pernas. Os animais adotam uma posição curvada; muitas vezes há o odor de acetona na respiração, respiração ofegante, incontinência urinária e constipação. Os animais afetados podem se recuperar, embora possa haver um longo período de inapetência e fraqueza muscular. Em intoxicações graves, prostração e morte podem ocorrer (Cheeke 1998).

O tremetol pode ser transferido através do leite. Os animais lactantes parecem ser menos suscetíveis a intoxicação do que os animais não lactantes, devido à sua capacidade de eliminar essa toxina através do leite (Das et al. 2007).

A toxina pode ser transferida para o homem através do leite de vaca, produzindo uma doença debilitante chamada doença do leite. Os sintomas são fraqueza, náusea, prostração, cetose, delírio, coma e morte. No passado, às vezes, a doença atingia proporções epidêmicas, e aldeias inteiras eram abandonadas por causa da doença do leite. Diz-se ser responsável pela morte da mãe de Abraham Lincoln que, por muitos anos, permaneceu com causa desconhecida; até que no início dos anos 1900, constatou-se ser devido à toxina presente em *E. rugosum* (Cheeke 1998).

Os sinais clínicos tipicamente se iniciam de 2 dias a 3 semanas após a ingestão da planta. Embora as técnicas modernas de tratamento do leite e manejo das pastagens tenham reduzido completamente o risco da doença do leite, casos ocasionais podem ocorrer a partir de leite produzido em pequenas propriedades, sem o devido tratamento ou pela falta de controle de ervas daninhas (Beier & Norman 1990).

Os mesmos constituintes tóxicos também são encontrados em *Haplopappus heterophyllus* (Kingsbury 1964), que é uma planta perene, alta e ereta, comum em

pastagens secas no sul do Colorado, Texas, Novo México e Arizona, geralmente encontrada ao longo de canais de irrigação, valas e vales fluviais. Perdas significativas de animais de pastoreio ocorreram em várias partes do sudoeste dos Estados Unidos, como resultado do consumo desta planta. Os sinais clínicos são como na intoxicação por *E. rugosum*, com tremores como sinal predominante. A ingestão da planta verde na proporção de 1-1,5% do peso corporal, por 1-3 semanas, pode causar toxicidade em equinos, bovinos e ovinos (Cheeke 1998).

Monofluoracetato de Sódio

O monofluoracetato de sódio é uma potente toxina de ocorrência natural em mais de 50 espécies de plantas encontradas na África, Austrália e América do Sul (Lee et al. 2014). No Brasil, são conhecidas 12 espécies, pertencentes às famílias Rubiaceae, Bignoniaceae e Malpighiaceae, que causam a síndrome da morte súbita associada ao exercício (Carvalho et al. 2009) e o monofluoracetato de sódio (MF) foi identificado como agente tóxico que causa esta síndrome. Devido à sua toxicidade aguda, as espécies *Palicourea marcgravii*, *Palicourea aeneofusca* e *Amorimia septentrionalis* estão entre as mais importantes plantas tóxicas para ruminantes no país (Tokarnia et al. 2012).

Há relatos de surtos de intoxicação por essas plantas em ovinos e caprinos no estado da Paraíba (Vasconcelos et al. 2008). Os sinais clínicos observados em caprinos experimentalmente intoxicados são dispneia, taquicardia e decúbito esternal evoluindo para decúbito lateral com movimentos de pedalagem, seguida de morte. Alguns animais menos afetados se recuperam (Paraguassu 1983). Adicionalmente, a ingestão de *A. septentrionalis* durante a gestação, provoca mortalidade embrionária e abortos em caprinos (Silva et al. 2017).

Após produtores de caprinos e ovinos mencionarem que cabritos e cordeiros, nascidos de mães que pastejaram em áreas com plantas do gênero *Amorimia* durante a gestação, morrem subitamente após a ingestão do colostro, sugerindo que o MF pode ser excretado pelo leite, Vasconcelos et al. (2008), forneceram *A. septentrionalis*, na dose de 2g de planta fresca por kg de peso vivo, para duas cabras prenhes; um cabrito de uma das cabras morreu cinco minutos após ter ingerido o colostro. Já Lopes et al. (2018) forneceram 1g de planta fresca por kg de peso vivo, para oito cabras durante a gestação. Quatro cabritos, nascidos de duas cabras, receberam colostro e, após 15 minutos, apresentaram depressão, respiração ofegante, decúbito lateral, berros e morte;

e dois cabritos, oriundos de duas cabras que pariram durante à noite, foram encontrados mortos e, na necropsia, o colostro presente no abomaso de ambos os cabritos, indicam que morreram após ingerir o colostro.

Ptaquilosídeo

Descrito como o princípio mais tóxico encontrado em *Pteridium arachnoideum* (*P. aquilinum*), planta conhecida popularmente como samambaia do campo ou simplesmente samambaia, o ptaquilosídeo é capaz de atuar como agente carcinogênico (Alvarenga 2015).

A samambaia é uma planta invasora e bem-sucedida em termos de adaptação. A única limitação quanto a sua distribuição são temperaturas extremamente frias (Rasmussen 2003). No Brasil, pastagens invadidas por samambaia já foram registradas em todos os estados (Tokarnia et al. 2012).

O ptaquilosídeo foi identificado como um glicosídeo norsesquiterpeno, composto amorfo, incolor de fórmula $C_{20}H_{20}O_8$, é encontrado em todas as estruturas da planta, sendo o ápice do broto a parte aérea da planta que concentra a maior quantidade desse composto (Niwa et al. 1983). O ptaquilosídeo atravessa as membranas celulares e, no núcleo, é capaz de associar-se às proteínas com terminais amino expostos, como o DNA (Alonso-Amelot & Avendaño 2002) causando alterações permanentes em genes que codificam a ativação de outros, ou que têm função reguladora como, por exemplo, a regulação da apoptose e a supressão de tumores (Santos 1992).

O efeito tóxico e/ou carcinogênico da samambaia varia em função da quantidade ingerida, do tempo de ingestão da planta e da espécie animal envolvida (Tokarnia et al. 2012), podendo causar diátese hemorrágica, hematúria enzoótica bovina e carcinomas do trato digestivo superior; ocasionalmente podem ser observadas a ocorrência da deficiência de tiamina, tumores intestinais e degeneração progressiva da retina (Cruz & Bracarense 2004).

Alonso-Amelot et al. (1998) forneceram samambaia a seis vacas em lactação, na quantidade de 6kg/animal/dia; 38 horas após o início do consumo da planta, $8,6 \pm 1,16\%$ da quantidade de ptaquilosídeos contido na planta foi identificado no leite. Já Alvarenga (2015), utilizou 30% do queijo produzido a partir do leite de vacas que ingeriram até 6g/kg/dia de samambaia, na produção de ração que alimentaram ratos por 176 dias. Ao final do experimento, o exame histopatológico revelou que os animais que se alimentaram de ração contendo queijo de vacas que receberam samambaia,

desenvolveram lesões pré-neoplásicas (hiperplasia/displasia) no estômago, intestino e bexiga, sugerindo que o consumo indireto de ptaquilosídeo através do leite pode induzir à carcinogênese.

Estudos demonstram que, mesmo após o processo de pasteurização, parte da quantidade de ptaquilosídeo permanece no leite; e que existe correlação positiva entre a maior prevalência de câncer gástrico no homem e sua permanência em áreas invadidas pela samambaia (Alonso-Amelot & Avendaño 2002).

Indol diterpeno

Ipomoea asarifolia R. et Schult., é uma planta herbácea prostrada ou trepadeira, pertencente à família Convolvulaceae (Tokarnia et al. 2012). É nativa das Américas do Sul e Central. No Brasil, é muito comum nas regiões Amazônica e Nordeste, e ao longo da costa, desde a região Nordeste até a região Sudeste (Kissmann & Groth 1992).

I. asarifolia causa intoxicação em bovinos, ovinos, caprinos e búfalos, especialmente durante a época seca, quando há escassez de forragem. O principal sinal clínico nas diferentes espécies é o tremor muscular que, iniciando-se na cabeça, é caracterizado por movimentos laterais contínuos (tremores de intenção). Quando os animais são movimentados ou assustados, os tremores aumentam, se generalizam por todo o corpo, podendo haver perda de equilíbrio e quedas (Riet-Correa et al. 2003).

Em ovinos, a intoxicação foi observada em cordeiros lactentes que permaneciam confinados, sem ingerir a planta, enquanto suas mães ingeriam a planta no campo, porém sem demonstrar sinais de intoxicação, sugerindo que o princípio ativo da planta era eliminado através do leite (Araújo et al. 2008). Inicialmente, essa hipótese foi confirmada em camundongos, quando fêmeas recém-paridas passaram a ingerir ração contendo 20% de folhas de *I. asarifolia* e, após dois dias de consumo, os filhotes lactentes apresentaram tremores caracterizados principalmente por movimentos laterais da cabeça, intensificados quando os filhotes eram movimentados. Os filhotes se recuperaram 4-7 dias após o desmame (Lopes et al. 2014). Lucena et al. (2014) também demonstraram, porém em ovinos, que o princípio tóxico de *I. asarifolia* é eliminado pelo leite de fêmeas lactantes, quando observaram em 50% dos filhotes que, apesar de mantidos confinados, apresentaram tremores após ingerirem o leite de ovelhas que pastejavam em áreas onde a planta estava presente ou que recebiam 20% de folhas secas de *I. asarifolia* na ração. Os sinais clínicos desapareceram entre 1-4 semanas após o fim do consumo da planta pela mãe dos cordeiros lactentes.

Recentemente foi comprovado que *Ipomoea asarifolia* contem indol diterpenos (terpendol C, terpendol K, 6,7-dehydro-11-hydroxy-12,13-epoxy-terpendol A e paxilline) que causam tremores em camundongos (Gardner et al. 2018).

Outras fitotoxinas

Várias outras fitotoxinas ou seus metabólicos são eliminados pelo leite, como: mimosina (*Leucaena leucocephala*) (Ghosh et al. 2007), selenocompostos (Kenneth & McConnell 1948), colchicina (Hale 1999), Indol e 3-metilindol (Eisele 1986); porém representam pouco risco, pois a quantidade eliminada é insuficiente para causar intoxicação.

Fitotoxinas ainda não identificadas

Chrysocoma ciliata L. (Asteraceae)

Descrito como um arbusto denso e perene, com cerca de 500 mm de altura, *Chrysocoma ciliata* apresenta forma arredondada, folhas numerosas e pequenas, apresentando-se levemente pegajosas e amargas, ganhou o nome de “arbusto amargo”. *C. ciliata* é nativa do Sul do continente Africano, sendo considerada uma planta invasora; densas concentrações desta planta indicam a ocorrência de sobrepastoreio e degradação da área. O rebanho irá pastar grandes quantidades de arbusto amargo somente se as espécies mais palatáveis não estiverem disponíveis (Vahrmeijer 1981).

Esta planta está associada à alopecia em cordeiros cujas mães ingeriram a planta durante a gestação. A quantidade exata de planta que deve ser ingerida pelas ovelhas para que haja alopecia em suas crias ainda é desconhecida (Steyn 1931).

Steyn (1931) relatou que um cordeiro, cuja mãe recebeu 12,5 kg de *C. ciliata* seca, em 35 dias, desenvolveu alopecia e diarreia fatal.

A toxina não identificada é transmitida através do leite para os jovens, e isso explica porque os cordeiros ou cabritos afetados têm pelagens normais ao nascerem; porque os gêmeos, que ingerem menos leite, são menos suscetíveis a alopecia do que a prole individual; e porque o risco de alopecia pode ser reduzido pelo esvaziamento parcial dos úberes. Os cordeiros ou cabritos desenvolvem alopecia cerca de três a 14 dias após o nascimento, raramente mais tarde. Os primeiros sinais são prurido e arranhões ou mordeduras nas áreas afetadas, muitas vezes acompanhado pela deglutição dos pelos. O pelo se torna arrepiado e os tufos de lã podem ser facilmente arrancados. A perda de

pelos começa sobre os ombros e áreas laterais do corpo até que, eventualmente, o resto dos pelos só permaneçam nas extremidades (cauda, parte inferior dos membros, orelhas) e no topo da cabeça. Como resultado da exposição ao sol, as áreas sem pelos tornam-se vermelhas e sensíveis, seguidas de exsudação cutânea e formações de crostas. Outra complicação comum é a broncopneumonia em cordeiros, causada pela exposição a ventos frios. Não foram relatadas lesões macroscópicas primárias na pele das áreas sem pelos. A pele não pigmentada é notavelmente mais facilmente afetada do que as partes pigmentadas. A morbidade em fazendas afetadas pode variar de 1%, em anos secos, a 100% em anos extremamente chuvosos. A menos que os cordeiros sejam adequadamente tratados, pode-se esperar mais de 50% de mortalidade (Steyn 1931).

O tratamento mais indicado para os animais afetados é a proteção contra os raios solares e o vento, com a utilização de solução emoliente sobre as áreas sem pelo, para evitar o endurecimento da pele; e como medida preventiva, o sobrepastoreio em áreas onde a planta está presente, deve ser evitado (Steyn 1931).

CONCLUSÕES

A eliminação de fitotoxinas através do leite além de ser um problema para os animais de produção é também uma preocupação em saúde pública, uma vez que pode afetar direta ou indiretamente a saúde dos seres humanos. É importante o conhecimento e a divulgação sobre o risco da exposição a essas substâncias eliminadas através do leite para a saúde pública e veterinária.

REFERÊNCIAS

- Alonso-Amelot M.E., Castillo U., Smith B.L. & Lauren D.R. 1998. Excretion, through Milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. *Lait*. 78: 413-423.
- Alonso-Amelot M.E. & Avendaño M. 2002. Human carcinogenesis and bracken fern: review of the evidence. *Curr. Med. Chem.* 9(6):675-686.
- Alvarenga T.M.P. 2015. Avaliação clinicopatológica de ratos alimentados com queijo de leite de vacas que consumiram *Pteridium aquilinum*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 88 p.
- Araújo J.A.S., Riet-Correa F., Medeiros R.M.T., Soares M.P., Oliveira D.M. & Carvalho F.K.L. 2008. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em caprinos e ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 28:488-494.

- Arias H.R. 2000. Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem. Int.* 36:595–645.
- Barbosa R.C., Riet-Correa F., Medeiros R.M., Lima E.F., Barros S.S., Gimeno E.J., Molyneux R.J. & Gardner E.H. 2006. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *Toxicol.* 47:371-379.
- Beier R.C. & Norman, J.O. 1990. The toxic factor in White snakeroot: identity, analysis and prevention. *Vet. Hum. Toxicol.* 32:81-88.
- Boppré, M. 2011. The ecological context of pyrrolizidine alkaloids in food, feed and forage: an overview. *Food Addit. Contam.* 28(3):260–281.
- Carvalho G.D., Nunes L.C., Bragança H.B.N. & Porfírio L.C. 2009. Principais plantas tóxicas causadoras de morte súbitas em bovinos no estado do Espírito Santo - Brasil. *Arch. Zootec.* 58:87-98.
- Cheeke P.R. & Shull L. R. 1985. *Natural Toxicants in Feeds and Poisonous Plants*. AVI Publishing Company, Westport, p.492.
- Cheeke P.R. 1998. *Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants*. 2° ed. Interstate Publishes, Inc: Danville, Illinois, p.479.
- Colegate S.M., Dorling P.R. & Huxtable C.R. 1979. A spectroscopic investigation of swainsonine: an α -mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*. *Aust. J. Chem.* 32(10):2257-2264.
- Cruz G.D. & Bracarense A.P.F.R.L. 2004. Toxicidade da samambaia (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) para a saúde animal e humana. *Semina: Ciências Agrárias*. 25(3): 249-258.
- Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Gardner D.R., Medeiros R.M., Barros S.S., Anjos B.L. & Lucena R.B. 2007. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. *Toxicol.* 49(1):111-116.
- Das S., Manda G.P. & Tyagi, A.K. 2007. Milk toxicant of natural plant and feed mold origin: a review. *Indian Dairyman*. 59:27-37.
- Driemeier D., Colodel E.M., Gimeno E.J. & Barros S.S. 2000. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Vet. Pathol.* 37(2):153-159.
- Eisele G. R. 1986. Distribution of indole in tissues of dairy cattle, swine, and laying pullets. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37:246-252.

- Fink-Gremmels J. 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit. Contam.* 25(2):172-180.
- Galasso V., Przybył A.K., Christov V., Kovač B., Asaro F. & Zangrando E. 2006. Theoretical and experimental studies on the molecular and electronic structures of cytosine and unsaturated keto-sparteines. *Chem. Phys.* 325:365-377.
- Gardner D.R., Welch K.D., Lee S.T., Cook D. & Riet-Correa F. 2018. Tremorgenic indole diterpenes from *Ipomoea asarifolia* and *Ipomoea muelleri* and the identification of 6,7-Dehydro-11-hydroxy-12,13-epoxyterpendole A. *J Nat Prod.* 81(7):1682-1686.
- Goeger D.E., Cheeke P.R., Schmitz J.A. & Buhler D.R. 1982. Effect of feeding Milk from goats fed tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) to rats and calves. *Am. J. Vet. Res.* 43(9):1631-1633.
- Ghosh M.K., Atreja P.P., Buragohain R. & Bandyopadhyay S. 2007. Influence of short-term *Leucaena leucocephala* feeding on milk yield and its composition, thyroid hormones, enzyme activity, and secretion of mimosine and its metabolites in milk of cattle. *J. Agric. Sci.* 145:407–414.
- Green B.T., Lee S.T., Panter K.E., Welch K.D., Cook D., Pfister, J.A. & Kem W.R. 2010. Actions of piperidine alkaloid teratogens at fetal nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotoxicol. Teratol.* 32(3):383–390.
- Hale T.W. 1999. Medications and mothers' milk. *Pharmasoft Medical Publishing.* p.1096.
- Heck M.C., Santos J.S., Junior S.B., Costabeber I. & Emanuelli T. 2007. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Chem.* 102:288-294.
- James L.F. & Hartley W.J. 1977. Effects of milk from animals fed locoweed on kittens, calves and lambs. *Am. J. Vet. Res.* 38(8):1263-1265.
- Keeler R.F. 1978. Alkaloid teratogens from *Lupinus*, *Conium*, *Veratrum* and related genera. In: Keeler R.F., Van Kampen K.R. & James L.F. *Effects of Poisonous Plants on Livestock.* Academic Press, New York. pp 397-408.
- Keeler R. F. & M. W. Crowe. 1985. Anabasine, a teratogen from the *Nicotiana* species. In: Seawright A.A., Hegarty M.P., James L.F. & Keeler R.F. *Plant Toxicology.* Queensland Poisonous Plants Committee. Queensland, Australia, p.324-333.

- Kenneth B.Y. & McConnell P. 1948. Passage of selenium through the mammary glands of the white rat and the distribution of selenium in the milk proteins after subcutaneous injection of sodium selenate. *J. Biol. Chem*, 173:653-657.
- Kingsbury J.M. 1964. *Poisonous Plants of the United States and Canada*. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, p.626.
- Kissmann S. & Groth D. 1992. *Plantas infestantes e nocivas*. BASF Brasileira S.A., São Paulo, p. 978.
- Kubik M., Refholec J. & Zachoval Z. 1980. Outbreak of hemlock poisoning in cattle. *Veterinarstvi*. 30(4):157-158.
- Lee S.T., Cook D., Pfister J.A., Allen J.G., Colegate S.M., Riet-Correa F. & Taylor C.M. 2014. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. *J. Agric. Food Chem*. 62:7345-7354.
- Lopes J.R.G., Riet-Correa F., Cook D., Pfister J.A. & Medeiros R.M.T. 2014. Elimination of the tremorgenic toxin of *Ipomoea asarifolia* by milk. *Pesq. Vet. Bras*. 34(11):1085-1088.
- Lopes J.R.G., Araújo J.A., Pessoa D.A.N., Lee S., Riet-Correa F. & Medeiros R.M.T. 2018. Mortalidade neonatal associada ao monofluoroacetato de sódio em cabritos alimentados com colostro de cabras ingerindo *Amorimia septentrionalis*. *Pesq. Vet. Bras*. No prelo.
- Lucena R.B., Rissi D.R., Maia L.A., Flores M.M., Dantas A.F.M., Nobre V.M.T., Riet-Correa F. & Barros C.S.L. 2010. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras*. 30(5):447-452.
- Lucena K.F.C., Rodrigues J.M.N., Campos E.M., Dantas A.F.M., Pfister J.A., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. 2014. Poisoning by *Ipomoea asarifolia* in lambs by the ingestion of milk from ewes that ingest the plant. *Toxicon*. 92:129-132.
- Mathews, H. B. 1980. Elimination of toxicants and their metabolites. In: E. Hodgson and F. E. Gulhrrie (Ed.) *Introduction to Biochemical Toxicology*. Elsevier North Holland Inc., New York, p.175-176.
- McLean E.K. 1970. The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloides. *Pharmacol. Rev.* 22(4):429-483.
- Medeiros R.M.T., Gorniak S.L. & Guerra J.L. 1999. Effects of Milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 36(2):97-100.

- Mendonça F.S., Albuquerque R.F., Evêncio-Neto J., Freitas S.H., Dótia R.G., Boabaid F.M., Driemeier D., Gardner R.D., Riet-Correa F. & Colodel E.M. 2012. Alfa-mannosidosis in goats caused by the swainsonina-containing plant *Ipomoea verbascoidea*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24(1):90-95.
- Molyneux R.J. & James L.F. 1982. Loco intoxication: Indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Science* 216:190-191.
- Oliveira C.A. Barbosa J.D., Duarte M.D., Cerqueira V.D., Riet-Correa F., Tortelli F.P. & Riet-Corre G. 2009. Intoxicação por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) em caprinos na Ilha de Marajó, Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 29(7):583-588.
- Niwa, H. Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K., Hirono I. & Matsushita K. 1983. Ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Tetrahedron Lett.* 24(38)4117-4120.
- Ortega J.A. & Lazerson J. 1987. Anagryne-induced red cell aplasia, vascular anomaly, and skeletal dysplasia. *J. Pediatr.* 111:87-89.
- Paik I.K., Robblee A.R. & Clandinin D.R. 1980. Products of the hydrolysis of rapeseed glucosinolates. *Can. J. Anim. Sci.* 60:481-493.
- Panter K.E., Bunch T.D. & Keeler, R.F. 1988. Maternal and fetal toxicity of poison hemlock (*Conium macularum*) in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 49(2):281-283.
- Panter, K.E. & James, L.F. 1990. Natural plant toxicants in milk: a review. *J. Anim. Sci.* 68:892-904.
- Panter K.E., Gardner D.R. & Molyneux, R.J. 1998. Teratogenic and fetotoxic effects of two piperidine alkaloid-containing lupines (*L. formosus* and *L. arbustus*) in cows. *J. Nat. Toxins.* 7(2)131–140.
- Panter K.E., James L.F. & Gardner, D.R. 1999. Lupines, poison-hemlock and *Nicotiana* spp. toxicity and teratogenicity in livestock. *J. Nat. Toxins.* 8:117–134.
- Paraguassu A.A. 1983. Intoxicação experimental por *Mascagnia rigida* Grisebach (Malpighiaceae) em caprinos no Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí. 65p.
- Pereira D.A. 2011. Fatores impactantes na qualidade do leite de tanques comunitários na microrregião de Juiz de Fora-MG. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. 112 p.
- Prakash A.S., Pereira T.N., Reilly P.E. & Seawright A.A. 1999. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat. Res.* 443(1-2):53-67.

- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchliff K.W., Arundel J.H., Figueiredo C., Jacobs D.E., Leslie B.O., McKenzie R.A. & Bildfell, R.J. 2002. Clínica veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Guanabara, Rio de Janeiro. p.1737.
- Rasmussen L.H. 2003. Ptaquiloside an environmental hazard? Occurrence and fate of a Bracken (*Pteridium* sp.) toxin in terrestrial environments. Tese de Doutorado, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark. p.124.
- Reynolds T. 2005. Hemlock alkaloids from Socrates to poison aloes. *Phytochemistry* 66(12):1399–1406.
- Riet-Correa F., Tabosa I.M., Azevedo E.O., Medeiros R.M.T., Simões S.V.D., Dantas A.F.M., Alves C.J., Nobre V.M.T., Athayde A.C.R., Gomes A.A. & Lima E.F. 2003. Doenças dos ruminantes e equinos no semi-árido da Paraíba. *Semi-árido em Foco*. p.58-60.
- Riet-correa F., Medeiros R.M.T., Pfister J.A., Schild, A.L. & DantaS A.F.M. 2009. Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian livestock. Pallotti: Santa Maria. p.246.
- Santos R.C., Brasileiro Filho G. & Silva M.E. 1992. Tumorigenicity of boiling water extract of bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 12:72-76.
- Santos J.C.A., Riet-Correa F., Simões S.V.D., Barros C.S.L. 2008. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 28(1):1-14.
- Schep L.J., Slaughter R.J. & Beasley D.M. 2009. Nicotinic plant poisoning. *Clin. Toxicol.* 47(8)771-781.
- Silva L.C.A., Pessoa D.A.N., Lopes J.R.G., Santos J.R.S., Olinda R.G. & Riet-Correa F. 2017. Embryonic death and abortions in goats caused by the ingestion of *Amorimia septentrionalis*. *Pesq. Vet. Bras.* 37(12):1401-1404.
- Smith R.L. & Bababunmi E.A. 1980. *Toxicology in the Tropics*. Taylor and Francis Ltd, London. p.280.
- Steyn D.G. 1931. Investigations into the cause of alopecia (kaalsiekte) in kids and lambs. 17th Report of the Director of Veterinary Services and Animal Industry. p.729-756.

- Taylor J.B. & Strickland J.R. 2002. Appearance and disappearance of swainsonine in serum and Milk of lactating ruminantes with nursing Young following a singledose axposure to swainsonine (locoweed; *Oxytropis sericea*). J. Anim. Sci. 80:2476-2484.
- Throckmorton J.C., Cheeke P.R., Patton N.M., Arscott G.H. & Jolliff G.D. 1981. Evaluation of meadowfoam (*Limnanthes alba*) meal as a feedstuff for broiler chicks and weanling rabbits. Can. J. Anim. Sci. 61(3):735-742.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Dobereiner, J. 2012. Planta tóxicas do Brasil para animais de produção. 2. ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.29-71.
- Vahrmeijer J. 1981. Poisonous plants of southern Africa that cause stock loses. Tafelberg, Cape Town, p.168.
- Valsechi O.A. 2001. O leite e seus derivados. Universidade Federal de São Carlos. Araras, SP. p. 35. Vasconcelos J.S., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Medeiros R.M.T., Galiza G.J.N., Oliveira D.M. & Pessoa A.F.A. 2008. Intoxicação por *Mascagnia rigida* (*Malpighiaceae*) em ovinos e caprinos. Pesq. Vet. Bras. 28(10):521-526.
- White R.D. & Cheeke, P.R. 1983. Meadowfoam (*Limnunthes alba*) meal as a feedstuff for dairy goats and toxicologic activity of the milk. Can. J. Anim. Sci. 63(2):391-398.

CONCLUSÃO GERAL

O estudo das plantas tóxicas, dos seus constituintes e seus efeitos sobre os animais, é necessário para prevenir a intoxicação animal e as perdas econômicas geradas em sua decorrência. As pesquisas com plantas tóxicas e seus princípios ativos, na Medicina Veterinária, devem ser constantes, visando o aprimoramento diagnóstico, terapêutico, alimentar e de manejo dos animais; além de ter importância para saúde pública, quando há a possibilidade de contaminação humana a partir de produtos de origem animal.

ANEXOS

Toxicon

GUIDE FOR AUTHORS

. Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below. INTRODUCTION Official Journal of The International Society on Toxinology (<http://www.toxinology.org/>), Toxicon's "aims and scope" are laid down in the journal as:

To publish: articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms papers on novel findings related to the chemical, pharmacological, toxicological, and immunological properties of natural toxins molecular biological studies of toxin and other genes from poisonous and venomous organisms that advance understanding of the role or function of toxins clinical observations on poisoning and envenoming where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been obtained material on the use of toxins as tools in studying biological processes and material on subjects related to venomantivenom problems review articles on problems related to toxinology.

And To encourage the exchange of ideas, sections of the journal may be devoted to Short Communications, Letters to the Editor and activities of the International Society on Toxinology.

Toxicon strives to publish articles that are current and of broad interest and importance to the toxinology research community. Emphasis will be placed upon articles that further the understanding and knowledge of toxinology. Types of paper Full-Length Research Papers: Articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms.

Short Communications: Short communications differ from full manuscripts only in that the research study does not lend itself to an extended presentation. Even though brief, the Short communication should represent a complete, coherent and self contained study. The quality of Short Communications is expected to be as good as that of full articles, and both full articles and Short communications will be refereed in an identical

manner. The form is identical to that for a full article except that the report should not be divided into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. An abstract of not more than 75 words should be provided. The Short Communication may not be longer than five double-spaced typewritten pages (not including references, tables and figures) and should include not more than two tables or two figures or one of each.

Correspondence: These may be published if judged by the Editor to be of interest to the broad field of toxinology or of special significance to a smaller group of workers in a specialized field of toxinology. They should be headed 'Correspondence' which should be followed by a title for the communication. Names of authors and affiliations should be at the end of the letter.

Reviews and Short Reviews: Articles of interest to toxinologists which are published in journals other than *Toxicon* may be abstracted in the Reviews section of *Toxicon*. Readers who feel that a particular article or book should be abstracted in this section are encouraged to bring their opinions to the attention of one of the Review Editors. Mini-Reviews and proposals for mini-Reviews are welcome

Molecular Biology: Papers on molecular biological aspects of toxins are welcome. They can include cloning, expression, genetic and related studies. The papers must add to the understanding of the role or function of toxins. Papers providing cDNA sequences without any relevant conclusions are not acceptable. If cDNA sequences are included, authors must guarantee that the sequences will be deposited in a public gene bank before the publication of the paper in *Toxicon*.

There is another category of review articles which aims to educate and inform both the experienced scientist and new scientists entering the field of toxinology. These articles should serve as a reference guide for anyone using toxins. Please contact Dr. Ed Rowan with your suggestions for inclusion in this review article feature.

Case reports: *Toxicon* will publish clinical reports on poisoning where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been established. Please observe the following: Case Reports Guidelines. Submission checklist You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details: • E-mail address • Full postal address

All necessary files have been uploaded: Manuscript: • Include keywords • All figures (include relevant captions) • All tables (including titles, description, footnotes) • Ensure all figure and table citations in the text match the files provided • Indicate clearly if color should be used for any figures in print Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable) Supplemental files (where applicable)

Further considerations • Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked' • All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) • Relevant declarations of interest have been made • Journal policies detailed in this guide have been reviewed • Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center. BEFORE YOU BEGIN Ethics in publishing Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication. Conflict of Interest Toxicon follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: All third-party financial support for the work in the submitted manuscript. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded here, or at http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.) Submission declaration and verification
Submission of an article implies that the work described has not been published

previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck. Changes to authorship Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum. Article transfer service This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information. Copyright Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative

works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information. Elsevier supports responsible sharing Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online. Open access This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse. • An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution. Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs. • No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: Creative Commons Attribution (CC BY) Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as

to damage the author's honor or reputation. Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 3300, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>. Green open access Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 12 months. Language (usage and editing services) Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. **Referees** The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers. **PREPARATION NEW SUBMISSIONS** Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF

file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering— this is an essential peer review requirement. Figures and tables embedded in text Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

REVISED SUBMISSIONS Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the

abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Material and methods Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Experimental Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Experimental procedures

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>. Theory/calculation A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis. Results Results should be clear and concise. Discussion This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. Appendices If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc. Essential title page information • Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. • Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was

done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author. • Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. Abstract A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Graphical abstract Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service. Highlights Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 125 characters including spaces, or, maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples. Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American

spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Acknowledgements Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). Formatting of funding sources List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Footnotes Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Artwork Electronic artwork General points • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Preferred fonts: Arial (or Helvetica),

Times New Roman (or Times), Symbol, Courier. • Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming convention for your artwork files. • Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image. • For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage. • Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

- EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
- TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
- TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
- TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not

duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. **Reference links** Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper. **Web references** As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. **Data references** This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the

reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article. References in a special issue Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue. Reference management software Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/toxicon> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. Reference formatting There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: Reference style Text: All citations in the text should refer to: 1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; 2. Two authors: both authors' names and the year of publication; 3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown' List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Examples: Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of

writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304. Reference to a website: Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03). Reference to a dataset: [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations. Video Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. Supplementary material Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version.

Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page. **Data linking** If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). **Data in Brief** You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee is payable for publication in

Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief. MethodsX You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article. AudioSlides The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions. AFTER ACCEPTANCE Online proof correction Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission

from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop. Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover. AUTHOR INQUIRIES Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

Pesquisa Veterinária Brasileira

INSTRUÇÕES AOS AUTORES A submissão de artigos à revista “Pesquisa Veterinária Brasileira” (PVB) deve ser feita em Word, através do Sistema ScholarOne, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>

A tramitação somente pode ter início se o seu artigo estiver rigorosamente dentro das normas de apresentação da revista, de acordo com as Instruções aos Autores, o modelo no site da revista e os últimos fascículos publicados (www.pvb.com.br). Na verificação de falhas de apresentação, o artigo será devolvido aos autores para as devidas correções. Os autores podem submeter seus artigos em Inglês ou em Português, mas sempre com um Resumo em português. No caso de artigos aceitos, escritos em Português, estes serão traduzidos para o Inglês pela Editora Cubo; pois todos os artigos publicados na PVB serão em inglês. Para os artigos já submetidos em Inglês, os autores devem apresentar via ScholarOne um Certificado de Tradução de uma empresa habilitada ou de um Tradutor Nativo.

O pagamentos da taxa de publicação (Paper Charge) serão cobrados na ocasião do envio da comunicação de aceite por e-mail: (1) Artigos submetidos em inglês, R\$ 1.500,00 (US\$ 480.00) por artigo; (2) Artigos submetidos em português, R\$ 2.000,00 (US\$ 640.00) por artigo, incluindo as despesas com a tradução.

O texto deve ser formatado, em todos os pormenores, de acordo com as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br). Se o artigo for submetido fora das normas de apresentação, a tramitação somente ocorrerá após as devidas correções feitas pelo autor. A PVB publica Artigos Originais, Artigos de Revisão Crítica e Tópicos de Interesse Geral; não publica artigos com a denominação de Short Communications. Os Artigos Originais devem conter resultados de pesquisa ainda não publicados ou submetidos para outros periódicos. Artigos de Revisão de Literatura, submetidos a convite, devem constituir-se de análise crítica, de assuntos na área de experiência dos autores, isto é, quando os autores já tiverem publicado anteriormente artigos sobre o assunto. Os raros Tópicos de Interesse Geral devem constituir-se de assuntos de grande importância atual baseado na vasta experiência dos autores. As opiniões e conceitos emitidos nos artigos submetidos são de responsabilidade dos autores. O Conselho

Editorial da PVB, com a assistência da Assessoria Científica, pode sugerir ou solicitar modificações. Os artigos submetidos são avaliados pelos pares (peer review) e, aceitos para publicação com dois pareceres favoráveis, ou rejeitados por dois pareceres desfavoráveis. Os direitos autorais dos artigos aceitos para publicação permanecem com os autores.

1. Os artigos devem ser organizados em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (de preferência os últimos três separadamente), Agradecimentos e REFERÊNCIAS: a) O TÍTULO deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS. b) O(s) Autor(es) com numerosos primeiros nomes e sobrenomes, deve(m) padronizar o seu “nome para publicações científicas”, como por exemplo: Cláudio Severo Lombardo de Barros, escreve Cláudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.; Franklin Riet-Correa

Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F. Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores. O autor para correspondência deve ser um autor que garante o contato com o Conselho Editorial da PVB. Asteriscos de chamadas para o rodapé devem ser mais uma vez elevados (sobrescritos), para aparecerem maiores e mais nítidos. c) O Cabeçalho do ABSTRACT deve conter, além dos nomes dos autores abreviados invertidos, o ano, o TÍTULO, o endereço postal do laboratório (inclusive o CEP) ou instituição principal onde foi desenvolvida a pesquisa. Endereços postais brasileiros não devem ser traduzidos para o inglês, mesmo em artigos escritos na língua inglesa, a fim de evitar dificuldade na postagem. Devem-se conferir os nomes dos autores do artigo e do Cabeçalho do Abstract para evitar discrepâncias. d) O Rodapé da primeira página deve conter os endereços profissionais postais completos dos autores (evitando-se traços horizontais), na língua do país do respectivo autor (em português, espanhol, inglês) e seus e-mails; o e-mail do autor para correspondência deve ser sublinhado. Os sinais de chamada para os nomes dos autores devem ser números arábicos, colocados em sobrescrito, sem o uso automático de “Inserir nota de fim”, do Word (essas chamadas devem ser contínuas por todo artigo, isto é, em todas as notas de rodapé das outras páginas). e) O ABSTRACT deve ser uma versão do RESUMO, mas pode ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que devem incluir termos do título, por não se tratar somente de “ADDITIONAL INDEX TERMS”. f) O RESUMO

deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem termos do título, por não se tratar somente de “TERMOS DE INDEXAÇÃO ADICIONAIS”. g) A INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal e deve finalizar com a indicação do objetivo do artigo. h) MATERIAL E MÉTODOS deve reunir a totalidade dos dados que permitam o desenvolvimento de trabalho semelhante por outros pesquisadores. i) Em RESULTADOS devem ser apresentados concisamente os dados obtidos. j) Na DISCUSSÃO devem ser confrontados os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los. k) CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados obtidos e devem ser apresentados em diferentes parágrafos (uma Conclusão somente deve ser apresentada em parágrafo único). l) Os Agradecimentos não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé; devem ser sucintos e colocados antes da Lista de Referências. m) A Lista de REFERÊNCIAS deve incluir todas as citações apresentadas no texto e que tenham servido como fonte para consulta. A Lista deve ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores (em caixa alta e baixa), do ano, do título da publicação citada, e abreviado (por extenso em casos de dúvida) o nome do periódico. Sugerimos consultar exemplos dos últimos fascículos (www.pvb.com.br). (Notem: (1) As Referências citadas no texto devem ser colocadas em ordem cronológica, mas alfabética tratando-se de referências do mesmo ano; (2) Quando utilizados programas de formatação (p.ex. Endnote X7), remover o fundo automático cinzento antes da submissão, para não dificultar eventuais correções.

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas: a) Fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; página formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), texto corrido em uma coluna justificada, com as Legendas das Figuras no final (logo após a Lista de REFERÊNCIAS) sem repetir as legendas junto com as Figuras. b) ABSTRACT e RESUMO serão escritos em um só parágrafo corrente e não devem conter citações bibliográficas. c) A redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal. d) Os nomes científicos usados no manuscrito devem ser apresentados por extenso (p.ex. *Palicourea marcgravii*), no início de cada capítulo (TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO,

INTRODUÇÃO, etc.), quando aparecem pela primeira vez, seguido da abreviação do gênero (p.ex. *P. marcgravii*). e) Nos títulos dos Quadros e nas Legendas das Figuras os nomes científicos devem ser apresentados por extenso, já que estes são independentes do texto. f) No texto, os sinais de chamada para notas de rodapé devem ser números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word. Notem: para evitar a separação em duas linhas, os numerais devem ser apresentados junto com suas unidades, ou seja, sem espaçamento, por exemplo: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, (P<0,05), 15h; de conveniência quando seguida de letra alta (35 kg ou 35kg, 4 h ou 4h). A abreviação de número é “no” e não “no”; grau Celsius é “oC” e não “oC”. g) Os Quadros (não usar o termo Tabela) e as Figuras devem ser citados no texto, pelos respectivos números, em ordem crescente e devem ser submetidos separadamente do texto! h) Siglas e abreviações das instituições, ao aparecerem pela primeira vez, deverão ser colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso; i) Citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”, p.ex. (Caldas 2005); artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois (Pedroso & Pimentel 2013); e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano (Brito et al. 2015); se dois artigos não se distinguirem, a diferenciação será feita através do acréscimo de letra minúscula ao ano (Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação deve ser cronológica (Barbosa et al. 2003, Armién et al. 2004). j) Recomenda-se consultar na íntegra todos os artigos citados; se isto não for possível, deve-se colocar no texto a referência original (não consultada na íntegra) seguida do ano, p.ex. (Bancroft 1921); na Lista de Referências deve ser incluída a referência original como: Bancroft 1921. título. ... periódico. (Apud Suvarna & Layton 2013). A referência consultada também deve ser incluída na Lista de Referências. k) O uso de “comunicação pessoal” e de “dados não publicados” deve ser feito apenas em casos excepcionais; no texto com citação de Nome e Ano, e na Lista de Referências como: Barbosa 2016. Comunicação pessoal (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal). l) As Legendas das Figuras devem conter informações suficientes para sua compreensão (independente do texto); e devem ser precedidas de “Fig.” seguida do número sem espaço, p.ex. “Fig.8. ...”. Para elaboração das legendas sugerimos consultar exemplos nos últimos fascículos (www.pvb.com.br). (Notem: Na legenda de Figuras compostas deve-se colocar a letra de cada “subfigura” em negrito com parênteses claros

antes do texto correspondente e devem ser mencionados letras ou sinais, que estão dentro de cada “subfigura”, em parêntees e claros após o respectivo texto da legenda.) m) O Título dos Quadros devem ser em negrito, sem ponto, e a “garganta” (título das colunas) deve ser escrita em claro e separada por dois traços longos horizontais; o Título dos Quadros e da “garganta” devem ser escritas em caixa alta e baixa. Os Quadros (não usem o termo Tabela) devem conter os resultados mais relevantes. Não há traços verticais, nem fundos cinzentos; excepcionalmente pode conter traços horizontais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, com “a” em cada Quadro. As chamadas de rodapé deverão ser

lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda; e devem evitar números arábicos. Os títulos não têm ponto no final, ao passo que as legendas terminam com um ponto. Os Quadros devem ser apresentados em Word e ser editáveis, a fim de inserirmos eventuais alterações de apresentação, dentro das normas da revista. n) Dados complexos devem ser expressos por Gráficos (devem ser chamados de Figuras). Os gráficos devem ser produzidos em 2D, sem fundo e sem linhas horizontais.

3. Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na Lista de Referências e vice-versa; na revisão final do artigo pelos autores, antes da submissão, isto deve ser conferido criteriosamente, para evitar discrepâncias (o sistema ScholarOne bloqueia automaticamente artigos com discrepâncias).

Exemplos de Referências

□ Artigos publicados em periódicos:

Pavarini S.P., Soares M.P., Bandarra P.M., Gomes D.C., Bandinelli M.B., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2011. Mortes súbitas causadas por Amorimia exotropa (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):291-296.

Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. *Environ. Health* 17:15-24.

(Notem: Os iniciais dos autores devem ser colocados sem espaço. O sinal “&” é usado para separar o penúltimo do último autor. As primeiras letras das palavras do título de artigos publicados em periódicos científicos devem ser de preferência minúsculas. A palavra “Revista” deve ser abreviada como “Revta” em diferença a “Rev.”, do inglês “Review”. Deve-se indicar o número do respectivo volume do periódico e, se possível, também do fascículo. Somente abreviações tem um ponto, exceto as que terminam com a última letra da palavra em extenso. O traço entre as páginas é curto (-) e não comprido. Não devem ser usados “pontovírgulas” (;) em lugar de vírgulas.

□ Livros:

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348.

Marsh P. & Martin M. 1992. Oral Microbiology. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196.

(Notem: A primeira letra de termos do título de livros deve ser maiúscula. Devem ser mencionadas as páginas que foram consultadas, em vez do total de páginas do livro.

□ Capítulos de livros:

Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

(Notem: As primeiras letras das palavras do título de capítulos de livros são minúsculas, mas as de livros são maiúsculas.)

□ Dissertações e Teses:

Silva R.M.M. 2016. Prevalência, identificação e distribuição das lesões abscedativas em caprinos e ovinos abatidos em um matadouro frigorífico no Estado da Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 56p.

Sant'Ana V.A.C. 2004. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. Tese de Doutorado, Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 161p.

(Notem: (1) Deve-se evitar se referir a Dissertações ou Teses em vez de aos artigos baseados nas mesmas e publicados em periódicos científicos que são de mais fácil acesso. (2) Não deve-se tentar de publicar o texto de Dissertação ou Tese praticamente na íntegra sem escrever um artigo conciso de seus resultados.

□ Resumos publicados em eventos:

Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). *Pesq. Vet. Bras.* 36(Supl.2):50-51. (Resumo)

Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. *Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS, p.145-146.* (Resumo)

(Note: Evitar na consulta o uso de Resumos ao invés de artigos na íntegra!)